

**FERNANDO SANTOS DE SENA**

**Diversidade de espécies de macroalgas  
associadas ao Manguezal da Ilha Barnabé,  
Baixada Santista, SP, Brasil, com base em  
“DNA Barcode”**

São Paulo

2016

**Fernando Santos de Sena**

**Diversidade de espécies de macroalgas  
associadas ao Manguezal da Ilha Barnabé,  
Baixada Santista, SP, Brasil, com base em  
“DNA Barcode”**

Versão Revisada

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria Cassano

São Paulo

2016

Sena, Fernando Santos de

Diversidade de espécies de macroalgas associadas ao Manguezal da Ilha Barnabé, Baixada Santista, SP, Brasil, com base em “DNA Barcode”

113 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2016.

1. Macroalgas, 2. Manguezal. 3. “DNA barcoding”. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica

## Comissão Julgadora

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Cassano

## **Agradecimentos**

À agência financiadora CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de mestrado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Cassano por ter aberto as portas da pós-graduação, pela valiosa orientação, apoio, constantes ensinamentos e principalmente pela paciência.

Aos professores do LAM, Estela, Flávio, Fungyi, Mariana e Suzana. Foi um imenso prazer conhecê-los.

Ao Rosário Petti, William Silva e André Nakasato pelo suporte técnico. Seria impossível realizar qualquer trabalho sem a ajuda de vocês.

A todos os amigos do LAM pelas conversas, ajudas e pela ótima convivência dentro ou fora do laboratório: Jana, Bia, Cíntia, Fábio, Alexandre, André, Lígia, Fabiana, Carol Azevedo, Karol Magalhães, Gabi, Rafinha, Mari, Iagosta, Nuno, Ana, Bruno, Mário, Vanessa, Talissa, Talita, Luzca, Milena

À Cecília Kano, Khey Fontes e Frederick Leliaert pela valiosa contribuição para a finalização deste trabalho.

À Caroline Ximenes e Rossi pelos trabalhos de bancada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Palamar Menghini pelos constantes ensinamentos e pelo auxílio em todas as coletas.

Aos amigos de coleta, Karol Destito, Alê, Kely e Gabi.

Por fim à minha mãe, por todo o apoio, dedicação e paciência.

“Emmoldurada pelas montanhas longiquas amplia-se a região pantanosa em pitoresca irregularidade! A´ retaguarda a vultuosa Serra do Mar com os alcantis do Morrão sobranceiando as grimpas mais próximas, à frente uma superfície líquida com a largura de vários kilometros e comprimento avaliado em uma légua ou légua e meia, a qual se estende até Santos, à esquerda, atrahido o olhar por uma collina, a ilha Barnabé. Vê-se logo à esquerda uma grande extensão repleta de mangues... A magnífica paisagem que temos deante dos olhos anima-se com as canôas e barcos a vela...”

**H. Luederwaldt**

## Sumário

Lista de tabelas .....	8
Lista de figuras .....	9
Resumo.....	13
Abstract.....	15
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	21
3. OBJETIVOS .....	22
3.1. Geral .....	22
3.2. Específicos .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
4.1. Área de Estudo .....	23
4.2. Metodologia .....	25
4.2.1. Coletas e armazenamento das amostras .....	25
4.2.2. Extração de DNA .....	28
4.2.3. Amplificação dos marcadores moleculares por PCR ("Polymerase Chain Reaction").....	29
4.2.4. Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas .....	33
4.2.5. Alinhamento e análises moleculares.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Sinopse dos táxons identificados .....	39
5.2. Análises moleculares.....	40
5.3. Rhodophyta .....	40
5.3.1. Gênero <i>Bostrychia</i> Montagne e sua parasita <i>Dawsoniocolax bostrychiae</i> (A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita) A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita .....	40
5.3.2. Gênero <i>Caloglossa</i> (Harvey) G. Martens .....	64

5.3.3. Gênero <i>Catenella</i> Greville.....	75
5.4. Chlorophyta .....	78
5.4.1. Gênero <i>Boodleopsis</i> Gepp & E.S. Gepp .....	78
5.4.2. Gênero <i>Cladophoropsis</i> Børgesen.....	83
5.4.3. Gênero <i>Rhizoclonium</i> Kützing .....	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A – Tabela de amostras sequenciadas .....	110

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Lista das coletas realizadas por estação na Ilha Barnabé, Baixada Santista, SP.....	26
Tabela 2 – Relação de “primers” direto (F) e reverso (R) para os diferentes marcadores moleculares utilizados neste estudo. ....	31
Tabela 2 – Continuação. ....	32
Tabela 3 – Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores moleculares utilizados. ....	32
Tabela 4 – Sequências obtidas do GenBank utilizadas nas análises moleculares.....	35
Tabela 5 – Ocorrência dos táxons identificados por estações de coleta/amostragem.....	94
Tabela 6 – Amostras sequenciadas neste estudo. ....	110



## Lista de figuras

- Figura 1 - Localização da área de estudo (Baixada Santista). Modificado de Menghini (2008). .....23
- Figura 2 - Localização da Ilha Barnabé na Baixada Santista. Modificado de Menghini (2008). Fonte:Google Earth.....24
- Figura 3 - Localização das estações de coleta da Ilha Barnabé. As bandeiras indicam os transectos. As linhas tracejada e pontilhada indicam a Estrada de ferro e a Rodovia respectivamente. Fonte: Google Earth. ....25
- Figura 4** - A-F. Ambientes de coleta da Ilha Barnabé. A. Vista geral do bosque de mangue da estação 1. B. Detalhe do sedimento. C. Algas aderidas aos rizóforos de *R. mangle*. D. Vista geral do bosque de mangue da estação 3. E-F. Pneumatóforos da estação 2. ....27
- Figura 5 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Bostrychia*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e número de acesso. ....41
- Figura 6 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador COI-5P para o gênero *Bostrychia*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e número de acesso. ....44
- Figura 7 - Árvore consenso de (BI) para as sequências de *rbcL* das espécies de *Bostrychia*. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap para as análises de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência bayesiana (BI). Valores menores que 70% (ou .70 probabilidade) estão representados como (-). Asterisco (\*) indica suporte total para todas as análises. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso. ....48

- Figura 8 - Representação esquemática do desenvolvimento do haptera em *Bostrychia*. Seta vermelha indica local de desenvolvimento do haptera. A – Periferohaptera. B – Cladohaptera. Modificado de King & Puttock (1989).52
- Figura 9 - *Dawsonicolax bostrychiae*. Aspecto geral da parasita (setas) sobre *B. radicans* 2. B- Aspecto geral de uma planta feminina com várias tricogines. C-Detalhe da parasita aderida ao talo de *B. radicans* 2 .....59
- Figura 10 - “*Bostrychia calliptera*”. A-Aspecto geral do talo. B-Detalhe dos râmulos com estiquídios. C-Detalhe do eixo principal ecorticado. ....60
- Figura 11 - *Bostrychia montagnei*. A-Aspecto geral do talo. B-Detalhe do ápice recurvado. C-Detalhe do ramo corticado. D-Detalhe do râmulo de última ordem parcialmente monossifônico. ....60
- Figura 12 – Comparação entre espécimes de *Bostrychia radicans*. A- *B. radicans* 1. B- *B. radicans* 2. ....61
- Figura 13 – *Bostrychia radicans* 2. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do ápice e padrão de ramificação. C- Detalhe ápice polissifônico. D- Detalhe do ramo lateral primário ecorticado. E- Detalhe do talo mostrando ecorticação.....61
- Figura 14 – *Bostrychia radicans* 2. A- Ápices com estiquídios. B- Ápices com cistocarpos. C- Detalhe de um estiquídio. D- Detalhe de um cistocarpo. ..62
- Figura 15 – *Bostrychia moritziana* 2. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação. C- Detalhe do talo ecorticado e râmulo de última ordem inteiramente monossifônico. D- Detalhe do cladohaptera.....63
- Figura 16 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Caloglossa*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e do número de acesso.....65
- Figura 17 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador COI-5P para o gênero *Caloglossa*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está do número de acesso. ....66
- Figura 18 - Árvore consenso derivada da análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências de *rbcL* das espécies de *Caloglossa*. Nos ramos estão plotados

os valores de Bootstrap para as análises de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência bayesiana (BI). Valores menores que 70% (ou .70 probabilidade) estão representados como (-). Asterisco (\*) indica suporte total para todas as análises. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso. (Kano *et al.* 2016, submetido, Apêndice B).....67

- Figura 19 - *Caloglossa apomeiotica*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação. C- Detalhe ápice fértil. D- Detalhe dos bisporângios (vista superficial corada com azul de anilina 1% acidificada com HCl 1N). Note tetrasporângio em meio aos bisporângios.....73
- Figura 20 – *Caloglossa confusa*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe da constrição. C- Detalhe da constrição com rizoides. D- Detalhe da fronde mostrando nervura central.....74
- Figura 21 – *Caloglossa ogasawaraensis*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe filamento delgado. C- Detalhe da fronde. ....74
- Figura 22 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Catenella*. O valor de bootstrap (2000 réplicas) está representado no ramo. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a retirada do Genbank está seguida do local de coleta e do número de acesso.....75
- Figura 23 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador SSU para o gênero *Catenella*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as retiradas no Genbank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso.....76
- Figura 24 – *Catenella caespitosa*. Aspecto geral do talo. Note segmentos ovais e achatados com constrições bem evidentes e ramificação dicotômica ou tricotômica.....78
- Figura 25 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador *rbcL* para o gênero *Boodleopsis*. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta, quando disponível, e do número de acesso. ....80

Figura 26 – <i>Boodleopsis pusilla</i> . A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação dicotômico. C- Detalhe das constrictões nas dicotomias e ao longo do filamento.....	82
Figura 27 – <i>Boodleopsis vaucheroidea</i> . A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe da ramificação dicotômica divaricada. C- Detalhe dos râmulos sem constrictão nas dicotomias. ....	82
Figura 28 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador ITS rDNA nuclear para o gênero <i>Cladophoropsis</i> . Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso.....	84
Figura 29 - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador ITS rDNA nuclear para o gênero <i>Cladophoropsis</i> . Espécimes com morfologia <i>C. membranacea</i> estão espalhados em sete clados distintos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em verde na árvore. ....	85
Figura 30 – <i>Cladophoropsis membranacea</i> . A- Aspecto geral do talo mostrando denso tufo. B- Detalhe ramo lateral novo sem septo na base. C- Detalhe de rizoide. D- Detalhe da célula tentacular. E- Detalhe da ramificação unilateral e rizoide. ....	88
Figura 31 – <i>Rhizoclonium africanum</i> . A- Detalhe da ramificação secundária. B- Detalhe do septo na ramificação. C- Detalhe rizoide multicelular. ....	91
Figura 32 – <i>Rhizoclonium riparium</i> . A- Aspecto geral do talo formando tufo emaranhados. B- Detalhe do filamento unisseriado. C- Detalhe filamento com falsa ramificação. ....	91

## Resumo

Estudos sobre a diversidade de macroalgas de manguezais no Brasil tem-se baseado apenas em abordagens morfológicas, nas quais os caracteres empregados são instáveis e pouco informativos para a identificação e delimitação de espécies. Neste contexto, macroalgas de manguezais foram investigadas pela primeira vez no litoral brasileiro usando uma abordagem molecular, tendo como alvo de estudo o manguezal da Ilha Barnabé, Baixada Santista, São Paulo. Foram utilizados marcadores moleculares do tipo “DNA Barcode”, UPA e COI-5P, além do *rbcl*, amplamente empregado para inferências filogenéticas, e o SSU rDNA. Além desses, os marcadores ITS e *tufA* foram empregados exclusivamente para as algas verdes, este último sem sucesso. Quinze espécies foram registradas para a área estudada, sendo dez Rhodophyta e cinco Chlorophyta. Destas, duas não novas ocorrências para o Estado de São Paulo, *Caloglossa apomeiotica* e *Boodleopsis vaucherioidea*. Das quatro espécies do gênero *Bostrychia* e sua parasita identificadas neste estudo: “*Bostrychia calliptera*”, *B. montagnei*, *B. moritziana*, *B. radicans* e *D. bostrychia*, apenas *B. montagnei* revelou-se uma espécie molecular e morfológicamente bem definida. As demais formaram complexos de espécies com linhagens moleculares distintas. Para *B. radicans* e *B. moritziana* as análises relevaram três e duas linhagens moleculares, respectivamente, das sete identificadas para o complexo *B. radicans/B. moritziana* na literatura. O táxon identificado como “*B. calliptera*” mostrou alta divergência molecular com sequências de *B. calliptera* do Brasil, apresentando morfologia “*B. pinnata*”, um táxon atualmente reduzido a sinônimo de *B. calliptera*. Espécies do gênero *Caloglossa*, excetuando *C. ogasawaraensis*, são de difícil identificação morfológica devido aos tênues caracteres considerados de valor diagnóstico e a sua considerável plasticidade fenotípica. *Caloglossa apomeiotica*, *C. confusa* e *C. leprieurii* foram identificadas essencialmente com o emprego de marcadores moleculares. *Caloglossa apomeiotica* pode ser segregada das demais pela presença de biesporângios, o que impossibilita uma identificação morfológica segura quando coletados talos inférteis, enquanto *C. confusa* possui nós fortemente contritos. Os dados moleculares obtidos para *Catenella caespitosa* a partir de sequências de SSU sugerem que as citações dessa espécie para o litoral brasileiro podem estar equivocadas já que apresentam alta divergência intraespecífica com *C. caespitosa* do banco de dados. A falta de sequências da localidade tipo, de sequências com marcadores do tipo “DNA Barcode” e de uma maior amostragem molecular das espécies de *Catenella* nos bancos de dados, nos

impossibilitaram chegar a um resultado conclusivo. A obtenção de sequências para as algas verdes foi extremamente problemática, inviabilizando uma comparação mais ampla entre as espécies coletadas. Das duas espécies coletadas de *Boodleopsis* foram obtidas apenas duas sequências parciais de *rbcL* para *B. vaucheroidea* e nenhuma para *B. pusilla*. A comparação com a única sequência de *Boodleopsis* depositada nos bancos de dados, uma sequência parcial de *rbcL* de *B. pusilla*, revelou baixa divergência molecular com as nossas sequências de *B. vaucheroidea*. Além da necessidade de obtenção de sequências completas de *rbcL* de ambas espécies da área estudada para comparação, uma maior amostragem e o emprego de outros marcadores moleculares são necessários para esclarecer o posicionamento taxonômico desses dois táxons, cuja coespecificidade não pode ser descartada. Morfologicamente, "*Cladophoropsis membranacea*" é uma espécie facilmente identificada, entretanto sequências de ITS obtidas neste estudo são não comparáveis a nenhuma sequência dessa espécie depositada nos bancos de dados, incluindo sequências da localidade tipo. Reconhecidamente *Cladophoropsis* é um gênero polifilético e integra o complexo *Boodlea* que inclui diferentes gêneros de Boodleaceae. A obtenção de sequências de outros marcadores como o SSU rDNA e LSU rDNA assim como uma maior amostragem podem ser informativas para esclarecer a posição das "*C. membranacea*" brasileiras dentro das Cladophorales. Mesmo após inúmeras tentativas não foi possível obter sequências para as duas espécies de *Rhizoclonium* encontradas, *R. africanum* e *R. riparium*, cuja identificação foi feita com base em caracteres morfológicos tradicionais.

## Abstract

Studies on the diversity of macroalgae from mangroves in Brazil have been based only on morphological approaches, in which characters used are unstable and uninformative for the species identification and delimitation. In this context, macroalgae of mangroves were investigated for the first time in the Brazilian coast using a molecular approach, having as target of our study the mangrove of the Barnabé Island, Santos, São Paulo. DNA Barcode markers UPA and COI-5P were used, besides the *rbcL*, largely used for phylogenetic inferences, and also SSU rDNA. In addition to these, the ITS and *tufA* markers were used exclusively for the green algae, the latter unsuccessfully. Fifteen species were recorded for the studied area, ten Rhodophyta and five Chlorophyta. Of these, two are new records for the State of São Paulo, *Caloglossa apomeiotica* e *Boodleopsis vaucheroidea*. Of the four species of the genus *Bostrychia* identified in this study: "*Bostrychia calliptera*", *B. montagnei*, *B. moritziana* and *B. radicans*, only *B. montagnei* proved to be a molecular and morphologically well-defined species. The other species formed complexes with different molecular lineages. For *B. radicans* and *B. moritziana*, the analyses showed three and two molecular lineages, respectively, of the seven identified for the *B. radicans/B. moritziana* complex in the literature. The taxon identified as "*B. calliptera*" showed high molecular divergence with sequences of *B. calliptera* from Brazil, presenting morphology "*B. pinnata*", a taxon currently reduced to a synonym of *B. calliptera*. *Caloglossa* species, except *C. ogasawaraensis*, are difficult to identify due to the subtle morphological characters considered of diagnostic value, and their considerable phenotypic plasticity. *Caloglossa apomeiotica*, *C. confusa* and *C. lepieurii* were identified primarily by the use of molecular markers. *Caloglossa apomeiotica* can be segregated from the others by the presence of bisporangia, which makes unreliable morphological identification when collected infertile thalli, while *C. confusa* has strongly constricted thallus nodes. The molecular data obtained for *Catenella caespitosa* from SSU sequences suggest that the citations of this species for the Brazilian coast may be misleading since they have high intraspecific divergence with *C. caespitosa* from database. Due to the lack of sequences from the type locality, sequences of DNA barcode markers, and a major molecular sampling of *Catenella* species in databases, became impossible to reach a conclusive result. The obtaining of sequences for green algae was extremely problematic, making impracticable a broader comparison between the collected species. Of the two collected species of *Boodleopsis*, only two partial sequences of *rbcL* were obtained for *B. vaucheroidea* and none for *B. pusilla*. The comparison with the unique sequence of *Boodleopsis* deposited in

databases, a partial *rbcl* sequence of *B. pusilla*, revealed low molecular divergence with our sequences of *B. vaucheroidea*. Besides the need to obtain complete sequences of *rbcl* from both species from the studied area for comparison, an increased sampling and the use of other molecular markers are needed to clarify the taxonomic position of these two taxa, whose conspecificity cannot be disregarded.

Morphologically, "*Cladophoropsis membranacea*" is an easily identified species, however, ITS sequences obtained in this study are not comparable to any sequence of this species deposited in databases, including sequences from the type locality. Admittedly, *Cladophoropsis* is a polyphyletic genus and integrates the *Boodlea* complex that includes different genera of Boodleaceae. The obtaining of sequences from other markers, such as SSU rDNA and LSU rDNA, well as a larger sampling, may be informative to clarify the taxonomic position of "*C. membranacea*" within the Brazilian Cladophorales. Even after numerous attempts we could not get sequences for the two *Rhizoclonium* species found in the studied area: *R. africanum* and *R. riparium*, whose identification was made based on traditional morphological characters.



## 1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre o ambiente terrestre e marinho, característicos de regiões tropicais e subtropicais, sujeitos ao regime das marés. Ocorrem em regiões costeiras abrigadas e apresentam condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerados importantes transformadores de nutrientes em matéria orgânica e geradores de bens e serviços (Schaeffer-Novelli 1995).

O manguezal é considerado como um dos ecossistemas costeiros mais produtivos da biosfera. Esta análise está baseada apenas na produção de serapilheira (Lugo & Snedaker 1974), porém sabe-se que as algas presentes nos manguezais contribuem diretamente para o aumento da produtividade desse ecossistema. De acordo com os estudos Rodriguez & Stoner (1990), realizados no estuário de Laguna Joyuda (Porto Rico), os valores de biomassa da flora algácea associadas às raízes de *Rhizophora mangle* Linnaeus foram similares aos valores anuais de produção de serapilheira.

A comunidade de macroalgas nos manguezais apresenta uma ampla tolerância às condições tipicamente estressantes do ambiente estuarino e uma capacidade de produção líquida mesmo em períodos de emersão, sugerindo desta forma, que estes organismos podem representar uma importante fonte de carbono para os manguezais (Mann & Steinke 1988, Peña *et al.* 1999).

Além de atuarem como produtores primários de matéria orgânica, fonte de alimento e substrato para fixação e refúgio de inúmeros animais e microorganismos, as macroalgas apresentam taxas de decomposição bastante elevadas, liberando nutrientes orgânicos e inorgânicos, que podem ser utilizados localmente ou serem exportados para águas adjacentes (Hanisak 1993).

A identificação das espécies de macroalgas que ocorrem em manguezais tem sido baseada quase que exclusivamente em suas características morfológicas vegetativas e reprodutivas. Conseqüentemente, a morfologia simples e a plasticidade fenotípica encontrada nessas algas dificultam uma delimitação específica adequada.

Os caracteres vegetativos empregados para delimitar, por exemplo, espécies de *Bostrychia* Montagne ou *Caloglossa* (Harvey) G. Martens, comuns em manguezais, tem sido considerados insuficientes para separá-las satisfatoriamente (King *et al.* 1988, Krayesky *et al.* 2012, Zuccarello & West 2006, Zuccarello *et al.* 2006, 2015, Kamiya & West 2014). Nesse contexto, marcadores moleculares para analisar a variação de sequências de DNA têm sido amplamente utilizados para identificar e delimitar espécies, bem como inferir relações filogenéticas entre os organismos.

O emprego de marcadores moleculares para desvendar a diversidade de macroalgas de manguezais ainda é incipiente, apenas dois trabalhos foram publicados por Zuccarello *et al.* (2012) e West *et al.* (2013). No primeiro deles, os autores estudaram as algas vermelhas dos manguezais de El Salvador e Pacífico mexicano empregando os marcadores LSU rDNA e *rbcL* para inferir relações filogenéticas dos gêneros *Bostrychia* Montagne e *Caloglossa* (Harvey) G. Martens. No segundo trabalho, West *et al.* (2013) estudaram as macroalgas de manguezais de Guam e da Micronesia, Pacífico ocidental, gerando sequências do espaçador do gene que codifica para a Rubisco e sequências parciais do LSU rDNA, mais uma vez para *Bostrychia* e *Caloglossa*.

No Brasil, estudos sobre algas de manguezais foram realizados enfocando principalmente aspectos ecológicos como a distribuição vertical e horizontal (Hadlich 1984, Hadlich & Bouzon 1985, Miranda & Pereira 1989, Paula *et al.* 1989, Eston *et al.* 1992, Bouzon & Ouriques 1999, Cunha *et al.* 1999, Cunha & Costa 2002, Cunha & Duarte 2002, Cutrim *et al.* 2004, Fernandes *et al.* 2005, Caridade & Ferreira-Correia 2007, Fernandes & Alves 2011, Sena 2012, Sena *et al.* 2012). Um único estudo no Brasil envolvendo ferramentas moleculares foi realizado por Fontes (2012). Entretanto, seu estudo concentrou-se apenas na análise molecular de representantes do gênero *Bostrychia* por meio de marcadores plastidiais (UPA e *rbcL*) e mitocondrial (COI-5P).

Com o intuito de minimizar as limitações da taxonomia clássica baseada em caracteres morfológicos, Hebert *et al.* (2003) analisaram a variação de sequências de DNA de animais utilizando como marcador a região 5' do gene mitocondrial que codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase (COI-5P ou *cox1*). Esta técnica

denominada “DNA Barcoding”, em analogia ao sistema de código de barras usado em produtos manufaturados (Stoeckle, 2003), consiste na amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de um segmento de DNA relativamente curto (~400-700 pb) que pode ser inteiramente sequenciado com os mesmos dois “primers” usados na PCR. O COI-5P é um “DNA Barcode” padrão amplamente utilizado para vários grupos de animais (Lewis *et al.* 2011). Como uma ferramenta útil de auxílio à taxonomia tradicional, a eficácia deste método já está estabelecida não apenas em vários grupos de animais, como aves e peixes, mas também em outros grupos de organismos como plantas, fungos e macroalgas.

O sucesso desse marcador como “DNA Barcode” em animais levou Saunders (2005) a propô-lo como um potencial marcador em Rhodophyta. Estudos com diferentes grupos de algas vermelhas marinhas e continentais tem demonstrado que o COI-5P é um marcador eficiente para a discriminação de espécies, incluindo a detecção de espécies crípticas (Clarkston & Saunders 2010, Costa *et al.* 2012, Milstein *et al.* 2012, Paiano & Necchi 2013, Agostinho & Necchi 2014, Machín-Sánchez *et al.* 2014, Nauer *et al.* 2014, Saunders & Millar 2014) Contudo, os primers originais propostos por Saunders (2005) não são eficientes para todos os grupos de algas vermelhas. De fato, um dos maiores problemas na utilização do COI-5P é a falta de primers universais para amplificação, o que tem requerido a utilização de diferentes combinações de primers ou mesmo a utilização de marcadores alternativos (Saunders 2005, Clarkston & Saunders 2010, Milstein *et al.* 2012).

O protocolo de extração e a utilidade do COI-5P para algas pardas foram ajustados e testados por McDevit & Saunders (2009). Entretanto, esse marcador é ineficiente para as algas verdes (Saunders & Kucera 2010). Devido a essa ineficiência, o marcador plastidial *tufA* foi proposto como “DNA Barcode” alternativo padrão para esse grupo por Saunders & Kucera (2010). Esses autores avaliaram vários marcadores do tipo “DNA Barcode” para macroalgas verdes e o *tufA* demonstrou a mais alta universalidade dentre os marcadores testados, com uma taxa de sucesso de 94% na sua amplificação, excetuando a família Cladophoraceae, para a qual esse marcador mostrou-se ineficiente, tendo como alternativa o uso do ITS rDNA nuclear, o espaçador intergênico dos genes ribossomais (ITS 1 e ITS 2). O *tufA* possui cerca de 800 pb e codifica para o fator Tu de alongação, o maior fator que

possui atividade durante a síntese de proteínas adicionando aminoácidos à cadeia que está sendo construída (Barata 2008). Esse marcador também tem sido usado para inferir relações filogenéticas em gêneros de algas verdes, como *Caulerpa* J.V. Lamouroux, *Halimeda* J.V. Lamouroux, *Phaeophila* Hauck e *Ochlochaete* Thwaites ex Harvey (Famá *et al.* 2002, O'Kelly *et al.* 2004, Barata 2008, Verbruggen *et al.* 2009 a, b, Zuccarello *et al.* 2009, Ximenes 2015).

Com a perspectiva de se obter primers universais plastídias, Presting (2006) propôs a utilização do Domínio V do gene que codifica para a subunidade 23S do ribossomo – p23SrV ou UPA (Universal Plastid Amplicon) como um marcador alternativo para organismos fotossintetizantes. O UPA é uma porção de 370 pb e tratando-se de um marcador universal pode ser utilizado para algas verdes, pardas e vermelhas. Estudos posteriores mostraram a marcada universalidade desse marcador na avaliação molecular dos grandes grupos de macroalgas, assim como microalgas marinhas e cianobactérias (Sherwood & Presting 2007, Sherwood *et al.* 2008, 2010). Essa região é mais conservada que o COI-5P, entretanto, é mais facilmente amplificada e sequenciada (Saunders & Kucera 2010). Por outro lado por ser um marcador muito conservado, tem sido apontadas falhas na delimitação de espécies pelo UPA, e, portanto, o seu uso tem sido indicado com cautela devido à subestimação de espécies (Saunders & Kucera 2010, Clarkston & Saunders 2013, Kano 2015).

Sequências do gene plastídial *rbcL*, que codifica a subunidade grande da ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) têm sido amplamente utilizadas para inferir hipóteses filogenéticas e delimitar gêneros e espécies em macroalgas, especialmente após os trabalhos de Freshwater & Rueness (1994) e Freshwater *et al.* (1994). O *rbcL* possui cerca de 1400 pb e não apresenta indels evitando ambiguidades no alinhamento das sequências (Freshwater & Rueness 1994, Freshwater *et al.* 1994, 1995, Fredericq *et al.* 1996). Em algas vermelhas, o *rbcL* tem sido frequentemente empregado no estudo de diferentes ordens, como Ceramiales (Barros-Barreto *et al.* 2006, Fujii *et al.* 2006, Cassano *et al.* 2012, Fontes 2012), Bangiales (Sutherland *et al.* 2011, Milstein *et al.* 2015), Gelidiales (Freshwater *et al.* 1995, Iha 2014), Gigartinales (Fredericq *et al.* 1999, Nauer *et al.* 2014, 2015), Hildenbrandiales (Sherwood & Sheath 2003) e Gracilariales (Gurgel & Fredericq 2004, Lyra *et al.* 2015), gerando hipóteses filogenéticas confiáveis. Para algas verdes, o *rbcL*

também tem sido empregado para filogenia de alguns gêneros, como *Codium* Stackhouse (Oliveira-Carvalho *et al.* 2012) e *Halimeda* (Dijoux *et al.* 2012, Verbruggen *et al.* 2009b, Ximenes 2015), assim como categorias taxonômicas superiores (Rindi *et al.* 2007).

O marcador nuclear SSU rDNA (18S), com cerca de 1800 pb, que codifica o RNA da subunidade pequena do ribossomo, é conservado apresentando uma taxa lenta de mutação, é de fácil alinhamento e utilizado em níveis taxonômicos diversos e em reconstruções filogenéticas (Oliveira 2001). Por ser mais conservado em suas extremidades o gene pode ser amplificado inteiramente com a utilização de “primers” universais (Oliveira 2001), que pode torná-lo menos laborioso. Neste trabalho, o SSU rDNA foi testado alternativamente para algas verdes devido à ineficiência do COI-5P e *tufA* e utilizado para algas vermelhas visando a comparação com sequências depositadas nos bancos de dados. Por outro lado, o marcador ITS rDNA nuclear é uma região muito variável sendo recomendada para estudos intra- e interespecíficos (Oliveira 2001) e usado em reconstruções filogenéticas como do gênero *Caulerpa* J.V. Lamouroux (Stam *et al.* 2006) e para a ordem Cladophorales (Leliaert *et al.* 2007a, 2009). De acordo com Alvarez & Wendel (2003) o ITS rDNA nuclear apresenta potenciais problemas relacionados com a heterogeneidade intra-indivíduo ou dificuldades com múltiplos alinhamentos de sequências devido aos altos níveis de variação, o que foi confirmado por Barata (2008) para o gênero *Caulerpa*. Apesar disso, o ITS rDNA nuclear pode revelar resultados interessantes ao nível específico (Feliner & Rosello 2007, Barata 2008). A utilidade do ITS rDNA nuclear como marcador do tipo “DNA Barcode” de algas verdes foi avaliada por Saunders & Kucera (2010), cujos resultados mostraram pelo menos uma baixa taxa de sucesso para as Cladophoraceae, enquanto todos os demais marcadores testado falharam para esse grupo.

## 2. JUSTIFICATIVA

As macroalgas associadas aos manguezais são organismos de grande importância ecológica sendo fundamentais na manutenção da fauna estuarina. A identificação e delimitação das espécies têm sido baseadas principalmente em caracteres vegetativos e reprodutivos, o que gera dificuldades na sua determinação devido à morfologia simples dessas algas e à sua plasticidade fenotípica. Inventários da flora algácea de manguezal aplicando a técnica de “DNA Barcoding” é inédito no Brasil. Apenas um trabalho é citado para algas de manguezal (Fontes 2012), porém, está restrito ao gênero *Bostrychia*. Considerando a escassez de dados moleculares de algas de manguezal, estudos como o proposto aqui são necessários para expandir o nosso conhecimento sobre a biodiversidade do manguezal, imprescindível para a conservação e a utilização dos nossos recursos naturais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

- Investigar a diversidade de espécies de macroalgas associadas aos manguezais da Ilha Barnabé aplicando a técnica de “DNA barcoding”.

#### **3.2. Específicos**

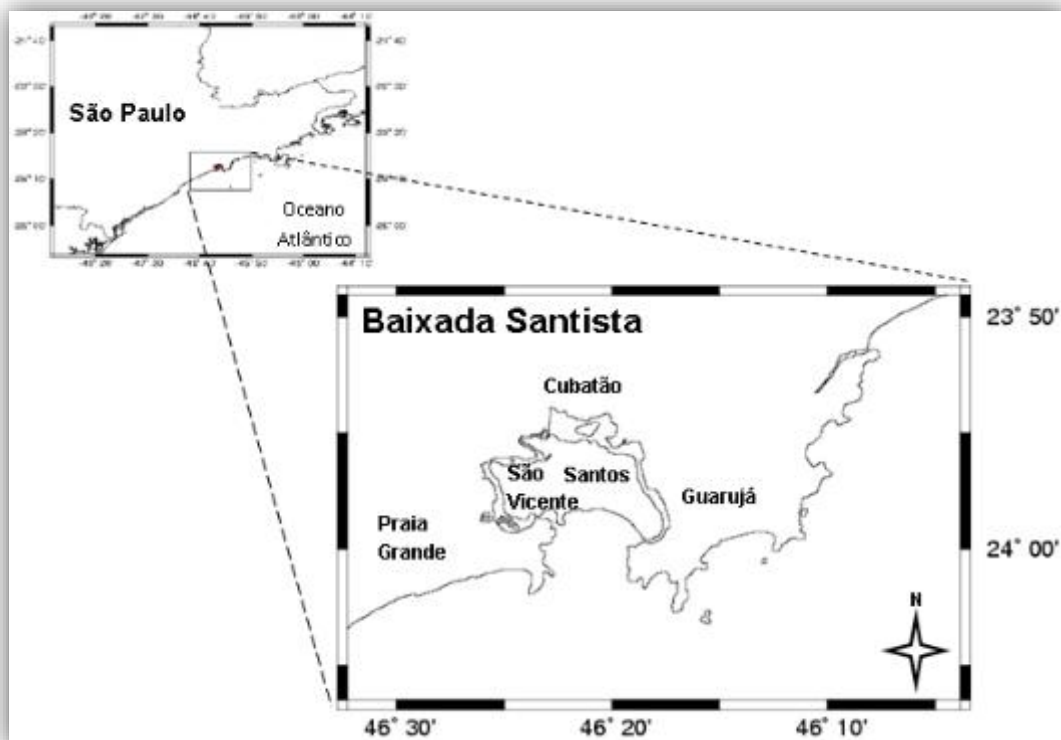
- Sequenciar e comparar os marcadores moleculares do tipo “DNA barcode” (COI-5P, UPA e *tufA*) e marcadores alternativos (SSU, ITS rDNA nuclear) das amostras coletadas para fins taxonômicos.
- Inferir as relações filogenéticas entre as espécies por meio do gene *rbcL*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Área de Estudo

A Baixada Santista localiza-se no litoral do Estado de São Paulo ( $24^{\circ}50' S$ ,  $46^{\circ}45' W$  e  $23^{\circ}45' S$ ,  $45^{\circ}50' W$ ), ocupando posição central na costa. A região metropolitana da Baixada Santista engloba os municípios de Praia Grande, São Vicente, Cubatão, Santos, Guarujá e Bertioga. A área total da Baixada Santista é de  $1.329 \text{ km}^2$ , sendo que 10% ( $133 \text{ km}^2$ ) eram ocupados originalmente por manguezais (CETESB, 1991).

Essa região apresenta um clima quente e úmido com temperatura média anual de  $22^{\circ}\text{C}$  e precipitação média anual entre 2000 e 2500 mm, não apresentando uma estação seca definida. A umidade relativa do ar é alta, alcançando média anual de 80% (Santos, 1965; Schaeffer-Novelli & Cintrón, 1986). Quanto às marés, a região é caracterizada por maré semi-diurnas, com alturas máximas de 1,5 m acima do nível médio que é de 0,79 m (DHN, 2012).

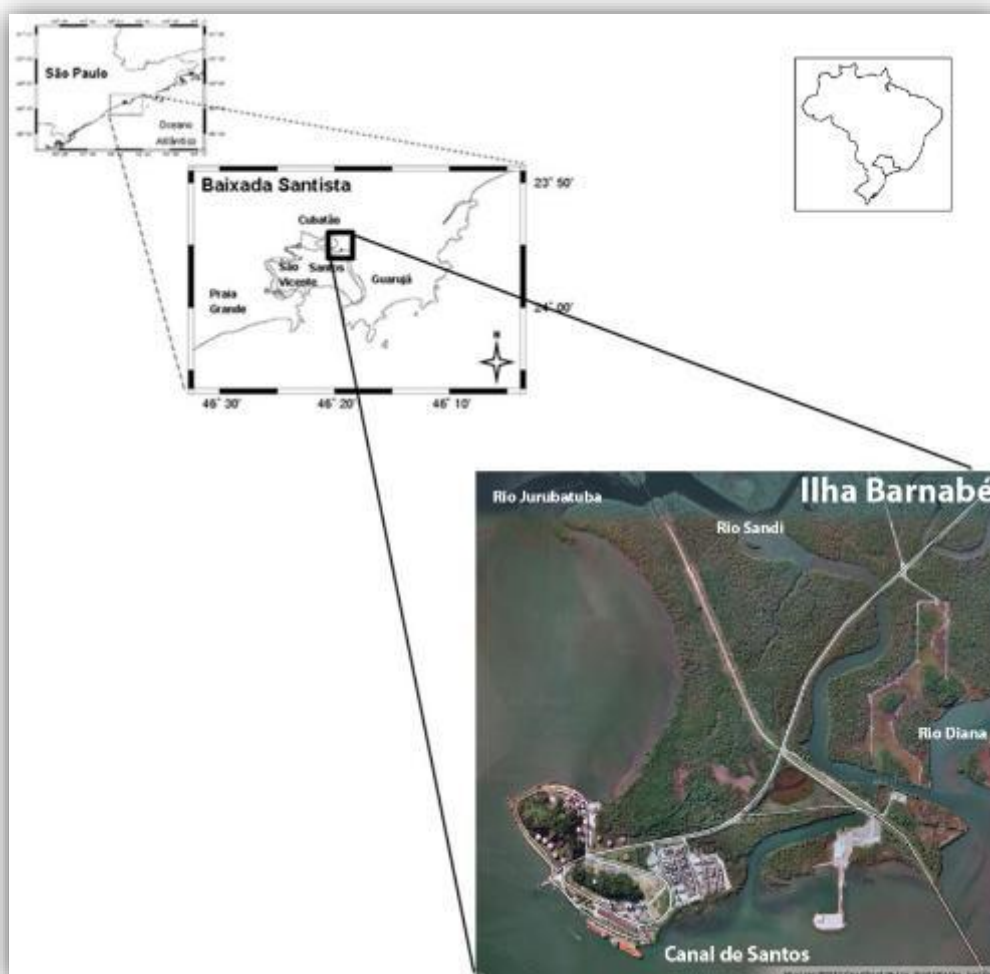


**Figura 1** - Localização da área de estudo (Baixada Santista). Modificado de Menghini (2008).



A Ilha Barnabé localiza-se na parte central do estuário de Santos próximo à desembocadura dos rios Jurubatuba, Sandi e Diana, em frente ao Canal de Santos (Figuras 1 e 2). Apresenta apenas um maciço cristalino na porção sul-sudoeste, onde se iniciou sua ocupação antrópica, o restante de sua área era inteiramente ocupado por manguezais. Porém, na década de 1970 algumas construções como rodovia e estrada de ferro modificaram algumas características locais como alteração do curso do Rio Sandi e aterros, mas ainda se encontram grandes extensões do ecossistema manguezal na Ilha Barnabé (Menghini 2008).

A caracterização estrutural dos bosques de mangue realizada por Menghini (2008) na área de estudo mostrou que *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman ex Moldenke é a espécie dominante logo o sedimento apresenta um extensa cobertura de pneumatóforos com uma comunidade de macroalgas bem desenvolvida.



**Figura 2** - Localização da Ilha Barnabé na Baixada Santista. Modificado de Menghini (2008). Fonte:Google Earth.

## 4.2. Metodologia

### 4.2.1. Coletas e armazenamento das amostras

As amostras foram coletadas em 2013-2014 em três estações de coleta eleitas com base nas características locais como facilidade de acesso e disponibilidade de pneumatóforos (Figuras 3 e 4), na zona entre-maré, durante as marés baixas, condição que permite que os pneumatóforos fiquem emersos bem como facilita a movimentação dentro do manguezal (Tabela 1). Na estação 1 (Norte) foram coletados pneumatóforos na franja, paralelamente ao Rio Sandi num transecto de 100m, e perpendicularmente desde a franja até terra firme num transecto de 150m. Na estação 2 (Sul), onde resta uma pequena faixa de mangue, a coleta ocorreu paralelamente ao rio num transecto de 100m. Na estação 3 (Noroeste), devido a impossibilidade de movimentação na franja, os pneumatóforos foram coletados perpendicularmente desde a franja até terra firme num transecto de 100m.



**Figura 3** - Localização das estações de coleta da Ilha Barnabé. As bandeiras indicam os transectos. As linhas tracejada e pontilhada indicam a Estrada de ferro e a Rodovia respectivamente. Fonte: Google Earth.

**Tabela 1** - Lista das coletas realizadas por estação na Ilha Barnabé, Baixada Santista, SP.

Estações	Data	Maré* (m)	Coordenadas geográficas	Coletores
1 Norte	Fevereiro-2013	0.2	23°54'28.40"S, 46°19'20.20"O e	F.Sena, R.Menghini, M.Destito, K.Rocha
	Setembro-2013	0.2	23°54'31.50"S, 46°19'21.40"O	F.Sena, R.Menghini, M.Destito
2 Sul	Setembro-2013	0.2	23°55'9.94"S, 46°19'4.00"O e	F.Sena, R.Menghini, M.Destito
	Fevereiro-2014	0.2	23°55'10.43"S, 46°19'6.19"O	F.Sena, R.Menghini, A.Santos
3 Noroeste	Junho-2013	0.2	23°54'34.83"S, 46°19'37.44"O e 23°54'32.92"S, 46°19'33.35"O	F.Sena, R.Menghini, S.Macedo

\*Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha do Brasil, <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/>

Os pneumatóforos foram cuidadosamente cortados rente ao sedimento com auxílio de uma tesoura de poda, lavados para retirar o excesso de sedimento e imediatamente acondicionados em garrafas do tipo PET de 500 ml devidamente identificadas. As coletas nos rizóforos de *R. mangle* e troncos de *A. schaueriana* foram realizadas com auxílio de espátula e acondicionadas em sacos plásticos do tipo zip-lock, já etiquetados. Todas as amostras foram georeferenciadas com uso de aparelho de GPS (Global Positioning System).

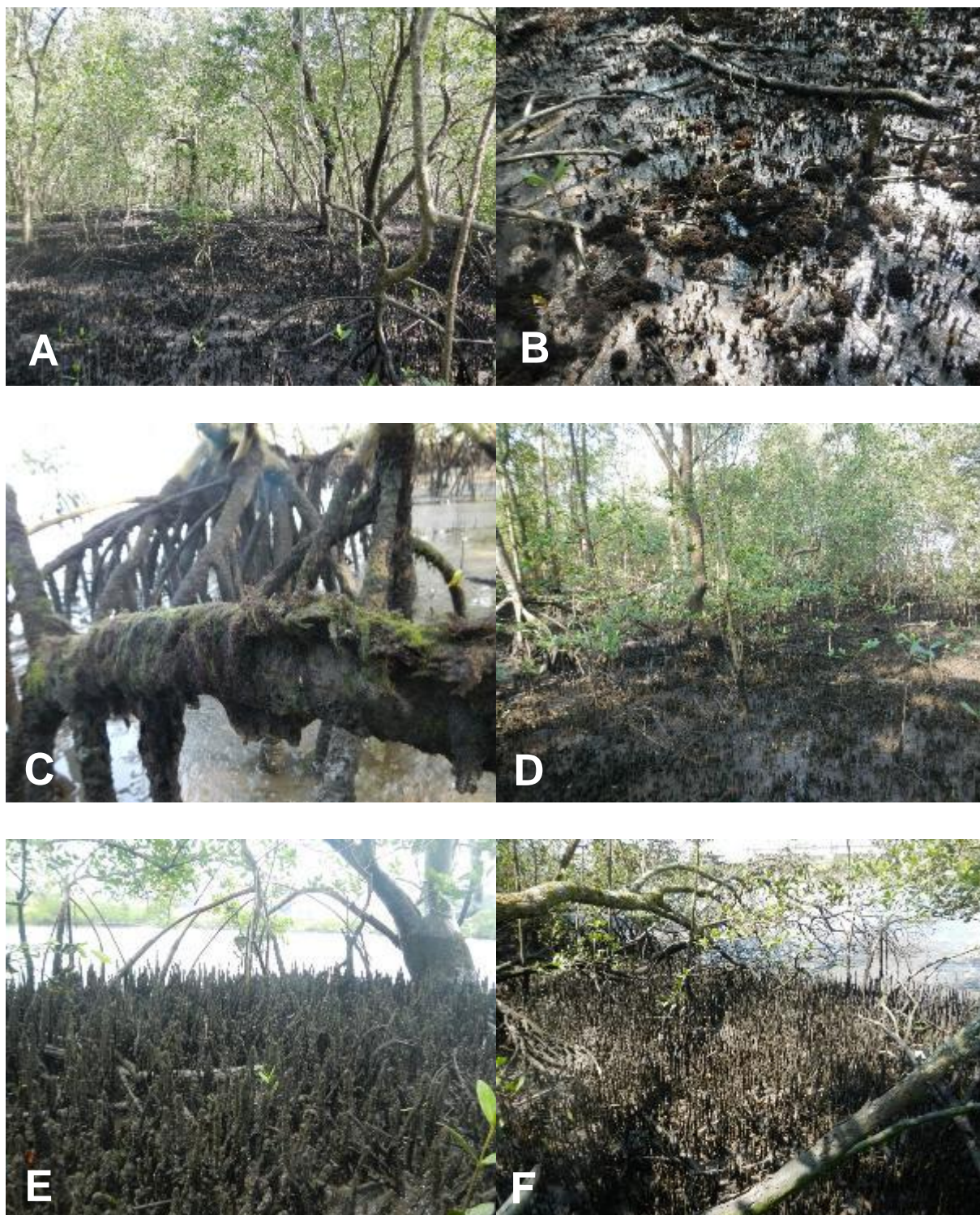


Figura 4 - A-F. Ambientes de coleta da Ilha Barnabé. A. Vista geral do bosque de mangue da estação 1. B. Detalhe do sedimento. C. Algas aderidas aos rizóforos de *R. mangle*. D. Vista geral do bosque de mangue da estação 3. E-F. Pneumatóforos da estação 2.

A triagem foi realizada no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” – LAM do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo. As algas aderidas aos pneumatóforos foram cuidadosamente removidas com o auxílio de estereomicroscópio, marca Leica Wild M3C. Para uma triagem e análise mais detalhada foi utilizado microscópio óptico, marca Nikon Eclipse E-200. Parte do material foi preservada em formol a 4% em água do mar para análise de caracteres morfológicos e posterior herborização. Medidas de caracteres diagnósticos imprescindíveis para a identificação morfológica das espécies foram feitas por meio de ocular micrométrica, totalizando 15 medidas feitas ao acaso para cada espécime analisado. Ilustrações de cada espécie identificada foram feitas usando-se câmera digital Sony W5. Após análise, os exemplares foram herborizados segundo o método corrente em ficologia (Fidalgo & Bononi, 1984). As exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF).

Todos os táxons de algas verdes foram isolados e cultivados com intuito de aumentar sua biomassa. Entre as algas vermelhas, *B. moritziana* 1 e *C. ogasawaraensis* foram também cultivadas com o mesmo intuito. O cultivo foi realizado no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” – LAM do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo. Regiões apicais livres de epífitas foram colocados em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo água do mar esterilizada com 50% da solução de nutrientes von Stosch (VSES/2) modificado de Ursi & Plastino (2001), com salinidade de 15~16 UPS e pH: 8,0. Os frascos foram mantidos em câmaras de cultivo com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , irradiância de aproximadamente  $30 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e foto período de 14h claro. A troca do meio de cultivo foi feita quinzenalmente.

Para as análises moleculares, regiões apicais livres de epífitas ou indivíduos inteiros, quando diminutos, foram selecionados, secos e envoltos em papel absorvente e preservados em frascos plásticos contendo sílica-gel e mantidos em temperatura ambiente.

#### **4.2.2. Extração de DNA**

O material previamente mantido em sílica-gel foi macerado em nitrogênio

líquido em tubos do tipo Eppendorf para quebra da parede celular. Para extração do DNA das algas vermelhas foi utilizado o “kit” de extração NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), de acordo com o protocolo do fornecedor. As amostras de algas verdes foram submetidas ao protocolo manual de extração de DNA, CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), Oliveira-Carvalho *et al.* (2012), constituído pelos seguintes reagentes: água deionizada miliq, CTAB a 2%, NaCl a 5%, 0,5M de EDTA, PVP a 1% e 1M Tris-HCl com pH 8.

Após maceração em nitrogênio líquido foi adicionado 700µL do tampão CTAB, juntamente com 7µL de proteinase K (20mg/mL), previamente aquecidos em tubo de Eppendorf (1,5mL) em banho seco a 60°C. O extrato foi incubado a 60°C por 30-40 minutos em banho seco. Após este período, adicionou-se à amostra 250µL de acetato de potássio (KOAC) e conservou-se a -20°C por 30 minutos.

A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm a 4°C, por aproximadamente 30 minutos. A fase aquosa da amostra foi transferida para um novo tubo de Eppendorf, adicionando-se um volume de clorofórmio: álcool isomílico (24:1), e posteriormente centrifugada por 10 minutos. Novamente foi transferida a fase aquosa para um novo tubo, adicionando-se um volume de clorofórmio: álcool isomílico (24:1), centrifugando-se por cinco minutos. A fase aquosa da amostra foi transferida para um novo tubo de Eppendorf devidamente etiquetado, onde foi adicionado 0,8 volume de isopropanol (100%), incubando-a por um período de 30 minutos à -20°C. Após centrifugação, 14.000 rpm por 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o tubo contendo o DNA foi seco em centrífuga a vácuo durante 30 minutos. O DNA da amostra foi diluído em 50 µL de tampão 0,1 X TE (Tris 10mM, pH 8 e EDTA 1mM). Todas as amostras de DNA total foram conservadas a -20°C.

#### **4.2.3. Amplificação dos marcadores moleculares por PCR ("Polymerase Chain Reaction")**

Como “DNA barcode” para as algas vermelhas foram utilizados os marcadores COI-5P, região 5’ do gene que codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase, presente no genoma mitocondrial (Saunders 2005), e o Domínio V do gene que codifica para a subunidade 23S do ribossomo – p23SrV ou

UPA, presente no genoma do cloroplasto (Sherwood & Presting 2007). Adicionalmente foi utilizado o marcador codificante para a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), também presente no genoma do cloroplasto (Freshwater *et al.* 1994). Os marcadores COI-5P e UPA foram sequenciados para todas as amostras obtidas, enquanto o marcador *rbcL* foi sequenciado para representantes dos agrupamentos formados pelo marcador COI-5P.

Devido à inviabilidade do uso dos marcadores COI-5P e UPA, para as algas verdes foi utilizado o marcador *tufA*, proposto para “DNA Barcode” de algas verdes por Saunders & Kucera (2010). O *tufA* codifica o fator de alongação de proteínas TU, do cloroplasto (cpDNA), que atua durante a síntese de proteínas adicionando aminoácidos na cadeia a ser construída (Famà *et al.* 2002). Devido à ineficiência desse marcador para as Cladoploraes foram utilizados alternativamente o gene ribossomal nuclear SSU rDNA (18S), que codifica o RNA da subunidade pequena do ribossomo e o gene codificante 5.8S, além dos espaçadores intergênicos dos genes ribossomais ITS1 e ITS2. O gene *rbcL* (Källersjö *et al.*, 1999) também foi utilizado visando comparar com sequências disponíveis no banco de dados, GenBank.

Os “primers” utilizados na PCR para a amplificação dos marcadores moleculares estão listados na Tabela 2. Para as algas vermelhas, a amplificação do marcador COI-5P foi feita usando-se os “primers” GWSFn e GWSRx, já para a amplificação do marcador UPA foram utilizados os “primers” P23SrVF1 e P23SrVR1. Para o *rbcL* foram utilizadas as seguintes combinações de “primers”: FrbcLS-R753, F492-R1150, F993-RrbcS, gerando três fragmentos sobrepostos. Para as algas verdes, a amplificação do marcador *tufA* foi feita utilizando-se os “primers” tufAF e tufAR e, em alguns casos, tufGF4 e tufAR. Para o *rbcL* foram utilizados os “primers” *rbcL*1 e *rbcL*2, enquanto que para o marcador ITS rDNA nuclear foram utilizadas as combinações dos “primers” ITS1FL e Pana4FL e eventualmente ITS1FL e Pana5FL, e para o marcador 18S as seguintes combinações: 18S5' -536R, 530F -1055R, 1055F -18S3' gerando assim três fragmentos sobrepostos.

As condições para amplificação foram feitas para um volume final de 50 µL: 39,25µL de H<sub>2</sub>O MiliQ autoclavada, 5µL de 10X PCR Buffer do kit Invitrogen (Life Technologies™, NY, EUA), 1,5µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub> do kit Invitrogen, 1µL de dNTP

10µM preparada, 1µL de Primer F 10µM, 1µL de Primer R 10µM, 0.25 de Taq DNA Polymerase (5U/µL) do kit Invitrogen e 1µL de DNA. Em alguns casos outros, métodos de PCR foram utilizados com o PCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) ambos seguindo as orientações do fabricante.

**Tabela 2** – Relação de “primers” direto (F) e reverso (R) para os diferentes marcadores moleculares utilizados neste estudo.

Marcador	Primer	Sequência	Referência
COI-5P	GWSFn	5'-TCA ACA AAY CAY AAA GAT ATY GG-3'	Saunders <i>et al.</i> (2010)
COI-5P	GWSRx	5'-AC TTC TGG RTG ICC RAA RAA YCA-3'	Saunders <i>et al.</i> (2010)
UPA	P23SrV F1	5'-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA-3'	Sherwood & Presting (2007)
UPA	P23SrV R1	5'-TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG-3'	Sherwood & Presting (2007)
<i>rbcL</i>	FrbcL Start	5'-ATG TCT AAC TCT GTA GAA G-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	R753	5'-GCT CTT TCA TAC ATA TCT TCC-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	R492	5'-CGA CAA AAT TTA TCC ATA CG-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	F753	5'-GGA AGA TAT GTA TGA AAG AGC-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	F492	5'-CGT ATG GAT AAA TTT GGT CG-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	R1150	5'-GCA TTT GTC CGC AGT GAA TAC C-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	F993	5'-GGT ACT GTT GTA GGT AAA TTW GAA GG-3' (w=a/t)	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcL</i>	RrbcS Start	5'-GTT CTT GTG TTA ATC TCA C-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>tufA</i>	<i>tufAF</i>	5'-TGA AAC AGA AMA WCG TCA TTA TGC-3'	Famà <i>et al.</i> (2002)
<i>tufA</i>	<i>tufAR</i>	5'-CCT TCN CGA ATM GCR AAW CGC-3'	Famà <i>et al.</i> (2002)
SSU	18S5'	5'-CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T-3'	Sogin (1990)
SSU	536R	5'-GAA TTA CCG CGG CTG CTG-3'	Bird <i>et al.</i> (1992)
SSU	530F	5'-GAG GGC AAG TCT GGT G-3'	Milstein & Oliveira (2005)
SSU	1055R	5'-CGG CCA TGC ACC ACC-3'	Bird <i>et al.</i> (1992)
SSU	1055F	5'-GGT GGT GCA TGG CCG-3'	Bird <i>et al.</i> (1992)
SSU	18S3'	5'-GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG GAA-3'	Sogin (1990)
ITS	ITS1FL	5'-CCT GCG GAG GGA TCC ATA GC-3'	Leliaert <i>et al.</i> (2009)



**Tabela 3** – Continuação.

Marcador	Primer	Sequência	Referência
ITS	Pana4FL	5'-GTTTCAGCGGGTGTCCCTG-3'	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
ITS	Pana5FL	5'-GGG TGT CCC TGC CTG AAC-3'	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<i>rbcL</i>	<i>rbcL1</i>	5'--AAA GCN GGK GTW AAA GAY TA-3'	Curtis <i>et al.</i> (2008)
<i>rbcL</i>	<i>rbcL2</i>	5'-CCA ACG CAT ARA DGG TTG WGA-3'	Curtis <i>et al.</i> (2008)

As reações de PCR foram feitas nos termocicladores Techne TC-512 e Techne TC-4000 (Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK). Os ciclos da PCR utilizados para cada marcador molecular estão listados na Tabela 3.

**Tabela 4** – Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores moleculares utilizados.

Marcadores	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos	Referência
<b>COI-5P</b>	94°C por 5'	94°C por 30"	45°C por 1'	72°C por 2'	72°C por 7'	35x	Saunders (2005)
<b>UPA</b>	94°C por 2'	94°C por 20"	55°C por 30"	72°C por 30"	72°C por 10'	35x	Sherwood & Presting (2007)
<b><i>rbcL</i>-vermelhas</b>	94°C por 4'	94°C por 1'	40°C por 1'	72°C por 1'30"	72°C por 10'	35x	Freshwater <i>et al.</i> (1994)
<b><i>tufA</i></b>	94°C por 3'	94°C por 1'	45°C por 1'	72°C por 2"	72°C por 4'	40x	Barata (2008)
<b>SSU</b>	94°C por 4'	94°C por 30"	55°C por 30"	72°C por 1'30"	72°C por 7'	38x	Saunders & Moore (2013)
<b>ITS</b>	94°C por 3'	94°C por 1'	55°C por 1'	72°C por 1'30"	72°C por 3'	35x	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<b><i>rbcL</i>-verdes</b>	94°C por 4'	94°C por 30"	45°C por 1'	72°C por 1'	72°C por 7'	35x	Curtis <i>et al.</i> (2008)

Após a reação os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,7% e tampão tris-borato-EDTA (TBE: tris-HCl 50 Mm, borato 50 Mm, EDTA 2 Mm) e corados com Gel Loading Buffer (GelRed™) para verificação

do tamanho do DNA amplificado, comparando-o com o marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) através de um transluminador UV, acoplado a um sistema de fotografia digital (Kodak).

Os produtos da PCR foram purificados em colunas GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fornecedor. A quantificação do DNA amplificado foi feita por uma estimativa visual, comparando-se a concentração do DNA amplificado e purificado com a concentração de DNA da banda de 1,6Kb do marcador “1Kb DNA ladder” (Invitrogen) seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante.

#### **4.2.4. Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas**

O sequenciamento foi feito com aproximadamente 10 a 40 ng de produto de PCR purificado e com o “kit” de sequenciamento “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA) utilizando-se os mesmos “primers” da reação de PCR descritos na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 54°C por 20 seg e 60°C por 4 min. Após a reação o produto foi precipitados em EDTA 125mM, Acetato de Sódio 3M e etanol 100%, seguido de lavagem em etanol 70%, segundo recomendação da Applied Biosystems para a remoção de resíduos. O sequenciamento foi realizado nos sequenciadores automáticos ABI PRISM™ 3100 ou ABI PRISM™ 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### **4.2.5. Alinhamento e análises moleculares**

As sequências obtidas foram primeiramente comparadas com as sequências existentes no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do algoritmo BlastN. As sequências direta e reversa foram então manualmente alinhadas através do programa Sequencher® version 4.1.4 sequence analysis software, Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI EUA) ([www.genecodes.com](http://www.genecodes.com)), afim de gerar as sequências-consenso. Incongruências nas sequências foram revistas manualmente

com a análise dos cromatogramas. As sequências-consenso obtidas de todas as amostras foram alinhadas em uma matriz através do programa ClustalX ver. 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) e então revistas manualmente usando o programa BioEdit (Hall 1999).

Para os “DNA barcodes”, COI-5P e UPA, as matrizes foram construídas apenas com sequências obtidas neste estudo e aquelas gentilmente cedidas pelo Dr. Khey A. Fortes e pela MsC. Cecília H. Kano. Para o marcador *rbcl*, além das sequências obtidas neste estudo, foram utilizadas 78 do banco de dados GenBank (Tabela 4). Para todos os marcadores foram construídas árvores de agrupamento Neighbor-Joining (NJ) com 2000 réplicas de Bootstrap usando-se o programa PAUP 4.0b8 (Swofford, 2002). Para o marcador *rbcl* foram utilizados dois métodos de inferência filogenética, além do NJ: Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI). O modelo evolutivo utilizado foi determinado pelo programa MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004) usando-se o Akaike Information Criterion (AIC). A análise de Máxima verossimilhança (ML) foi feita pelo programa PhyML através do programa TOPALi (Milne *et al.*, 2004) com 100 réplicas de Bootstrap. A Inferência bayesiana (BI) foi feita utilizando-se o programa Mr.Bayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com duas corridas com quatro cadeias de Markov, 4.000.000 de gerações com amostragem a cada 100. As gerações iniciais correspondentes ao “burn-in” foram descartadas. Os “gaps” foram considerados dados ausentes e o modelo evolutivo de substituição utilizado foi o modelo GTR+I+G, onde assume-se o modelo Geral de Reversão ao longo do Tempo (GTR), com proporção de sítios invariáveis (I) e distribuição (G). As porcentagens de divergência intraespecíficas e interespecíficas foram calculadas usando-se uncorrected ‘p’ distances no PAUP.

Na publicação dos dados, as sequências obtidas nesse estudo serão depositadas nos bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Barcoding of Life Data System (BOLD), (<http://www.boldsystems.org>; Ratnasinghan & Hebert 2007).

Tabela 5 – Sequências obtidas do GenBank utilizadas nas análises moleculares.

Espécie	Número de acesso	Localidade	Referência
<b>Rhodophyta</b>			
<b><i>Bostrychia</i> Montagne</b>			
<i>B. anomala</i> J.A.West, S.Loiseaux de Goër & Zuccarello	KC768866	Kosrae, Micronésia	West <i>et al.</i> (2013)
<i>B. arbuscula</i> Harvey	JN881546	Brighton Beach, Nova Zelândia	Fraser <i>et al.</i> (2013)
<i>B. binderi</i> Harvey	KP796015	Arembepe, Bahia, Brasil	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. binderi</i>	KP796025	Maningrida, Arnhem Land, NT, Austrália	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. binderi</i>	KP796022	Batam I., Indonésia	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. calliptera</i> (Montagne) Montagne	AY920806	Sontecomapan, Vera Cruz, México	Zuccarello & West (2006)
<i>B. calliptera</i>	AY920805	Rio Sitio Grande, I. do Cardoso, SP, Brasil	Zuccarello & West (2006)
<i>B. gracilis</i> (R.J.King & Puttock) Zuccarello & J.A. West	JN881544	Nova Zelândia	Fraser <i>et al.</i> (2013)
<i>B. intricata</i> (Bory) Montagne	JN881543	Nova Zelândia	Fraser <i>et al.</i> (2013)
<i>B. kelanensis</i> Grunow	AY920853	Bowling Green Bay, QLD, Austrália	Zuccarello & West (2006)
<i>B. montagnei</i> Harvey	KP796013	Playa al Puntilla, El Salvador	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. montagnei</i>	KP796014	Isla Mendez, El Salvador	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. montagnei</i>	KP796019	Galeta, Panamá	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. montagnei</i>	KP796026	Rio Sitio Grande, I. do Cardoso, SP, Brasil	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. montagnei</i>	KP796027	Rio Sitio Grande, I. do Cardoso, SP, Brasil	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. montagnei</i>	KP796012	Playa al Puntilla, El Salvador	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. moritziana</i> (Sonder ex Kützing) J. Agardh	AY920811	Rio Guire, Edo Sucre, Venezuela	Zuccarello & West (2006)
<i>B. moritziana</i>	AY920809	Millers Landing, Wilson Promontory, Victoria, Austrália	Zuccarello & West (2006)
<i>B. moritziana</i>	AY920815	Nusa Dua, Bali, Indonésia	Zuccarello & West (2006)
<i>B. moritziana</i>	AY920816	Farasan Island, Arábia Saudita	Zuccarello & West (2006)
<i>B. moritziana</i>	AY920813	West Sawang, Sulawesi, Indonésia	Zuccarello & West (2006)
<i>B. moritziana</i>	KM502788	Farasan Island, Arábia Saudita	Muangmai <i>et al.</i> (2015)
<i>B. moritziana</i>	AY920812	Buenaventura, Colômbia	Zuccarello & West (2006)
<i>B. pilulifera</i> Montagne	AY920817	Demerara River, Guiana	Zuccarello & West (2006)
<i>B. radicans</i> (Montagne) Montagne	AY920824	Teluk Awang, Lombok, Indonésia	Zuccarello & West (2006)
<i>B. radicans</i>	AY920820	Cape Fear Estuary, Carolina do Norte, EUA	Zuccarello & West (2006)
<i>B. radicans</i>	AY920821	Estero Coyote, Bahia San Ignacio, Baja California, México	Zuccarello & West (2006)
<i>B. radicans</i>	AY920818	São Sebastião, São Paulo, Brasil	Zuccarello & West (2006)
<i>B. simpliciuscula</i> Harvey ex J. Agardh	KM502789	New South Wales, Forster, Australia	Muangmai <i>et al.</i> (2015)

Tabela 4 - Continuação

Espécie	Número de acesso	Localidade	Referência
<i>B. tenella</i> (J.V. Lamouroux) J. Agardh	KP796031	Dyaul Island, NI, Papua Nova Guine	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. tenella</i>	KP796021	Peniyak Village, Weno I., Chuuk, Micronésia	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. tenella</i>	KP796018	Initao, Misamis Oriental, Filipinas	Zuccarello <i>et al.</i> (2015)
<i>B. tenella</i>	KM502790	Mangrove Trail, Broome, Western Australia, Australia	Muangmai <i>et al.</i> (2015)
<i>B. tenella</i>	AY920837	Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil	Zuccarello & West (2006)
<i>B. vaga</i> J.D.Hooker & Harvey	JN881538	Nova Zelândia	Fraser <i>et al.</i> (2013)
<b>Caloglossa (Harvey)</b>			
G.Martens			
<i>C. apomeiotica</i> J.A.West & Zuccarello	HM775456	Bahia Balandra, México	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. apomeiotica</i>	HM775457	El Manchon, Guatemala	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. apomeiotica</i>	HM775459	Mangaratiba, RJ, Brasil	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. confusa</i> Krayesky, J.A.West & Kamiya	JN845517	Plantation, Flórida, EUA	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. confusa</i>	JN845516	I. do Cardoso, SP, Brasil	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. intermedia</i> Kamiya & J.A.West	HM775468	James Is., Carolina do Sul, EUA	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. lepriurii</i> (Montagne) G. Martens	HM775461	Isla Magueyes, La Parguera, Porto Rico	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. lepriurii</i>	HM775462	Cayenne, Guiana Francesa	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. lepriurii</i>	HM775464	Guiana Inglesa	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. lepriurii</i>	AB862557	Darwin, Dinah Beach, Austrália	Kamiya & West (2014)
<i>C. lepriurii</i>	HM775463	Isla Margarita, Venezuela	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. monosticha</i> Kamiya	HM775469	Derby, Austrália	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. ogasawaraensis</i> Okamura	JN845520	Carolina do Sul, EUA	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. ogasawaraensis</i>	JN845521	I. do Cardoso, São Paulo, Brasil	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862546	Chiba, Sakuta river, Japão	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AY150325	Austrália	Kamiya <i>et al.</i> (2004)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862541	Pueblo Viejo, Guatemala	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862556	Selangor, Banting, Morib, Malásia	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862552	Sa, Garden Is. Austrália	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862543	Ile St. Marie, Madagascar	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	AB862548	Pohnpei, Sokehs Rock, Micronésia	Kamiya & West (2014)
<i>C. ogasawaraensis</i>	HM775470	Indonésia	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<i>C. rotundata</i> Kamiya	JN845524	Baía do Panamá, Panamá	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. rotundata</i>	JN845523	Likin, Guatemala	Krayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>C. ruetzleri</i> Krayesky, S. Fredericq & J.N. Norris	HM775453	Twin Cays, Belize	Krayesky <i>et al.</i> (2011)
<b>Catenella Greville</b>			
<i>C. caespitosa</i> (Withering) L.M. Irvine	AY437661	Cultura J. West. 06/05/1993 (G0143)	Saunders <i>et al.</i> (2004)
<i>C. nipae</i> Zanardini	AY437662	Cultura J. West. 18/12/1991 (G0049)	Saunders <i>et al.</i> (2004)

Tabela 4 - Continuação

Espécie	Número de acesso	Localidade	Referência
<b>Chlorophyta</b>			
<b>Apjohnia Harvey</b>			
<i>A. laetevirens</i> Harvey	AM779624	Baron Heads, Melbourne, Austrália	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<b>Boodlea G. Murray &amp; De Toni</b>			
<i>B. composta</i> (Harvey) F.Brand (como <i>B. siamensis</i> Reinbold)	AM779626	Ilha Mactan, Filipinas	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<i>B. composta</i> (como <i>B. siamensis</i> )	AF510121	Chwaka Bay, Zanzibar, Tanzânia	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>Boodlea</i> sp. 7	FN377631	Chwaka Bay, Zanzibar, Tanzânia	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<i>Boodlea</i> sp. 13	FN377695, FN377692	Tumon Bay, Guam	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<i>Boodlea</i> sp. 13	FN377688	Tumon Bay, Guam	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<i>Boodlea</i> sp. 13	FN377685	Sawang, Siquijor, Filipinas	Leliaert <i>et al.</i> (2009)
<b>Boodleopsis A.Gepp &amp; E.S.Gepp</b>			
<i>B. pusilla</i> (Collins) W.R.Taylor, A.B.Joly & Bernatowicz	DQ469320	Cockroach Bay, Flórida, EUA	Curtis <i>et al.</i> (2008)
<b>Chamaedoris Montagne</b>			
<i>C. auriculata</i> Børgesen	AM779627	Nogid, Socotra, Yemen	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<i>C. delphinii</i> (Hariot) Feldmann & Børgesen	AM779635	Sodwana Bay, KwaZulu-Natal, África do Sul	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<i>C. peniculum</i> (J.Ellis & Solander) Kuntze	AM779637	Puerto Plata, República Dominicana	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<b>Cladophoropsis Børgesen</b>			
<i>C. membranacea</i> (Hofman Bang ex C.Agardh) Børgesen	AF510120	Próxima a Isla Grande, Panamá, Caribe	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>C. membranacea</i>	AF510113	Isla Culebra, Cidade do Panamá, Panamá (Pacífico)	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>C. membranacea</i>	AF510114	Isla Culebra, Cidade do Panamá, Panamá (Pacífico)	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>C. membranacea</i>	AF510117	Nayarit, Lo de Marcos, México	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>C. membranacea</i>	AY055861	Cane Bay, St. Croix, Ilhas Virgens,	Van Der Strate <i>et al.</i> (2002)
<i>C. membranacea</i>	AY055862	Cane Bay, St. Croix, Ilhas Virgens,	Van Der Strate <i>et al.</i> (2002)
<i>C. sundanensis</i> Reinbold	AF510142	Isla Grande, Panamá (Caribe)	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>C. sundanensis</i>	AM779640	Baía de Mnazi, Tanzania	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<b>Phyllodictyon J.E. Gray</b>			
<i>P. anastomosans</i> (Harvey) Kraft & M.J.Wynne	AF510136	Norte da Ilha de Wongat, Madang, Papua New Guinea	Wysor <i>et al.</i> (não publicado)
<i>P. anastomosans</i>	AM779641	Malta Baths, St Croix, Ilhas Virgens	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<i>Phyllodictyon gardineri</i> (A.Gepp & E.S.Gepp) Kraft & M.J.Wynne (como <i>Struvea gardineri</i> .Gepp & E.S.Gepp	AM779645	Plate Island, Seychell	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<i>P. pulcherrimum</i> J.E. Gray	AM778983	Louisiana, northwest Gulf of Mexico, EUA	Leliaert & Wysor (não publicado)
<i>P. robustum</i> (Setchell & N.L. Gardner) Leliaert & Wysor (como <i>Willeella mexicana</i> E.Y. Dawson	AM778979	Iguana Island, Panamá	Leliaert <i>et al.</i> (2008)
<i>P. robustum</i> (como <i>W. mexicana</i> )	AM778978	Perlas Islands, Santa Catalina, Panamá	Leliaert <i>et al.</i> (2008)

Tabela 4 - Continuação

Espécie	Número de acesso	Localidade	Referência
<i>P. robustum</i>	AM940054, AM943660	Puerto Penasco, Baja California, México	Leliaert <i>et al.</i> (2008)
<i>P. orientale</i> (A.Gepp & E.S.Gepp) Kraft & M.J.Wynne	AM779643	Ilha Grande Comoro, Comoros	Leliaert <i>et al.</i> (2007)
<b>Grupos externos</b>			
<b>Apoglossum J.Agardh</b>			
<i>A. ruscifolium</i> (Turner) J.Agardh	KJ960334	Brittany, Men Vriant, França	Robuchon <i>et al.</i> (não publicado)
<i>A. ruscifolium</i>	AF312310	Receira da Ilhas, Ericeira, Lisboa, Portugal	Lin <i>et al.</i> (2001)
<b>Caulacanthus Kützing</b>			
<i>C. okamurae</i> Yamada	AY437663	Cultura J. West. 06/05/1993 (G0142)	Saunders <i>et al.</i> (2004)
<b>Cladophora Kützing</b>			
<i>C. wrightiana</i> Harvey	KF595077	Gapado, Jeju Island, Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> (não publicado)
<b>Halimeda J.V.Lamouroux</b>			
<i>H. copiosa</i> Goreau & E.A.Graham	FJ624508	Discovery Bay, Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> (2009)
<b>Heterosiphonia Montagne</b>			
Rhodymeniales sp.	HQ421452	Havaí, EUA	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<b>Hypoglossum Kützing</b>			
<i>H. rhizophorum</i> D.L.Ballantine & M.J.Wynne	HQ421597	Havaí, EUA	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<b>Martensia K.Hering</b>			
<i>M. fragilis</i> Harvey	EF426604	Havaí, EUA	Sherwood & Presting (2007)
<b>Nitophyllum Greville</b>			
<i>N. adhaerens</i> M.J.Wynne	HQ421063	Havaí, EUA	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<b>Polysiphonia Greville</b>			
<i>P. howei</i> Hollenberg	HM573521	Flat Rock Beach, Isla Colon, Bocas del Toro, Panamá	Mamoozadeh & Freshwater (2012)
<i>P. howei</i>	HM573543	Bocas del Toro, Cayos Tigres, Panamá	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Sinopse dos táxons identificados

#### Rhodophyta

##### Ceramiales

##### Delesseriaceae

*Caloglossa apomeiotica* J.A. West & Zuccarello\*

*Caloglossa confusa* Krayesky, J.A. West & M. Kamiya

*Caloglossa leprieurii* (Montagne) G. Martens

*Caloglossa ogasawaraensis* Okamura

##### Rhodomelaceae

*“Bostrychia calliptera”* (Montagne) Montagne

*Bostrychia montagnei* Harvey

*Bostrychia moritziana* (Sonder ex Kützing) J.Agardh

*Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne

*Dawsonicolax bostrychiae* (A.B.Joly & Y.-Tomita) A.B.Joly & Y.-Tomita

##### Gigartinales

##### Caulacanthaceae

*Catenella caespitosa* (Withering) L.M. Irvine

#### Chlorophyta

##### Bryopsidales

##### Udoteaceae

*Boodleopsis pusilla* (F.S.Collins) W.R.Taylor, A.B.Joly & Bernatowicz

*Boodleopsis vaucherioidea* Calderón-Sáenz & Schnetter\*

##### Cladophorales

##### Boodleaceae

*“Cladophoropsis membranacea”* (Hofman Bang ex C.Agardh) Børgesen

##### Cladophoraceae

*Rhizoclonium africanum* Kützing

*Rhizoclonium riparium* (Roth) Kützing ex Harvey

\* Novas ocorrências para o Estado de São Paulo

Espécies grafadas entre aspas não foram confirmadas molecularmente.



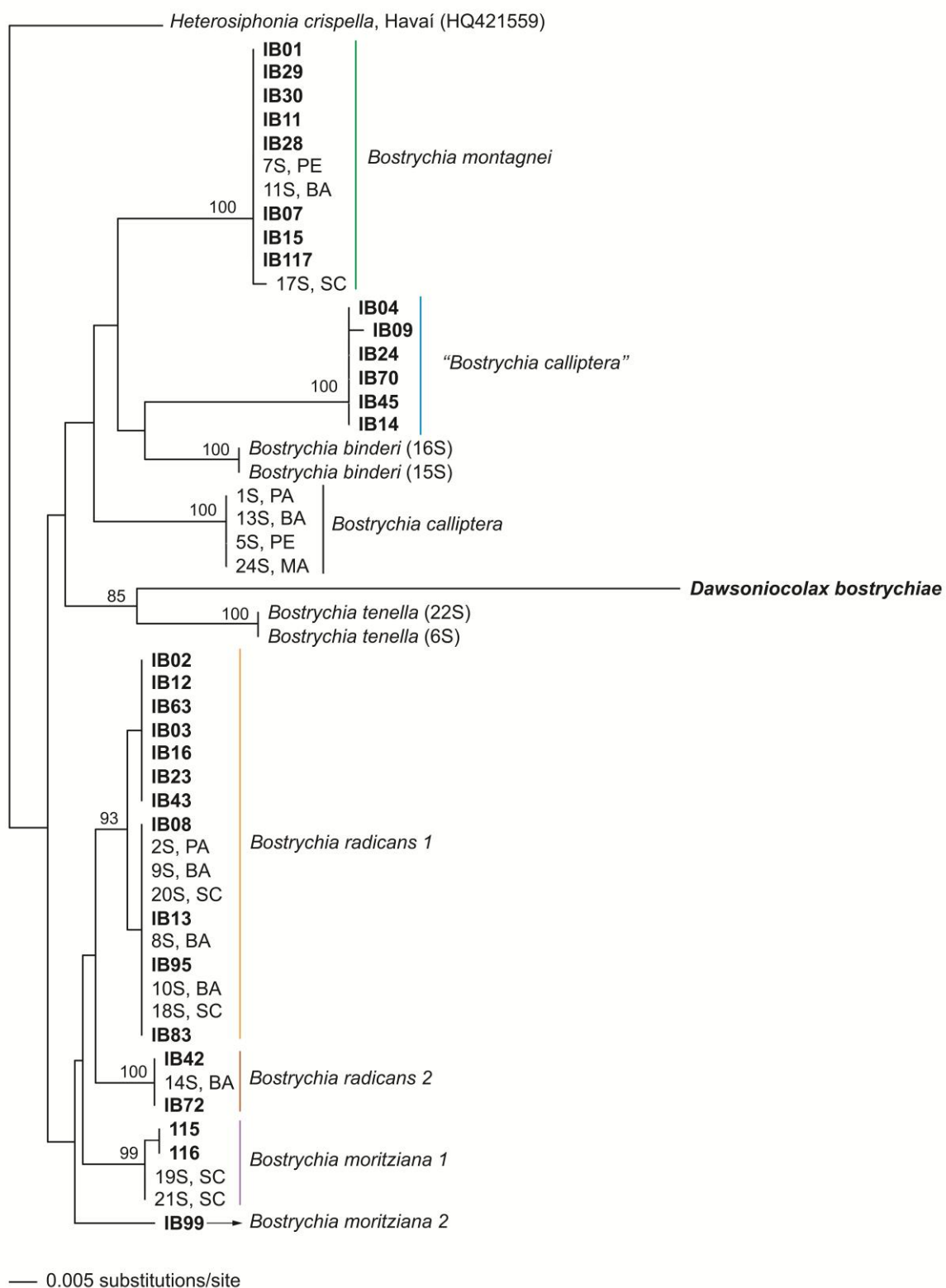
## 5.2. Análises moleculares

Foi coletado um total de 210 amostras para análises moleculares e morfológicas e identificadas 15 espécies para a área estudada, sendo dez rodófitas e cinco clorófitas. Destas, duas são novas ocorrências para o Estado de São Paulo, *Caloglossa apomeiotica* J.A. West & Zuccarello e *Boodleopsis vaucheroidea* Calderón-Sáenz & Schnetter. A partir das 210 amostras foi obtido um total de 79 sequências (Tabela 6, Apêndice A). Das 160 amostras de algas vermelhas destinadas à biologia molecular foram obtidas 75 sequências, sendo 42 para o marcador UPA, 15 para o marcador COI-5P, 17 para o *rbcL* e duas para o marcador SSU rDNA. Para 50 amostras de algas verdes coletadas foram obtidas apenas quatro sequências, sendo duas para o marcador ITS rDNA nuclear, duas para o *rbcL*.

## 5.3. Rhodophyta

### 5.3.1. Gênero *Bostrychia* Montagne e sua parasita *Dawsoniocolax bostrychiae* (A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita) A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita

Para a análise molecular com o marcador UPA para os gêneros *Bostrychia* e sua parasita *Dawsoniocolax* A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita foi gerada uma matriz com 52 sequências, sendo 32 obtidas neste estudo, 19 por Fontes (2012) e uma sequência de Dasyaceae do GenBank, usada como grupo externo, *Heterosiphonia crispella* (C. Agardh) M.J. Wynne (HQ421559). O alinhamento final consistiu em 369 pares de base (pb). A árvore de NJ é mostrada na Figura 5. Oito agrupamentos foram resolvidos com valores de suporte altos a moderados, excetuando a parasita *Dawsoniocolax bostrychiae* (A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita) A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita que se agrupou com duas sequências de *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh de Fontes (2012) com valor de bootstrap de 85%. A amostra IB99, *Bostrychia moritziana* 2 obtida neste estudo, manteve-se em um ramo isolado, divergente de 2,7% (10 pb divergentes) a 2,9% (11 pb) do agrupamento formado por amostras de *B. moritziana* 1, obtidas neste estudo e por Fontes (2012), as quais formaram duas linhagens genéticas distintas.



**Figura 5** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Bostrychia*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e número de acesso.

As amostras de *B. montagnei* formaram um único agrupamento com as de Fontes (2012) com alto suporte (100%) e baixa divergência intraespecífica (0%-0,27%, 1 pb). Por outro lado, nossas amostras identificadas como "*B. calliptera*" com base na morfologia, não se agruparam com as sequências de *B. calliptera* de Fontes (2012) e formaram dois agrupamentos distintos, ambos com alto suporte (100%). As amostras denominadas de "*B. calliptera*" apresentaram baixa divergência intraespecífica (0% - 0,27%). A divergência entre "*B. calliptera*" e *B. calliptera* (Fontes 2012) foi alta, variando de 6,5% (24 pb) a 6,7% (25 pb).

As amostras de *Bostrychia radicans* formaram duas linhagens genéticas distintas pelo marcador UPA. As amostras denominadas de *Bostrychia radicans* 1 se dividiram em dois sub-grupos: o primeiro, com sequências 100% idênticas, formado apenas por amostras obtidas neste estudo, e o segundo também com amostras 100% idênticas, formado por amostras deste estudo e de Fontes (2012). A divergência entre esses dois subgrupos foi baixa, 0,5% (2 pb). Por outro lado, as amostras denominadas de *B. radicans* 2 formaram um agrupamento distinto e divergiram de *B. radicans* 1 em 1,9%.

A divergência intraespecífica para as amostras de *Bostrychia* com o marcador UPA variou de 0,27% a 1,9% (7 pb), com a maior divergência encontrada entre as linhagens de *B. radicans* 1 e *B. radicans* 2, enquanto a divergência interespecífica variou de 2,4% (9 pb, entre *B. moritziana* 2 e *B. radicans* 2) a 7,3% (27 pb, entre *B. moritziana* 2 e "*B. calliptera*"). Portanto, a divergência encontrada entre os agrupamentos *B. moritziana* 1 e 2 (2,7% a 2,9%) está na faixa de variação interespecífica observada para este marcador.

A faixa de variação de divergência intraespecífica observada neste estudo para o marcador UPA (0,27% a 1,9%) está de acordo com a divergência encontrada para espécies de *Bostrychia* por Fontes (2012), 0,3%. Da mesma forma, a divergência interespecífica observada (2,4% a 7,3%), encontra-se na faixa de variação verificada por Fontes (2012) para *Bostrychia* (2% a 5,9%) e por Nauer *et al.* (2014) para o gênero *Hypnea* J.V. Lamouroux (2,5% a 4,4%).

Como observado pelos nossos resultados, assim como Fontes (2012), não há sobreposição entre os valores de divergência intra- e interespecífica para o marcador UPA, ao contrário do verificado para Halymeniaceae por Yang & Kim (2014).

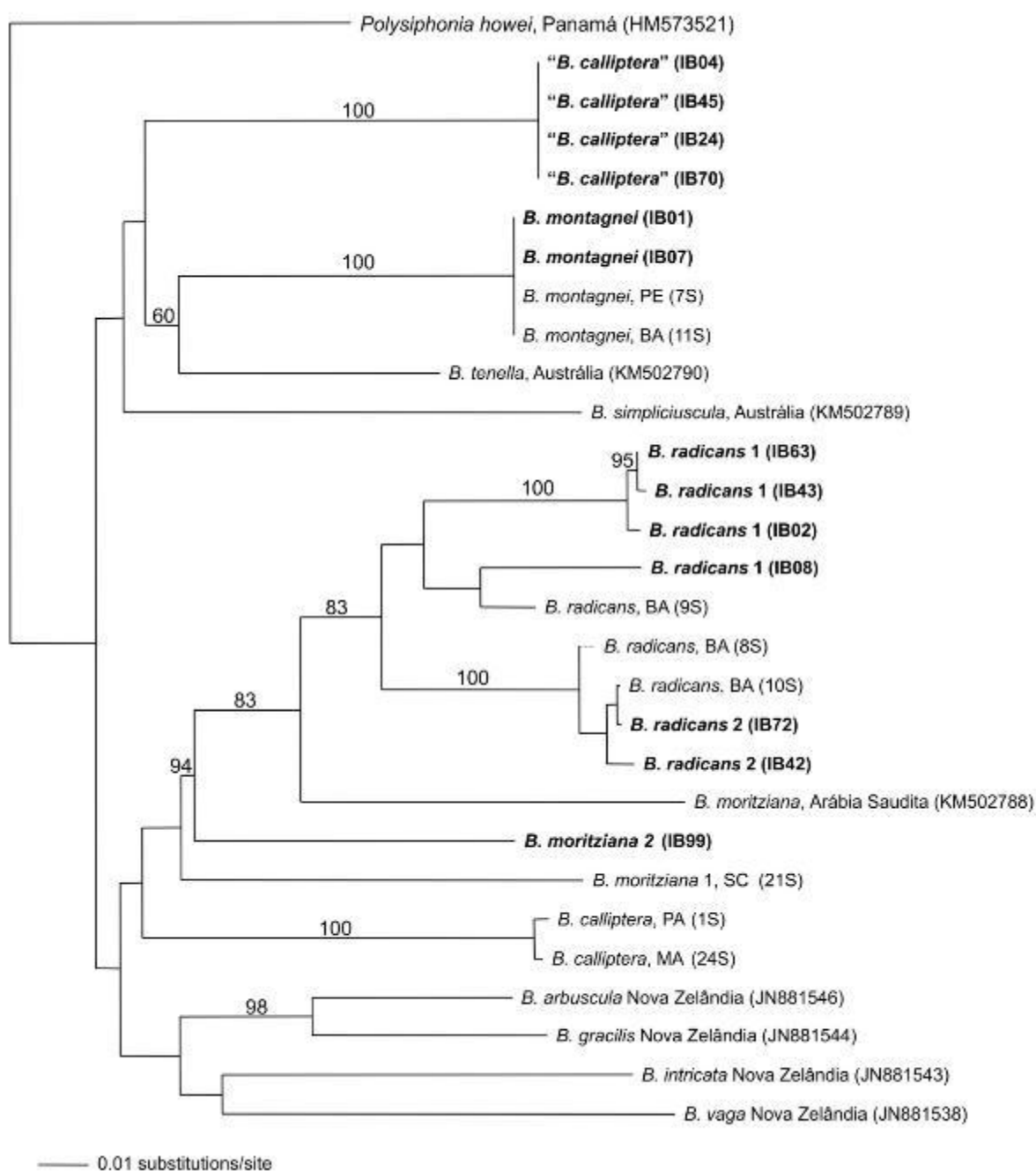
A análise com o UPA claramente mostrou que a parasita *Dawsoniocolax bostrychiae* se posiciona dentro do gênero *Bostrychia*, porém a sequência obtida não agrupou com as sequências de seus hospedeiros sobre os quais foi observada, “*B. calliptera*”, *B. montagnei* e *B. radicans* 2.

Para a análise com o marcador COI-5P foram geradas 13 sequências do gênero *Bostrychia* e não foi possível obter sequências da parasita *D. bostrychiae* para esse marcador e *B. moritziana* 1. O COI-5P mostrou-se um marcador de difícil amplificação e alto índice de contaminação e, portanto, com taxa de sucesso muito menor do que o UPA. As dificuldades na amplificação do COI-5P, como amplificação de contaminantes e a necessidade de uso de várias combinações de primers já foram relatadas nos trabalhos de Clarkston & Saunders (2010) e Milstein *et al.* (2012).

Para a análise do COI-5P para o gênero *Bostrychia* foi gerada uma matriz com 29 sequências, 13 deste estudo, oito de Fontes (2012) e oito provenientes do GenBank, sendo *Polysiphonia howei* Hollenberg (HM573521) usada como grupo externo. A matriz teve um alinhamento final de 663 pb. A árvore de NJ é mostrada na Figura 6.

Para as sequências geradas neste estudo foram observados os mesmos agrupamentos genéticos produzidos com o UPA, para a maioria dos táxons, todos com alto suporte (100%), sendo eles: *B. montagnei*, “*B. calliptera*”, *B. moritziana* 2, sendo exceção as amostras de *B. radicans* que foram divididas em três agrupamentos distintos. Para o táxon *B. moritziana* 1 não foi possível obter sequências de COI-5P. Um outro agrupamento foi formado por quatro espécies, *B. arbuscula* Harvey, *B. gracilis* (R.J. King & Puttock) Zuccarello & J.A. West, *B. intricata* (Bory) Montagne e *B. vaga* J.D. Hooker & Harvey da Nova Zelândia, que parecem ser restritas ao Hemisfério Sul e apresentam morfologia “*Stictosiphonia*” (King & Puttock, 1989).

As amostras de *B. montagnei* foram 100% idênticas (Fontes 2012, este estudo). Igualmente ao observado com o UPA, os espécimes com morfologia “*B. calliptera*” são 100% idênticos e não se agruparam com *B. calliptera* de Fontes (2012), apresentando divergência genética variando de 16,7% (111 pb) a 17% (112 pb).



**Figura 6** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as seqüências do marcador COI-5P para o gênero *Bostrychia*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As seqüências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a seqüência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e número de acesso.

As amostras de *B. radicans* formaram três sub-grupos monofiléticos com 83% de valor de bootstrap. As amostras denominadas de *B. radicans* 1 se dividiu em dois agrupamentos, porém sem suporte. As amostras IB02, IB43 e IB63 apresentaram

baixa divergência intraespecífica (0,1%, 1 pb - 0,4%, 3 pb.) O outro agrupamento, sem suporte, formado pelas amostras IB08 (este estudo) e 9S (Fontes 2012) apresentou divergência genética de 4,2% (29 pb). Um terceiro agrupamento com 100% de suporte foi formado por duas sequências de Fontes (2012) (8S e 10S) que se agruparam com *B. radicans* 2 deste estudo. Essas amostras de Fontes (2012) se mantiveram no agrupamento de *B. radicans* 1 na análise de UPA. A divergência genética desse terceiro agrupamento variou de 0,1% (1 pb, entre as amostras IB72 e 10S) a 1,0% (7 pb, entre as amostras IB42 e 8S).

A divergência genética entre esses três agrupamentos de *B. radicans* variou de 6,9% (46 pb, entre IB08 e IB63) a 11,9% (79 pb, entre IB02 e IB42). Comparando com as análises feitas com o UPA percebe-se claramente que três linhagens genéticas foram segregadas a partir do COI-5P, enquanto somente duas linhagens foram observadas com o UPA. A amostra *B. moritziana* 2 (IB99) permaneceu em um ramo isolado como uma linhagem independente, assim como pelo UPA, não se agrupando com a sequência de *B. moritziana* de Fontes (2012) nem com a disponível do GenBank.

A divergência intraespecífica de *Bostrychia* para o COI-5P variou de 0,1% a 11,9%, considerando as linhagens genéticas de *B. radicans*. Fontes (2012) encontrou uma faixa de variação intraespecífica para *B. radicans*, dentro de uma mesma linhagem, entre 1,6% a 6,2%. A divergência intraespecífica verificada por Fontes (2012) para outras espécies de *Bostrychia* não ultrapassou 0,5%.

A divergência interespecífica entre todas as amostras analisadas variou de 11,9% entre *B. radicans* (9S) (Fontes 2012, Brasil) e *B. moritziana* (Arábia Saudita, KM502788) a 23,4% (155 pb), entre *B. vaga* (Nova Zelândia, JN881538) e *B. moritziana* (Arábia Saudita). Desta forma, percebe-se a alta divergência observada entre as linhagens brasileiras de *B. radicans* procedentes das regiões sudeste e nordeste do Brasil, que apresentam um limite máximo de divergência intraespecífica (11,9%) sobrepondo-se ao limite mínimo de divergência interespecífica (11,9%), observado entre amostras dos Oceanos Índico e Pacífico.

A divergência interespecífica para o COI-5P para o gênero *Bostrychia* (11,9% a 23,4%) mostrou uma maior amplitude de variação quando comparada ao encontrado por Fontes (2012) (12,3% a 19,8%). Essas faixas de variação são comparáveis ao observado por Nauer *et al.* (2014) para o gênero *Hypnea* (10,1%-16,3%), entretanto,

está bem acima das divergências interespecíficas para o COI-5P descritas por Costa *et al.* (2012) para *Gracilaria* (5,8%-6,5%) e por Iha *et al.* 2015 para *Gelidium* (5,8-6,2%).

Após as análises de agrupamento geradas pelos marcadores moleculares do tipo “DNA barcode”, foram selecionadas amostras representativas de cada agrupamento para o sequenciamento do marcador filogenético *rbcL*.

Para a análise com o *rbcL* foram geradas 10 sequências completas mais a região espaçadora (~1550pb) para o gênero *Bostrychia*. Não foi possível obter sequências para os táxons “*B. calliptera*”, *B. moritziana* 1 e para a parasita *D. bostrychiaae*. Esse marcador foi de difícil amplificação e ocorreu uma elevada incidência de contaminação em amostras de diferentes espécies de *Bostrychia*, especialmente em “*B. calliptera*”, o que inviabilizou a obtenção de sequências.

Para a análise com o *rbcL* foi gerada uma matriz com 47 sequências, sendo oito de Fontes (2012) e 29 procedentes do GenBank, além das 10 obtidas neste estudo. A amostra *Polysiphonia howei* (HM573543) foi usada como grupo externo, gerando um alinhamento final de 1244 pb. A árvore consenso de BI é mostrada na Figura 7.

Cinco agrupamentos foram resolvidos com altos valores de suporte, formados pelas espécies, *B. binderi* Harvey, *B. calliptera*, *B. tenella* e *B. montagnei*, e um agrupamento formado por amostras do complexo *B. radicans/B. moritziana* de diferentes localidades dos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Dois grandes clados foram formados, um deles incluindo representantes com cladohaptera e outro com representantes com peripherohaptera (Fig. 7), diferentes tipos de estruturas de fixação que serão discutidos mais adiante.

As amostras de *B. montagnei* geradas neste estudo para o marcador *rbcL* foram 100% idênticas, igualmente ao observado com o UPA e COI-5P, e agruparam-se com amostras do Brasil do GenBank, de El Salvador (Oceano Pacífico) e do Panamá (Galeta, Mar do Caribe, Oceano Atlântico), com 100% de suporte para todas as análises. Nossas amostras são idênticas à sequência do Caribe, e todas divergiram da sequência do Pacífico em apenas 0,17% (2 pb). O clado *B. montagnei* apresentou divergência intraespecífica variando de 0% a 0,8% (11 pb), cuja maior divergência é referente as amostras brasileiras de Fontes (2012).

A amostra *B. moritziana* 2 (IB99) agrupou-se com *B. moritziana* da Arábia Saudita (AY920816), com 100% de suporte em todas as análises, e com uma divergência genética de 1,5% (21 pb). A amostra de *B. moritziana* deste estudo, bem como as de Fontes (2012) e as demais sequências provenientes do GenBank, não se agruparam com a sequência da localidade-tipo, Venezuela (AY920811). A divergência genética entre todas as amostras de *B. moritziana* variou de 0,1% (1 pb) a 11,7% (166 pb).

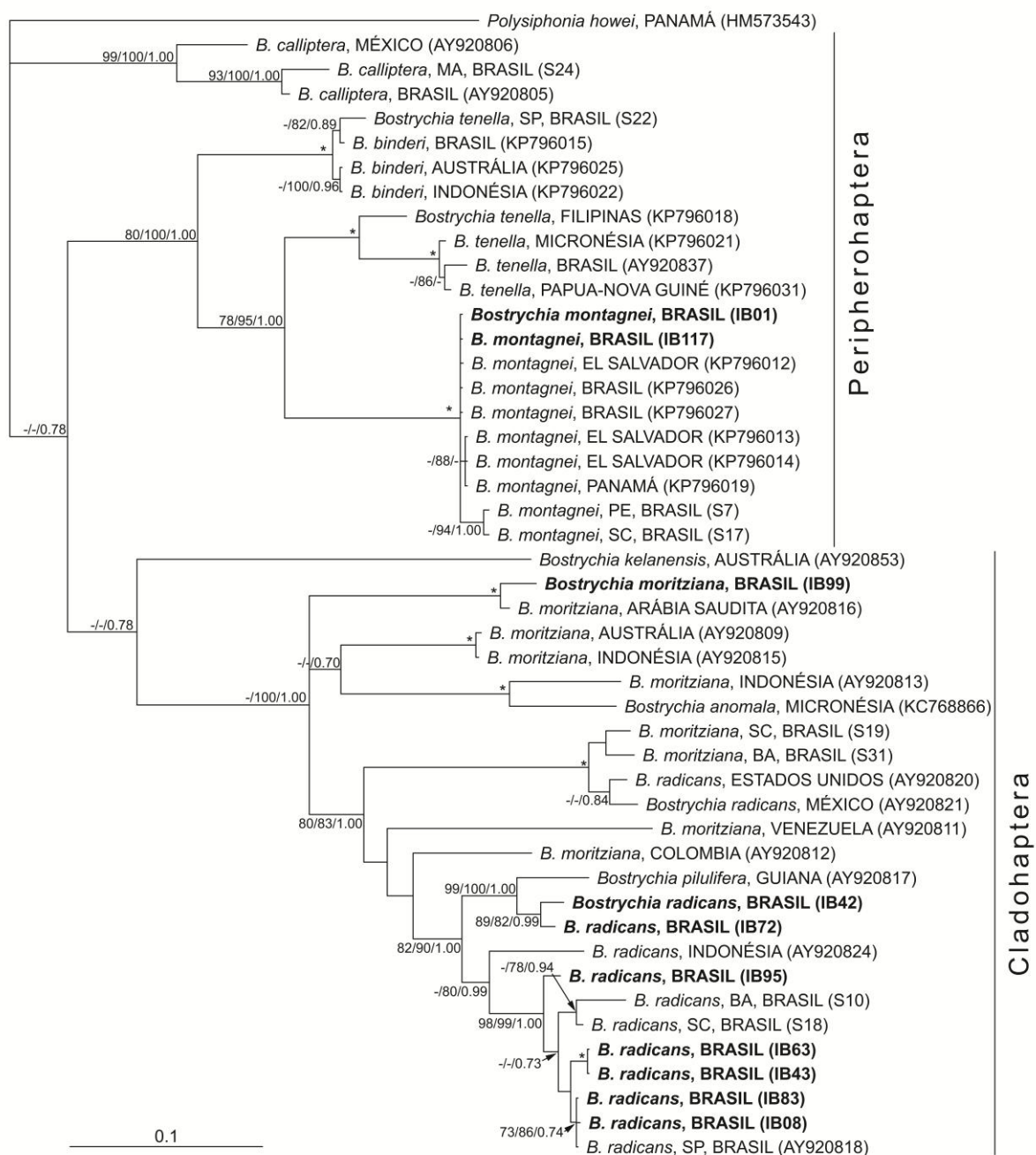
As amostras denominadas de *B. radicans* 1 e *B. radicans* 2 formaram três agrupamentos. As nossas amostras IB42 e IB72 denominadas *B. radicans* 2 agruparam-se com *B. pilulifera* Montagne da Guiana (AY920817), e a divergência genética deste grupo variou de 1,3% (18 pb) a 3,8% (54 pb). A amostra IB95, que se agrupou com as demais *B. radicans* 1 pelo UPA, permaneceu em um ramo isolado pelo *rbcL* e divergiu das demais em 1,4% (19 pb) -1,8% (25 pb).

As amostras denominadas *B. radicans* 1 (IB08, IB43, IB63, IB83) formaram um agrupamento com uma sequência do Brasil (São Sebastião, São Paulo), proveniente do GenBank (AY920818). A divergência entre as amostras desse agrupamento variou de 0% a 0,8%. Duas amostras de *B. radicans* de Fontes (2012) (S10 e S18) se agruparam com as nossas e com a do GenBank e divergiram de 0,4% (7 pb) a 3,1% (44 pb). A divergência genética entre todas as amostras de *B. radicans* variou de 0,4% a 11,5% (163 pb).

A divergência interespecífica para *Bostrychia* encontrada por Fontes (2012) para o *rbcL* (9,1% a 22,5%) mostrou uma amplitude de variação maior do que o observado nos nossos resultados. Para outros gêneros de algas vermelhas foram observadas amplitudes de variação menores, como, por exemplo, para *Hypnea* (3.2%-6.8%, Nauer *et al.* 2014, 2015) e *Gelidiella* (5,4%-7,5%, Iha 2014),

A divergência interespecífica entre todas as amostras analisadas variou de 7,3% (104 pb) entre *B. radicans* 2 do Brasil (IB42) e *B. moritziana* da Indonésia (AY920815) a 15,6% (222 pb) entre *B. tenella* do Brasil (AY920837) e *B. radicans* do Brasil (S10) (Fontes 2012). Desta forma, percebe-se a alta divergência genética do complexo *B. radicans/B. moritziana* cuja amplitude de variação para as duas espécies se sobrepõe à divergência interespecífica observada para outras espécies de *Bostrychia*.





**Figura 7** - Árvore consenso de (BI) para as sequências de *rbcL* das espécies de *Bostrychia*. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap para as análises de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência bayesiana (BI). Valores menores que 70% (ou .70 probabilidade) estão representados como (-). Asterisco (\*) indica suporte total para todas as análises. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso.

O gênero parasita *Dawsoniocolax* foi descrito por Joly & Yamaguishi-Tomita (1967) como *Dawsoniella* A.B. Joly & Yamaguishi-Tomita, nome ilegítimo (non *Dawsoniella* Hollenberg 1967). Mais tarde, visando corrigir essa homonímia, os

autores estabeleceram o gênero monoespecífico *Dawsoniocolax*. A única espécie descrita até hoje para o gênero, *D. bostrychiae*, cuja localidade tipo é São Paulo, Brasil, foi originalmente descrita como uma aloparasita de *B. radicans*, *B. montagnei* e *B. calliptera*, uma vez que a espécie foi alocada primeiramente na família inteiramente parasita, Choreocolacaceae, Gigartinales. Guimarães (1993), que estudou o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo desta espécie a partir de material coletado no Espírito Santo e São Paulo, encontrou *D. bostrychiae* parasitando *B. moritziana*, além de *B. radicans*, nos manguezais dos rios Piraquê-Açu (ES) e Sítio Grande, Ilha do Cardoso (SP). Fora o Brasil, a espécie é citada apenas para a Austrália, crescendo sobre *B. radicans* (West & Calumpong, 1988, King & Puttock 1989).

A especificidade da parasita com seus hospedeiros foi avaliada por Zuccarello & West (1994) a partir de material coletado na Ilha do Cardoso. Nos experimentos de cultura desenvolvidos, *D. bostrychiae* foi capaz de crescer apenas em *B. radicans*. Como, de acordo com Guimarães (1993), espécimes de *D. bostrychiae* não foram mais encontrados sobre *B. montagnei* e *B. calliptera* até aquela data e, em cultura, a parasita não foi capaz de crescer sobre essas duas espécies, Zuccarello & West (1994) levantaram a hipótese de que a obra original foi baseada em erros de identificação dos hospedeiros. Entretanto, nossos resultados indubitavelmente refutam essa hipótese, uma vez que a parasita foi encontrada também crescendo sobre "*B. calliptera*".

Zuccarello *et al.* (2004) realizaram análises filogenéticas de parasitas da família Choreocolacaceae, com base no gene nuclear SSU rRNA para os gêneros, *Holmsella* Sturch (parasita de *Gracilaria* Greville e *Gracilariopsis* E.Y. Dawson); *Harveyella mirabilis* (Reinsch) F. Schmitz & Reinke e a hiperparasita *Gonimophyllum skottsbergii* Setchell (parasitas de *Polysiphonia* Greville e *Odonthalia* Lyngbye); *Choreocolax polysiphoniae* Reinsch e *Leachiella pacifica* Kugrens (parasitas de *Polysiphonia*) e *Bostrychiocolax australis* Zuccarello & West e *Dawsoniocolax bostrychiae* (parasitas de *Bostrychia*). Os resultados obtidos por Zuccarello *et al.* (2004) demonstraram que todas as parasitas estudadas se agruparam nas famílias de seus respectivos hospedeiros e, portanto, *D. bostrychiae* foi alocada na tribo Bostrychiae, Rhodomelaceae. Assim, Choreocolacaceae não é mais uma família reconhecida taxonomicamente desde Zuccarello *et al.* (2004).

Outras espécies parasitas da família Rhodomelaceae também tem sido investigadas sob uma abordagem molecular. Kurihata *et al.* (2010) usando sequências parciais dos genes nucleares SSU e LSU rRNA e o marcador COI-5P verificaram que a parasita de *Laurencia* J.V. Lamouroux, *Janczewskia hawaiiiana* K.E. Apt se manteve dentro de tribo Laurencieae, posicionada em *Laurencia sensu stricto* em todas as análises, mas não estreitamente relacionada com seu hospedeiro, *L. mcdermidiae* I.A. Abbott; enquanto que os gêneros *Benzaitenia* Yendo e *Ululania* K.E. Apt & K.E. Schlech, parasitas de *Chondria* Link, se posicionaram dentro da tribo Chondrieae.

De acordo com Zuccarello *et al.* (2004), aproximadamente 80% das parasitas de algas vermelhas são estreitamente relacionadas com seus hospedeiros, estando taxonomicamente dentro da mesma tribo ou família, com base em características morfológicas e/ou reprodutivas, sendo denominados de adelfoparasitas (Goff 1982). Os dados moleculares tem corroborado essa afirmação, cujas parasitas se agrupam nos mesmos clados que seus gêneros hospedeiros, como verificado para as parasitas de *Laurencia* e *Chondria* (Kurihata *et al.* 2010) e para *D. bostrychiae* posicionada dentro do gênero *Bostrychia* (Zuccarello *et al.* 2004, este estudo).

As relações filogenéticas entre as parasitas e seus hospedeiros, e caracteres morfo-anatômicas compartilhados entre eles (Fujii & Guimarães 1999, Le Gall & Saunders 2010, Zuccarello *et al.* 2004, Kurihata *et al.* 2010) indicam ser razoável a transferência nomenclatural de espécies de parasitas para seus gêneros hospedeiros, como feito por Le Gall & Saunders (2010) com a espécie parasita *Ceratocolax hartzii* Rosenvinge transferida para seu gênero hospedeiro *Coccotylus* (*Coccotylus hartzii* (Rosenvinge) L. Le Gall & G.W. Saunders), cujas sequências de COI-5P foram curiosamente idênticas. Uma posição mais conservadora tem sido adotada para as demais espécies parasitas mencionadas acima, que apesar de seu posicionamento filogenético, têm sido mantidas em gêneros independentes de seus respectivos hospedeiros.

Análises moleculares mais aprofundadas com obtenção de sequências de *D. bostrychiae* para outros marcadores são necessárias para esclarecer seu posicionamento filogenético.

Aspectos de *D. bostrychiae* são mostrados na Figura 9A-C. Detalhes morfológicos vegetativos e reprodutivos de *D. bostrychiae* são fornecidos por Guimarães (1993).

O gênero cosmopolita, *Bostrychia* é um dos mais bem conhecidos gêneros de algas vermelhas associado a manguezais de todo o mundo (King & Puttock 1989, West *et al.* 2013). O gênero também habita costões rochosos com ampla distribuição em águas tropicais e temperadas-quentes nos Hemisférios Sul e Norte, sendo ainda encontrado em regiões temperadas-frias e subantárticas onde manguezais estão ausentes (Fontes 2012, Muangmai *et al.* 2014, Zuccarello *et al.* 2015).

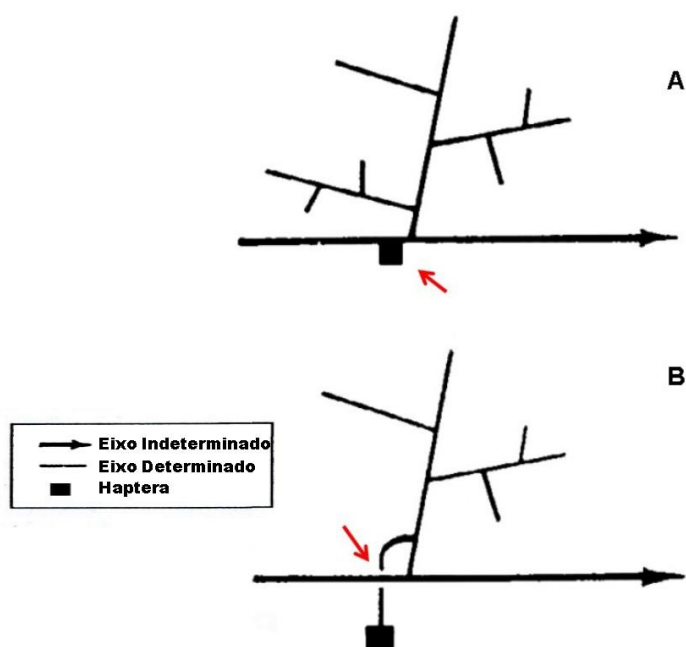
O gênero compreende 142 espécies e categorias infraespecíficas, sendo 38 aceitas taxonomicamente (M.D. Guiry in Guiry & Guiry 2015). O litoral brasileiro abriga atualmente oito espécies: *B. binderi*, *B. calliptera*, *B. kelanensis* Grunow, *B. montagnei*, *B. moritziana*, *B. pilulifera*, *B. radicans* e *B. tenella* (Joly 1965, Ugadim 1976, Cordeiro-Marino 1978, Fontes 2012, Fujii & Cassano 2015, Zuccarello *et al.* 2015).

A taxonomia do gênero *Bostrychia* tem sido frequentemente avaliada com base em dados moleculares, acarretando mudanças nomenclaturais e rearranjos das circunscrições genéricas dentro da subfamília Bostrychieae (Zuccarello & West 2002, 2003, 2006, 2008, Zuccarello *et al.* 1999a, b, 2006, 2011, 2015, Muangmai *et al.* 2015, West *et al.* 2013). Os estudos têm demonstrado que o gênero é polifilético (Zuccarello & West 2006) e possui uma alta diversidade específica, muito maior do que previamente se supunha (Zuccarello *et al.* 2015). Muitas espécies são crípticas (linhagens intraespecíficas geneticamente diferentes) (Zuccarello & West 2006, Zuccarello *et al.* 2011, 2015, West *et al.* 2013, Muangmai *et al.* 2014), sendo tratadas com complexos de espécies, como o complexo *Bostrychia calliptera/B. pinnata* J. Tanaka & Chihara, esta última tratada atualmente como sinônimo de *B. calliptera* (Zuccarello & West 2002, 2006), o complexo *B. radicans/B. moritziana* (Zuccarello *et al.* 2006, West *et al.* 2013) e o complexo *B. binderi/B. tenella/B. flagellifera* (King *et al.* 1988, Zuccarello *et al.* 2015).

Morfologicamente, as características empregadas na separação de espécies de *Bostrychia* incluem: tipo de hapteron desenvolvido para a fixação dos talos, padrão de ramificação e número de ordem de ramos, presença ou ausência de corticação nos eixos principais, presença e extensão de monossifonia ou polissifonia nos râmulos de última ordem, forma dos ápices (completamente, raramente ou nunca recurvados), diâmetro dos ramos laterais de primeira ordem, número de camadas de células pericentrais por célula axial, número de células pericentrais por célula axial, estrutura

e tamanho das células, forma e tamanho dos estiquídios e dos cistocarpos (Falkenberg 1901, King & Puttock 1989, Zuccarello & West 2008, Fontes 2012).

A fixação dos talos em espécies de *Bostrychia* é feita por dois tipos distintos de hapteron, denominados de cladohapteron e peripherohapteron. O hapteron é formado por prolongamentos rizoidais multicelulares justapostos originados a partir de células axiais, pericentrais ou corticais, que funciona como um ramo especializado para fixação secundária (King & Puttock 1989, Zuccarello & West 2006). O tipo cladohapteron se origina a partir da proliferação de células axiais, pericentrais ou corticais na extremidade de ramos vegetativos de crescimento determinado (*B. moritziana*, *B. pilulifera* e *B. radicans*) ou indeterminado (*B. kelanensis*), enquanto o tipo peripherohapteron se origina a partir de células pericentrais ou corticais do eixo principal no lado ventral do talo (*B. calliptera*, *B. montagnei* e *B. tenella*) (King & Puttock 1989, Fontes 2012). De forma simplificada, peripherohaptera são ramos adventícios, enquanto cladohaptera são derivados da extremidade de ramos vegetativos modificados (Zuccarello & West 2006). (Fig.8).



**Figura 8** - Representação esquemática do desenvolvimento do haptera em *Bostrychia*. Seta vermelha indica local de desenvolvimento do haptera. A – Peripherohaptera. B – Cladohaptera. Modificado de King & Puttock (1989).

De acordo com Fontes (2012), dentre as características morfológicas empregadas na taxonomia do grupo, listadas acima, o tipo de hapteron e o padrão de ramificação possuem valor diagnóstico para a separação entre espécies de *Bostrychia*; por outro lado, ramos monossifônicos de última ordem e número de células pericentraes por célula axial foram considerados caracteres secundários.

O valor diagnóstico do tipo de hapteron já havia sido reconhecido desde Post (1936), que dividiu as espécies do gênero em duas seções: Flagellifulcrateae (abriga espécies com cladohapteron) e Ramifulcrateae (abriga espécies com peripherohapteron). Essa é a única característica morfológica que tem sido sustentada por dados moleculares como efetiva na separação entre espécies de *Bostrychia*. Análises moleculares com diferentes marcadores, como 26S rRNA e *rbcl* (Zuccarello & West 2006), UPA, COI-5P e *rbcl* (Fontes 2012) agrupam espécies com um ou outro tipo de estrutura de fixação. O mesmo resultado foi verificado neste estudo para os três marcadores utilizados, nos quais táxons com peripherohapteron formaram um agrupamento claramente separado daqueles com cladohapteron. Zuccarello & West (2006), apoiados por seus dados moleculares, endossaram as duas seções propostas por Post (1936), Ramifulcrateae e Flagellifulcratae, baseadas morfológicamente nos tipos de hapteron.

Dentre as mudanças na taxonomia feitas para esse grupo com base em dados moleculares, destaca-se a sinonímia do gênero *Stictosiphonia* J.D. Hooker & Harvey (1847) [com uma única espécie citada para o Brasil, *S. kelanensis* (Grunow ex E.Post) R.J.King & Puttock] com *Bostrychia* Montagne (1842), efetuada por Zuccarello & West (2006), com base em sequências parciais do 26S rRNA e *rbcl*. O gênero *Stictosiphonia* foi restabelecido por Falkenberg (1901) com base no número de células em coluna derivadas da célula periaxial (3-5 células em coluna por célula periaxial em *Stictosiphonia* e 2 células em coluna por célula periaxial em *Bostrychia*) (King & Puttock 1989). Destaca-se ainda, o restabelecimento recente de *B. binderi* como uma espécie independente, segregada de *B. tenella* com base em quatro marcadores moleculares, *rbcl*, LSU, espaçador da Rubisco (*rbcl*-S) e espaçador *cox2-3* (Zuccarello *et al.* 2015). Fontes (2012), em sua tese de doutorado, já havia sugerido que *B. binderi* deveria ser reconhecida como uma entidade taxonômica diferente de *B. tenella*, com base em sequências do UPA, COI-5P e *rbcl*. *Bostrychia binderi* e *B. tenella* são diferenciadas principalmente pela extensão da polissifonia nos ramos de

última ordem, sendo em *B. binderi* os ramos laterais de última ordem inteiramente ou parcialmente polissifônicos, enquanto que em *B. tenella* inteiramente monossifônicos (Post 1933, 1939, Joly 1965, Cordeiro-Marino 1978, Fontes 2012, Zuccarello *et al.* 2015). As duas espécies foram sinonimizadas por King *et al.* (1988) com base em dados morfológicos que indicavam uma variação na distribuição e comprimento dos ramos laterais monossifônicos que não distinguiam claramente *a priori* *B. binderi* de *B. tenella*.

*Bostrychia calliptera* é caracterizada por apresentar talo delicado com ápices nunca recurvados, estrutura de fixação do tipo peripherohapteron, ramificação alternodística com 1-3 ordens de ramos, a raramente irregular na porção basal, talo com pseudocorticação por filamentos rizoidais nos eixos prostrados, presente apenas na região do peripherohapteron e corticado no eixo principal (com 1-2 ordens de corticação), talo inteiramente polissifônico, inclusive os râmulos de última ordem; ramos laterais, longos, simples ou ramificados subdicotomicamente junto ao ápice (Joly 1954, Cordeiro-Marino 1978, Fontes 2012).

Os exemplares denominados nesse estudo como “*B. calliptera*” morfológicamente compartilham com *B. calliptera* descrita por Joly (1954), Cordeiro-Marino (1978) e Fontes (2012), o tipo de estrutura de fixação, o padrão de ramificação alternodística, a ausência de ramos recurvados e a inteira polissifonia do talo (Fig. 10A-C). Entretanto, nossos exemplares são menores e mais delicados, e não há qualquer tipo de corticação ou pseudocorticação nesses espécimes. Apesar dessas diferenças morfológicas, consideradas de pouco valor diagnóstico (King *et al.* 1988, Zuccarello & West 2002), os resultados moleculares com o UPA e COI-5P sem dúvida apontam a clara separação desses dois táxons, que não se agruparam em nenhuma análise, e mostraram alta divergência genética, 6,5% a 6,7% para o UPA e 16,7% a 17% para o COI-5P, estando na faixa de divergência interespecífica observada entre outras espécies de *Bostrychia* para esse último marcador (11,9% a 23,4%).

Zuccarello & West (2002) avaliaram o complexo *Bostrychia calliptera/B. pinnata* com base em três marcadores: o espaçador *cox2-3*, o espaçador da Rubisco e sequências parciais do LSU. Os autores concluíram que a espécie ecorticada *B.*

*pinnata* e a corticada *B. calliptera* eram sinônimos, tendo *B. calliptera* prioridade. Sugeriram ainda que pela nova circunscrição, *B. callipetra* era monofilética. O complexo *Bostrychia calliptera/B. pinnata* formou três linhagens que não eram separáveis com base na presença ou ausência de corticação, critério já considerado inconsistente para a taxonomia do gênero *Bostrychia* (King *et al.* 1988).

A linhagem denominada 1 por Zuccarello & West (2002) agrupou duas sequências brasileiras com morfologia *B. pinnata* (ecorticada) (C3648, Maranhão e C3065, São Paulo, Ilha do Cardoso, Rio Perequê). A linhagem denominada 3 por Zuccarello & West (2002) também agrupou duas sequências brasileiras: C3042, com morfologia *B. calliptera* (corticada) e C3066, com morfologia *B. pinnata* (ecorticada), ambas da Ilha do Cardoso, Rio Sítio Grande.

Posteriormente Zuccarello & West (2006), por meio de uma maior amostragem e dados de sequências parciais de 26S rRNA, afirmaram que não havia suporte para o monofiletismo de *B. calliptera*, que foi dividida em três linhagens: uma com amostras do Brasil e Austrália (L1), outra com uma sequência de Cingapura (L2) e uma terceira com amostras do Brasil e México (L3). Para o *rbcL*, Zuccarello & West (2006) não tiveram sucesso na obtenção sequências das linhagens L1 e L2, mesmo após várias tentativas. O mesmo ocorreu com as nossas amostras de "*B. calliptera*" cujas inúmeras tentativas de sequenciamento do *rbcL* falharam, ou por dificuldade na amplificação do DNA ou por contaminação das amostras. As sequências de *rbcL* da linhagem L3 de Zuccarello & West (2006) foram incluídas nas nossas análises (AY920806 - México e AY920805 (C3042 - Brasil, Ilha do Cardoso, Rio Sítio Grande), e não se agruparam com "*B. calliptera*".

Nossas amostras de "*B. calliptera*" possuem morfologia "*B. pinnata*" pela combinação dos caracteres, talo ecorticado e ramificação alterno-dística. A obtenção de sequências do *rbcL* e de outros marcadores como os utilizados por Zuccarello & West (2002, 2006) é necessária para comparação das sequências e esclarecimento do posicionamento de "*B. calliptera*", se dentro das linhagens já identificadas por esses autores ou não. Como base nos agrupamentos genéticos verificados para *B. calliptera* com diferentes marcadores (Zuccarello & West 2002, 2006, este estudo), a espécie poderia ser separada em três espécies distintas. Vale ressaltar que não há sequências da localidade tipo de "*B. pinnata*" (Japão) e *B. calliptera* (Cayenne, Guiana Francesa) disponíveis nos bancos de dados.



Dentre as espécies de *Bostrychia* estudadas neste trabalho, *B. montagnei* (Fig. 11A-D) pode ser considerada a de mais fácil identificação morfológica. A espécie possui talo muito robusto, fixação por peripherohaptera, ápices fortemente recurvados ventralmente, ramificação alterno-dística com 2-4 ordens de ramos, eixos principais e ramos laterais corticados e râmulos de última ordem parcialmente monossifônicos.

Molecularmente, *B. montagnei* formou agrupamentos bem apoiados em todas as análises e apresentou baixa divergência intraespecífica (0%-0,8%) para a análise com o gene *rbcl*, na qual foram incluídas amostras do Caribe e Pacífico. Essa divergência (<1%) está na faixa de variação intraespecífica para esse marcador para outros gêneros de Rhodomelaceae (Cassano 2009, Cassano *et al.* 2009, Díaz-Larrea *et al.* 2007). Embora não haja sequências da localidade tipo (EUA, Flórida, Key West) disponíveis nos bancos de dados, a baixa divergência encontrada (0% a 0,17%) entre a sequência do Panamá, local mais próximo à localidade-tipo, e as sequências brasileiras (nossas e do GenBank) e a do Pacífico (El Salvador), indicam que *B. montagnei* é uma espécie genética e morfológicamente bem definida, conforme já mencionado por Fontes (2012) e Zuccarello *et al.* (2015), e corroborado pelos nossos resultados. Intrigante é a maior divergência intraespecífica (0,8%) observada entre amostras de Santa Catarina e Pernambuco de Fontes (2012) e as demais, bem maior do que as encontradas entre o Pacífico e o Caribe.

A espécie *B. radicans* é caracterizada pela fixação do talo por cladohapteron, ramificação alterna com 1-2 (-3) ordens de ramos, talo inteiramente ecorticado e inteiramente polissifônico, podendo ser monossifônico apenas no terço superior do râmulo com 2 a 5 células unisseriadas. A Figura 12 mostra espécimes de *B. radicans* 1 e *B. radicans* 2. Diferenças no padrão de ramificação e maior tamanho do talo distinguem *B. radicans* 1 de *B. radicans* 2. Talos maiores foram observados em *B. radicans* 2 (3 cm), enquanto que em *B. radicans* 1 o talo não ultrapassou 1 cm. Espécimes de *B. radicans* 2 possuem ramificação alterno-dística mais densa, enquanto que em *B. radicans* 1 a ramificação é mais esparsa. As Figuras 13A-E e 14A-D mostram espécime e estruturas reprodutivas de *B. radicans* 2.

Essa espécie é distinta de *B. moritziana* apenas pelos ramos de última ordem que são monossifônicos nesta última (Joly 1965 e Cordeiro-Marino 1978 (como *B.*

*radicans* f. *moniliforme* Post), King & Puttock 1989, Fontes 2012, Almeida 2013). A forma *moniliforme* de *B. radicans* foi elevada à categoria específica como *B. moritziana* por King & Puttock (1989). Nossos espécimes denominados de *B. moritziana* 2 (Fig. 15A-D) são semelhantes morfológicamente aos de Fontes (2012), denominados *B. moritziana* 1, por apresentarem talos com râmulos dicotômicos inteiramente monossifônicos. Porém, nossos espécimes ilustrados na Figura 15A-D, que representam a linhagem *B. moritziana* 2, são mais delicados possuindo eixo prostrado conspícuo e eixos eretos esparsos e menos ramificados.

O valor taxonômico da característica (monossifonia ou polissifonia dos râmulos) foi questionado por Pedroche *et al.* (1995) e Zuccarello & West (1995, 1997, 2003) ao observarem variabilidade em isolados cultivados de *B. moritziana* que desenvolveram ramos de última ordem inteiramente polissinônicos, ou *B. radicans*, cujos isolados desenvolveram ramos monossifônicos. Apesar dessa variabilidade em condições experimentais, de acordo com Fontes (2012) a presença de ramos monossifônicos de última ordem em *B. moritziana* foi um carácter útil na separação de *B. radicans* nos representantes brasileiros. O mesmo foi observado nos nossos espécimes.

Estudos moleculares realizados com *B. radicans* e *B. moritziana* com base nos espaçadores *cox 2-3* e espaçador da Rubisco (*rbcL-S*) revelaram espécies crípticas para ambos os táxons que formam um complexo, compreendendo sete linhagens moleculares (Zuccarello & West 2003, 2006, Zuccarello *et al.* 2006, West *et al.* 2013). Estudos de hibridização com diferentes isolados de *B. radicans* e *B. moritziana* revelaram hibridização negativa entre essas duas espécies (Zuccarello & West 1995, 1997, Zuccarello *et al.* 1999b, 2011), mas compatibilidade entre isolados de uma mesma espécie, que são próximos molecularmente (0 a 1 pb divergente do *rbcL-S*, entre, por exemplo, isolados de *B. radicans* do Brasil (SP) e entre isolados do Brasil e Peru; entre isolados de *B. moritziana* da Austrália e África do Sul) (Zuccarello & West 1997).

Estudos posteriores com uma maior amostragem do complexo *B. radicans/B. moritziana* confirmaram que as diferenças das populações não podem ser explicadas por isolamento por distância, uma vez que dados de hibridação sugeriram que, enquanto haplótipos do Pacífico (México, Guatemala, El Salvador) são, pelo menos,

parcialmente compatíveis, o mesmo haplótipo do Atlântico (EUA) é majoritariamente incompatível reprodutivamente (Zuccarello *et al.* 2011). Os autores concluíram que a maior parte da variação no complexo *B. radicans/B. moritziana* do sul da América Central é devido à retenção dessa diversidade após o fechamento do Istmo do Panamá, também observaram que as populações de manguezais são altamente diferenciadas, e que especiação (fases iniciais de incompatibilidade reprodutiva) ocorre em taxas mais rápidas do que o marcador molecular utilizado (*rbcl-S*).

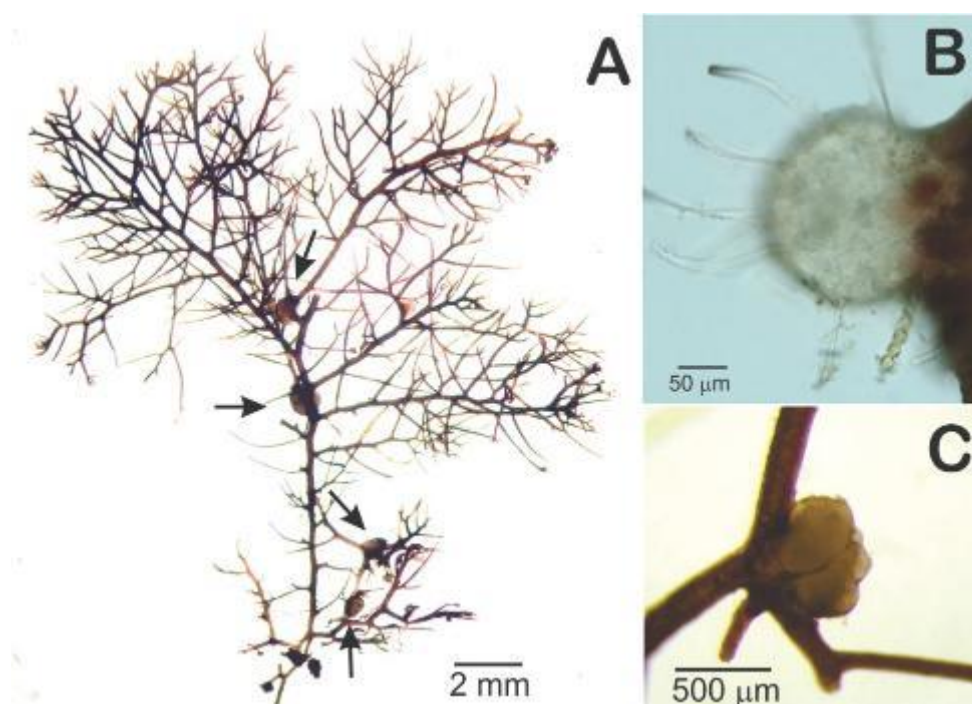
Entretanto, as sete linhagens moleculares do complexo *B. radicans/B. moritziana* evidenciadas por Zuccarello & West (2003, 2006), Zuccarello *et al.* (2006) não são inter-compatíveis reprodutivamente e o número de espécies crípticas é alto (Zuccarello & West 1995, 1997, Zuccarello *et al.* 1999b, 2011). Das sete linhagens moleculares identificadas por esses autores, três delas possuem amostras brasileiras de *rbcl-S*, procedentes da Ilha do Cardoso (SP) (linhagens 3, 5 e 6), e uma de Trindade (RJ) (linhagem 3) (Zuccarello & West 2003, West *et al.* 2013). As linhagens 5 e 6 incluem amostras brasileiras com morfologia de *B. radicans*, enquanto a linhagem 3 inclui amostras brasileiras com morfologia de *B. radicans* e *B. moritziana*.

Duas linhagens diferentes de *B. radicans* foram observadas por Fontes (2012) usando marcadores moleculares (UPA e *rbcl*) com base em amostragens para uma grande extensão da costa brasileira (linhagem 1 abrangendo amostras do Pará a Santa Catarina e linhagem 2 com amostras da Bahia).

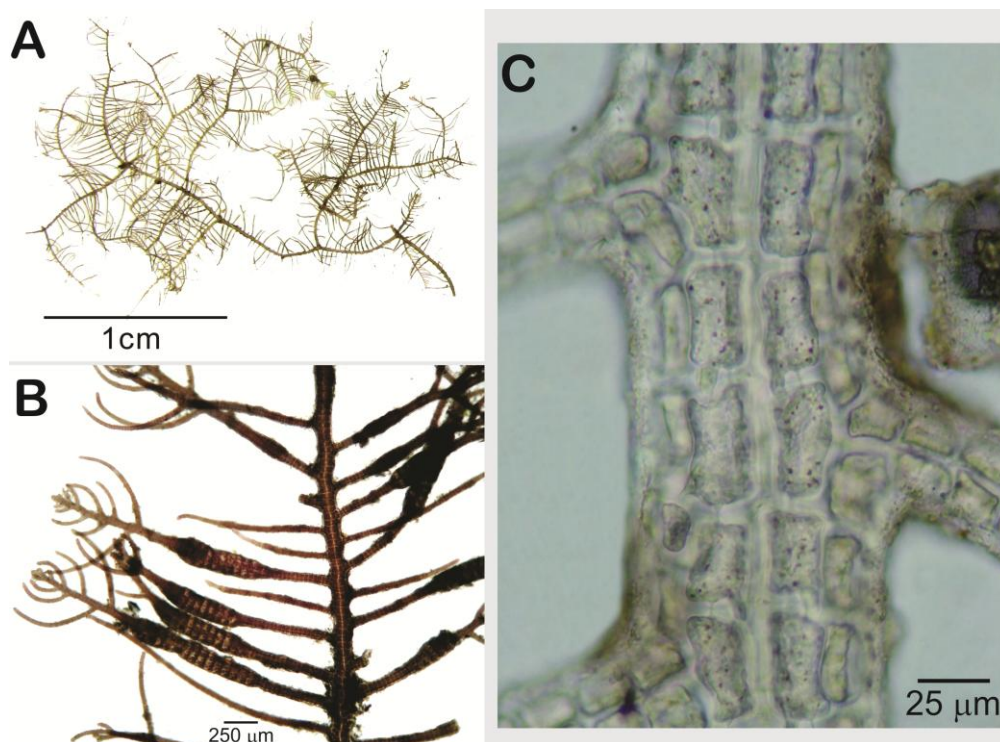
Os nossos resultados baseados apenas em sequências da Ilha Barnabé, Santos evidenciaram duas linhagens de *B. radicans* com o UPA e três linhagens com o *rbcl* e COI-5P, cuja divergência foi alta para os três marcadores. Nossas amostras IB08, IB43, IB63 e IB83 fazem parte da linhagem 6 de Zuccarello & West (2003, 2006) e West *et al.* (2003), cujo isolado 2649 (São Sebastião, SP) teve o *rbcl* sequenciado (AY920818) e agrupou-se com nossas sequências. Correlações com as demais linhagens identificadas por esses autores não puderam ser feitas pela ausência de sequências comuns. Uma análise futura com o *rbcl-S* entre as nossas amostras e as obtidas por esses autores podem ajudar a esclarecer se as nossas demais linhagens correspondem as já detectadas em trabalhos anteriores ou se há outras linhagens moleculares para o complexo *B. radicans/B. moritziana*. Para as amostras de *B. moritziana*, duas linhagens moleculares foram observadas com o UPA, entretanto não

foi possível detectar diferentes linhagens dessa espécie com os marcadores COI-5P ou *rbcL* por dificuldades de amplificação desses marcadores.

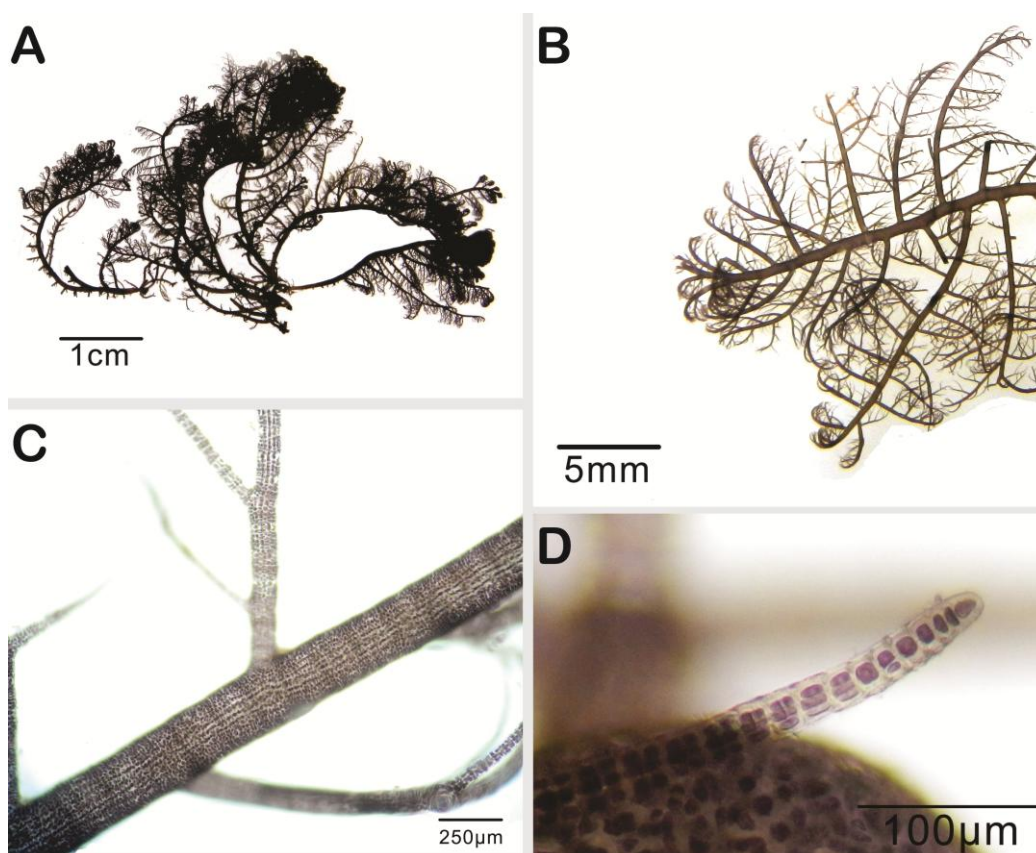
A utilização dos três marcadores moleculares permitiu uma separação eficiente para o gênero *Bostrychia*, com praticamente os mesmos agrupamentos identificados, contudo como já evidenciado em estudos anteriores, o UPA mostrou-se um marcador mais conservado, com divergência genética mais baixa e menor detecção de linhagens moleculares em comparação com os dois outros marcadores utilizados.



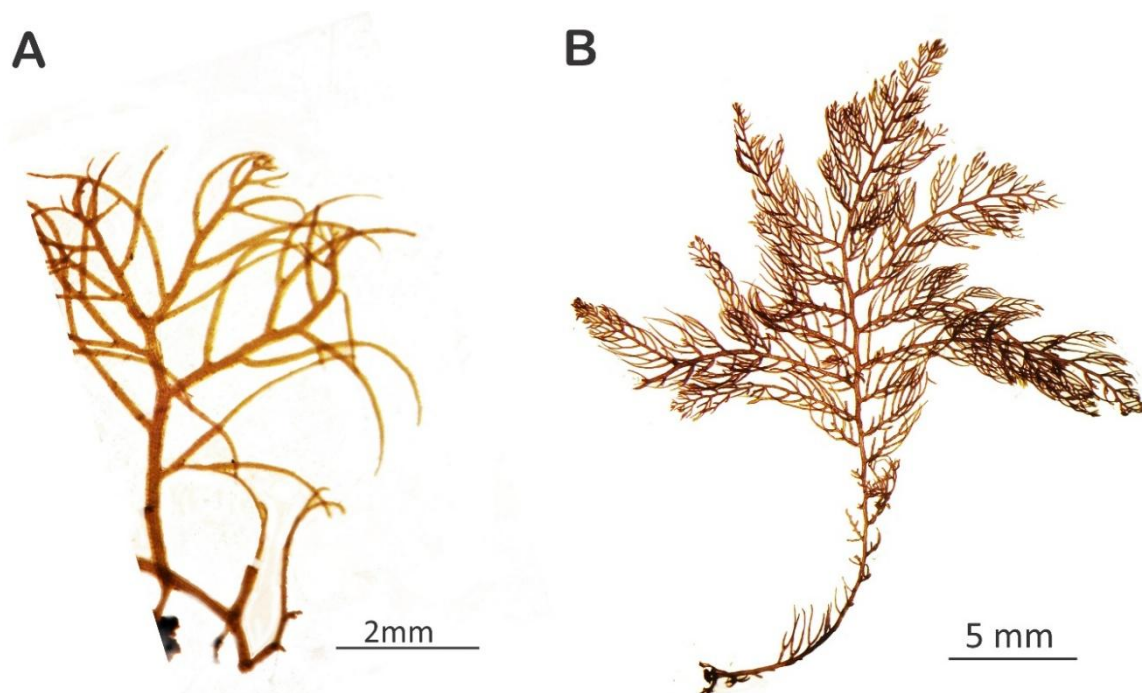
**Figura 9** - *Dawsonicolax bostrychiae*. Aspecto geral da parasita (setas) sobre *B. radicans* 2. B- Aspecto geral de uma planta feminina com várias tricogines. C-Detalhe da parasita aderida ao talo de *B. radicans* 2



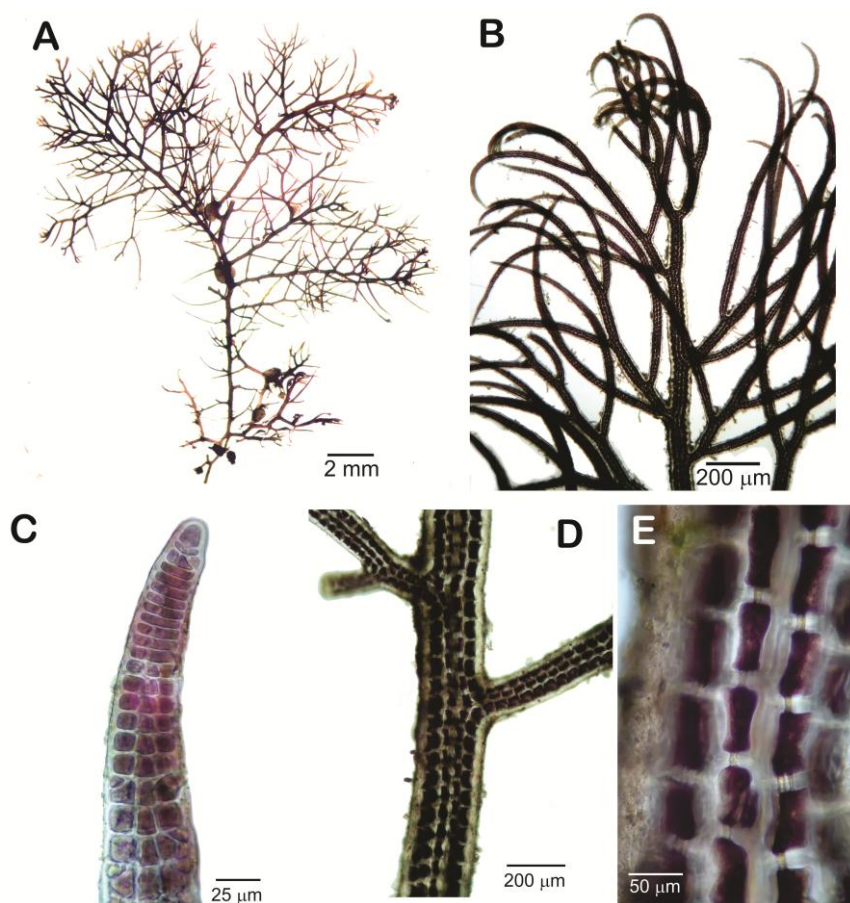
**Figura 10** - "*Bostrychia calliptera*". A-Aspecto geral do talo. B-Detalhe dos râmulos com estiquídios. C-Detalhe do eixo principal ecorticado.



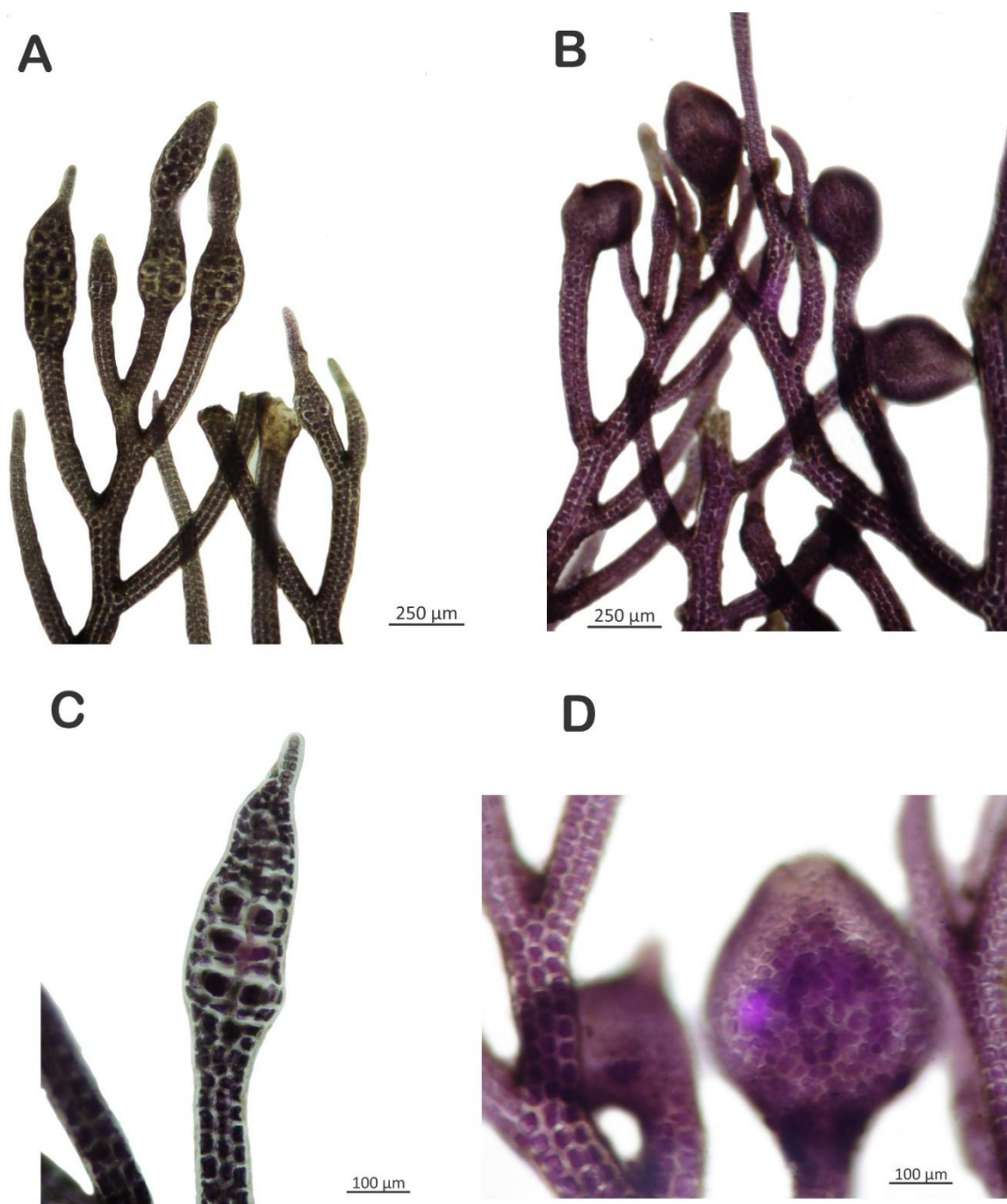
**Figura 11** - *Bostrychia montagnei*. A-Aspecto geral do talo. B-Detalhe do ápice recurvado. C-Detalhe do ramo corticado. D-Detalhe do râmulo de última ordem parcialmente monossifônico.



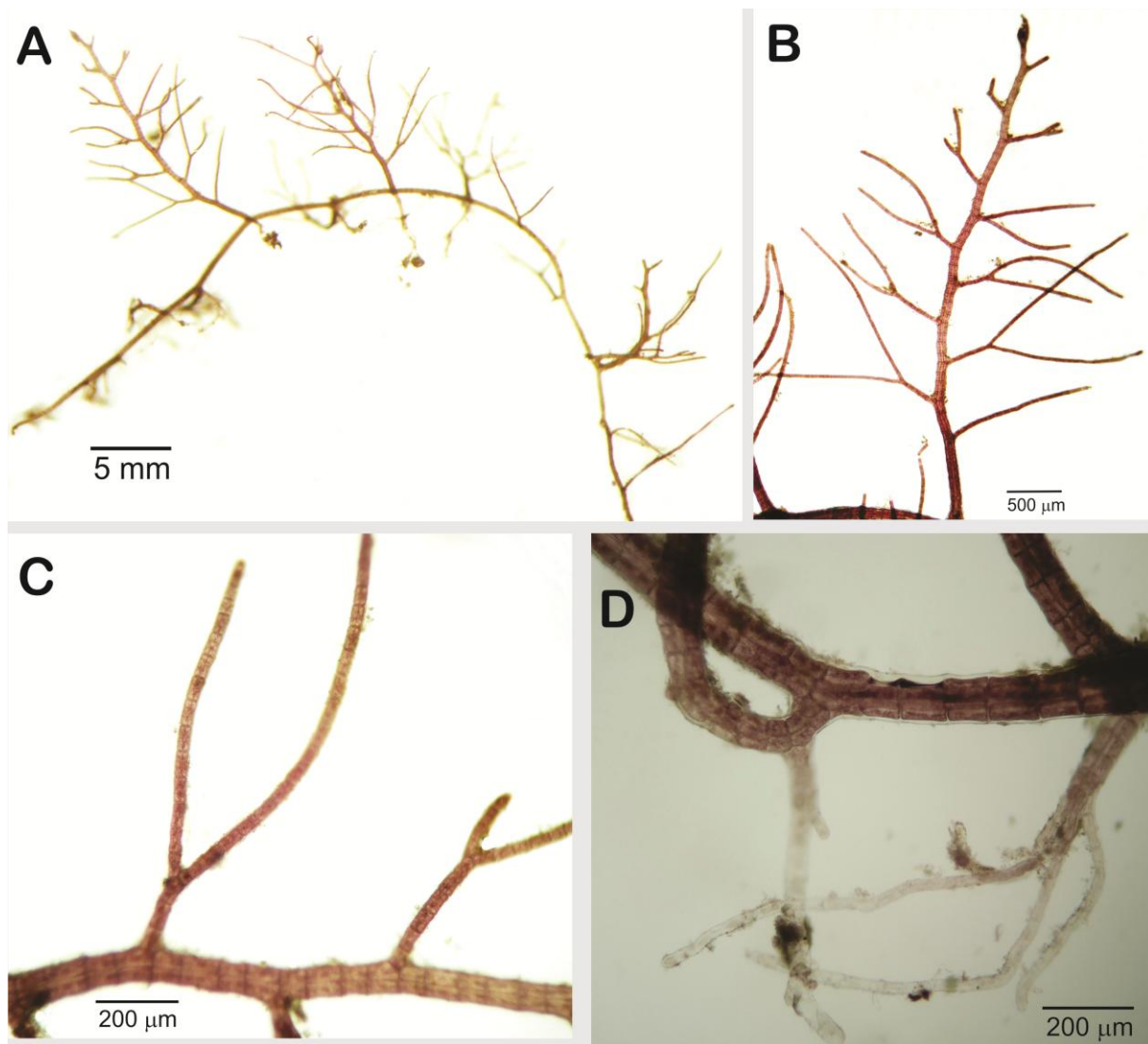
**Figura 12** – Comparação entre espécimes de *Bostrychia radicans*. A- *B. radicans* 1. B- *B. radicans* 2.



**Figura 13** – *Bostrychia radicans* 2. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do ápice e padrão de ramificação. C- Detalhe ápice polissifônico. D- Detalhe do ramo lateral primário ecorticado. E- Detalhe do talo mostrando ecorticação.



**Figura 14** – *Bostrychia radicans* 2. A- Ápices com estiquídios. B- Ápices com cistocarpos. C- Detalhe de um estiquídio. D- Detalhe de um cistocarpo.



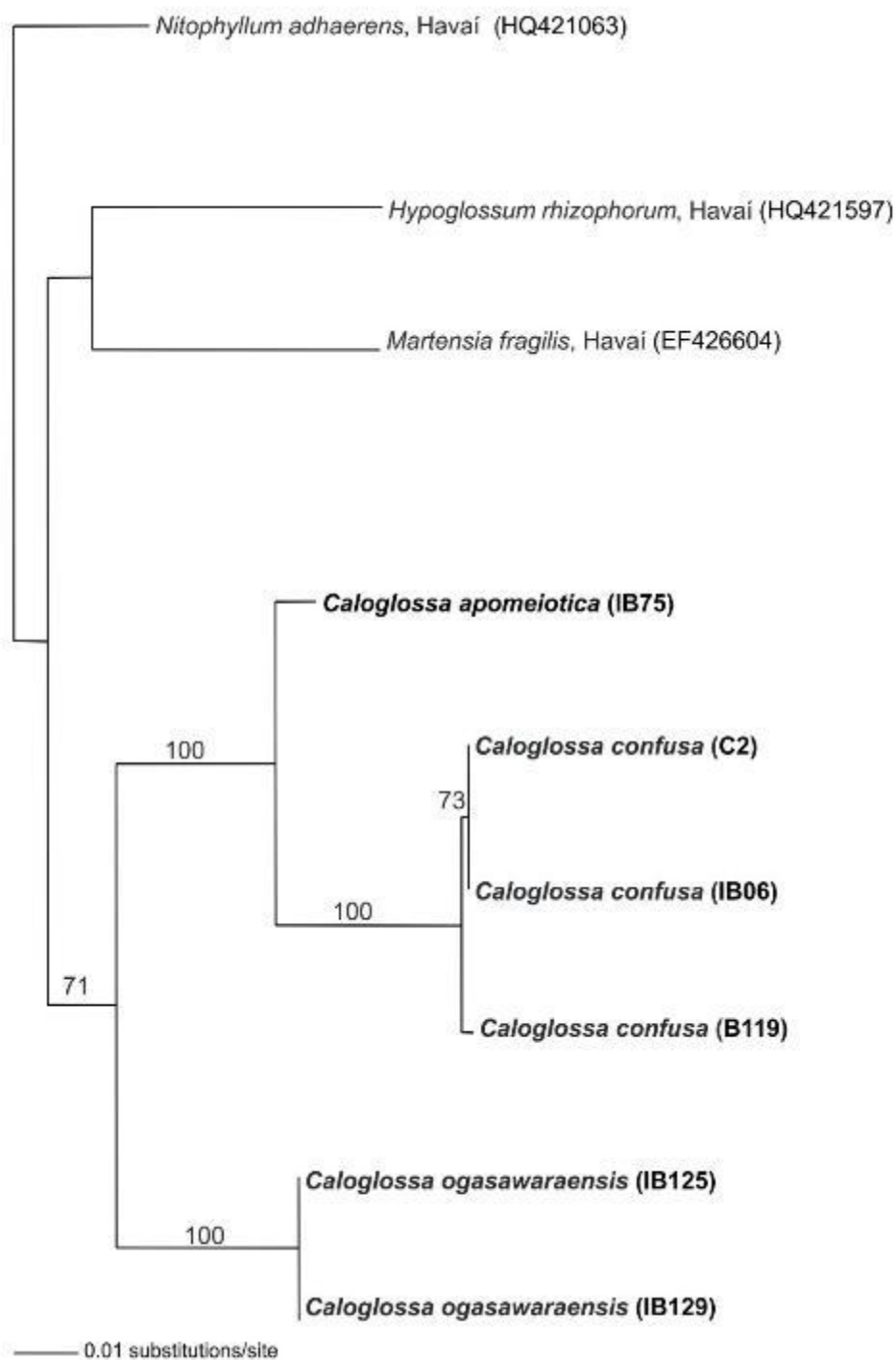
**Figura 15** – *Bostrychia moritziana* 2. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação. C- Detalhe do talo ecorticado e râmulo de última ordem inteiramente monossifônico. D- Detalhe do cladophylla.



### 5.3.2. Gênero *Caloglossa* (Harvey) G. Martens

Para a análise molecular com o marcador UPA para o gênero *Caloglossa* foi gerada uma matriz com 9 sequências, sendo seis obtidas neste estudo e três Delesseriaceae procedentes do GenBank, usadas como grupos externos: *Martensia fragilis* Harvey (EF426604), *Hypoglossum rhizophorum* D.L. Ballantine & M.J. Wynne (HQ421597) e *Nitophyllum adhaerens* M.J. Wynne (HQ421063), gerando um alinhamento final de 369 pb. Não há sequências de UPA para *Caloglossa* disponíveis nos bancos de dados para comparação e também não foi possível obter sequências desse marcador para a espécie *C. leprieurii*.

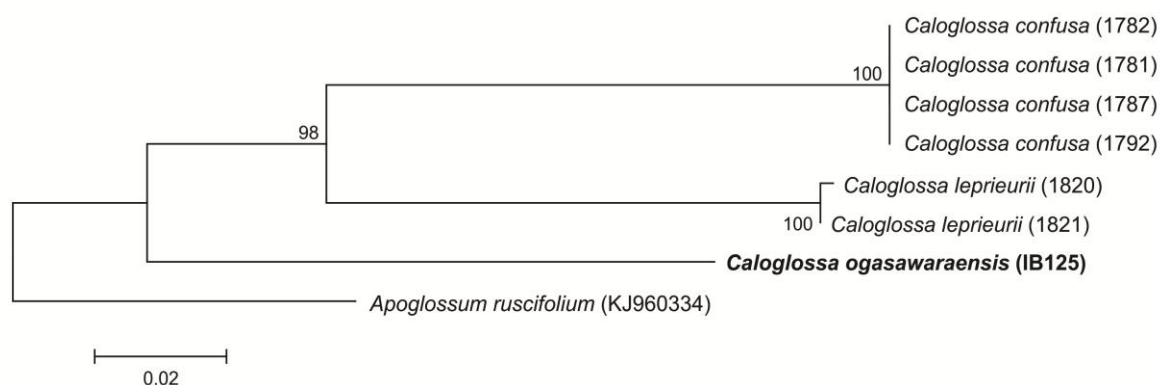
A árvore de NJ é mostrada na Figura 16. As nossas amostras formaram dois agrupamentos representados pelas espécies *C. confusa* e *C. ogasawaraensis*, ambos com 100% de suporte. *Caloglossa apomeiotica* permaneceu em um ramo isolado, entretanto mais próxima de *C. confusa*. As amostras de *C. ogasawaraensis* foram 100% idênticas, enquanto *C. confusa* apresentaram baixa divergência intraespecífica (0% a 0,27%, 1 pb). A amostra de *C. apomeiotica* divergiu de *C. confusa* de 3,5% (13 pb) a 3,8% (14 pb) e de *C. ogasawaraensis* em 5,9% (21 pb). A divergência interespecífica entre todas as amostras estudadas variou de 3,5% entre *C. apomeiotica* e *C. confusa* a 8,4% (31 pb) entre *C. confusa* e *C. ogasawaraensis*.



**Figura 16** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Caloglossa*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está seguida do local de coleta e do número de acesso.

Para análise com o marcador COI-5P foi gerada neste estudo apenas uma sequência, *C. ogasawaraensis* (IB125). Houve grande dificuldade de se obter

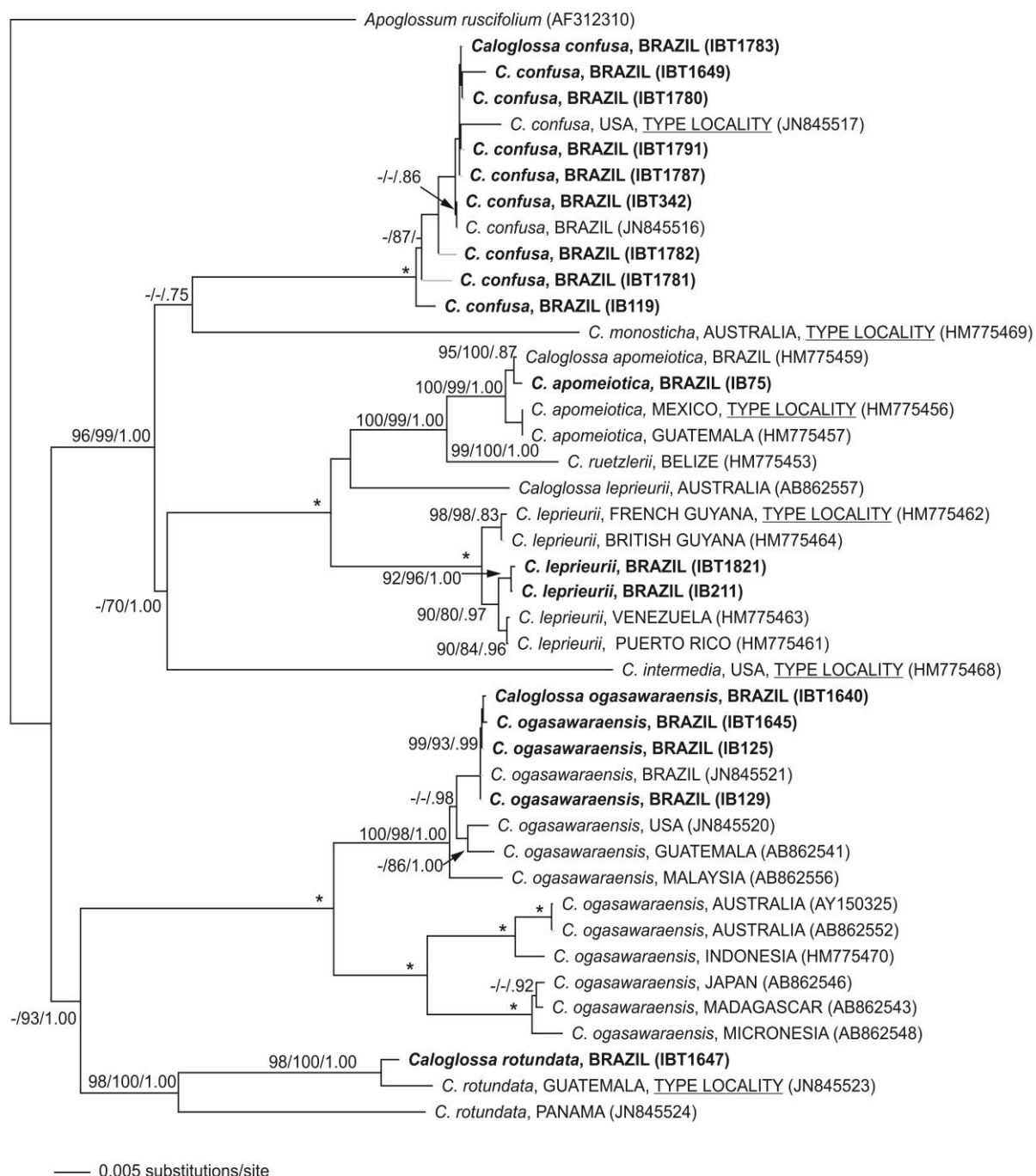
sequências desse marcador para o gênero *Caloglossa* ou pela difícil amplificação dos fragmentos ou pela ocorrência de contaminação. Para análise com o COI-5P foi gerada uma matriz com oito sequências, uma obtida neste estudo, seis de Kano (2015) e uma Delesseriaceae foi usada como grupo externo, *Apoglossum ruscifolium* (Turner) J. Agardh (KJ960334), gerando um alinhamento final de 574 pb. A Figura 17 mostra a análise de NJ para o COI-5P, na qual dois agrupamentos foram resolvidos com alto suporte (100%), representados pelas espécies *C. confusa* e *C. leprieurii*. A amostra de *C. ogasawaraensis* permaneceu em um ramo isolado. As amostras de *C. confusa* (Ubatuba, SP) se agruparam e não apresentaram divergência intraespecífica. As amostras de *C. leprieurii* da Ilha do Mel, Paraná divergiram em apenas 0,01% (1 pb). Os dados do COI-5P indicaram uma divergência interespecífica variando de 2,5% (14 pb) entre *C. apomeiotica* e *C. leprieurii* a 3,3% (19 pb) entre *C. apomeiotica* e *C. confusa*.



**Figura 17** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador COI-5P para o gênero *Caloglossa*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a sequência retirada do Genbank está do número de acesso.

A análise com o *rbcL* foi feita a partir de uma matriz com 43 sequências, sendo cinco completas obtidas neste estudo, 12 por Kano (2015) e as demais procedentes do GenBank. A amostra *Apoglossum ruscifolium* (AF312310) foi usada como grupo externo. O alinhamento final consistiu de 1431 pb. Esse marcador foi de difícil amplificação e ocorreu uma elevada incidência de contaminação em amostras de diferentes espécies o que inviabilizou a obtenção de mais sequências.

A Figura 18 mostra a árvore consenso de *rbcl* para esse gênero. O monofiletismo do gênero *Caloglossa* não foi sustentado por nenhuma análise.



**Figura 18** - Árvore consenso derivada da análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências de *rbcl* das espécies de *Caloglossa*. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap para as análises de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência bayesiana (BI). Valores menores que 70% (ou .70 probabilidade) estão representados como (-). Asterisco (\*) indica suporte total para todas as análises. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso. (Kano *et al.* 2016, submetido, Apêndice B).

O gênero foi dividido em dois clados principais: o primeiro deles contendo *C. apomeiotica*, *C. leprieurii*, *C. confusa*, *C. ruetzlerii* Krayesky, Fredericq & J.N. Norris, *C. monosticha* e *C. intermedia*, com alto suporte para todas as análises, e o segundo clado incluiu *C. ogasawaraensis* e *C. rotundata*, com alto suporte apenas para BI.

*Caloglossa confusa* formou um clado bem apoiado em todas as análises, com divergência intraespecífica variando de 0% a 1,3% (19 pb). As sequências brasileiras de *C. confusa* se agruparam com a sequência da localidade tipo (Plantation Key, Flórida, EUA, JN845517) variando de 0,5% (7 pb) a 1,3% (19 pb).

O agrupamento formado por *C. apomeiotica* apresentou alto suporte em todas as análises e mostrou a mais baixa divergência intraespecífica entre as espécies estudadas (0% a 0,4%, 6 pb). As amostras brasileiras (IB75, Ilha Barnabé e HM775459, Rio de Janeiro) divergiram em apenas 0,1% (2 pb). A sequência de *C. apomeiotica* do Brasil obtida neste estudo divergiu da amostra da localidade tipo (Baja California Sur, México, HM775456) em apenas 0,4%.

As amostras de *C. leprieurii* formaram um agrupamento com amostras da América do Sul (Brasil, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa) e Caribe (Porto Rico) com alto suporte em todas as análises. As duas amostras brasileiras procedentes de SP (Ilha Barnabé e Cibratel, Itanhaém) mostraram baixa divergência intraespecífica 0,07% (1 pb). As amostras brasileiras divergiram da amostra da localidade tipo (Guiana Francesa, HM775462) de 0,7% (10 pb) a 0,8% (11 pb). *Caloglossa leprieurii* apresentou a maior divergência intraespecífica entre as espécies do gênero estudadas (4,7%, 67 pb) entre uma amostra da Austrália (AB862557) e a amostra brasileira (IBT1821). A amostra australiana não se agrupou com as demais amostras de *C. leprieurii* e divergiu da amostra da localidade tipo em 4,6% (66 pb), indicando que se trata provavelmente de um erro de identificação.

As amostras de *C. ogasawaraensis* foram divididas em três clados correspondentes aos verificados por Kamiya & West (2014). As amostras brasileiras formaram um subclado com suporte alto a moderado e divergiram entre si de 0% a 0,07%. As amostras brasileiras se agruparam com sequências dos EUA, Guatemala e Malásia com baixa divergência intraespecífica (0% a 0,8%). A divergência para todas as amostras de *C. ogasawaraensis* variou de 0% a 5,2% (75 pb). Não há sequências da localidade tipo (Ogasawara-jima, Bonin Islands) disponíveis para comparação.

A amostra brasileira de *C. rotundata* divergiu em 0,9% (13 pb) da amostra da localidade tipo (Likin, Guatemala, JN845523). A amostra do Panamá (JN845524) apresentou maior divergência com as amostras brasileira e guatemalteca (6,5%, 93 pb).

Os dados obtidos com o gene *rbcl* indicam uma distinção molecular entre as espécies de *Caloglossa* variando de 2,5% (35 pb) entre *C. apomeiotica* e *C. ruetzlerii* a 14,5% (207 pb) entre *C. ogasawaraensis* e *C. intermedia*.

O gênero *Caloglossa* compreende atualmente 39 espécies, incluindo categorias infraespecíficas, das quais 20 são aceitas taxonomicamente (Guiry in Guiry & Guiry 2016). O gênero habita principalmente manguezais em regiões tropicais e temperadas quentes do mundo com algumas espécies apresentando distribuição pantropical, enquanto outras possuem distribuição mais restrita, como *C. fluviatilis* Krayesky, Fredericq & J.N. Norris, uma espécie de água doce encontrada apenas no Panamá (Krayesky *et al.* 2011, 2012).

O gênero *Caloglossa* possui morfologia muito simples, sendo caracterizado por um talo composto por delicadas lâminas regularmente constrictas em maior ou menor grau, monostromáticas, exceto na nervura central. A sistemática do gênero tem sido intensamente investigada, entretanto a diversidade de espécies ainda não foi completamente esclarecida (Kamiya *et al.* 1999, 2003, Krayesky *et al.* 2011, 2012, Kamiya & West 2014).

De acordo com Kano & Fujii (2016), o litoral brasileiro abriga cinco espécies de *Caloglossa*: *C. apomeiotica*, *C. confusa*, *C. leprieurii*, *C. monosticha* M. Kamiya e *C. ogasawaraensis*. Entretanto, Krayesky *et al.* (2012) ao estudarem as espécies americanas do gênero com base nos genes *rbcl* e LSU rDNA demonstraram que a espécie identificada anteriormente como *C. monosticha* para o Atlântico ocidental, correspondia uma espécie nova, descrita como *C. confusa*, que difere de *C. monosticha* do Oceano Pacífico principalmente pelo seu talo com nós fortemente constrictos. Desta forma, atualmente, quatro espécies de *Caloglossa* são referidas para o Brasil, excluindo *C. monosticha*.

Os estudos de *Caloglossa* no litoral brasileiro, assim como de toda a família Delesseriaceae, são baseados, em sua grande maioria, em análises morfológicas. Estudos aplicando técnicas moleculares são muito recentes e foram iniciados por

Kano (2015) ao investigar as Delesseriaceae do sudeste brasileiro utilizando marcadores do tipo “DNA Barcode” (COI-5P e UPA) e o gene *rbcL*. Os resultados obtidos para *Caloglossa* por Kano (2015) foram somados aos nossos em um artigo submetido ao *Brazilian Journal of Botany* (em revisão). Cinco espécies foram confirmadas para o Brasil com base em dados morfológicos e moleculares: *C. apomeiotica*, *C. confusa*, *C. leprieurii*, *C. ogasawarensis* e *C. rotundata* M. Kamyia. Com exceção de *C. rotundata*, todas as demais espécies foram encontradas na Ilha Barnabé. A ocorrência de *C. rotundata* no litoral brasileiro a partir de material coletado em Ubatuba, SP, consiste na sua primeira citação para o Oceano Atlântico (Kano *et al.* 2016, submetido).

Nossos resultados moleculares obtidos com o *rbcL* não apoiaram o monofiletismo do gênero *Caloglossa*, entretanto os grupos genéticos representados pelas cinco espécies sequenciadas tiveram alto suporte em todas as análises (Fig. 18). Krayesky *et al.* (2012) pontuaram que as análises com o *rbcL* e LSU revelaram que *Caloglossa* é um gênero monofilético, porém sem forte apoio para qualquer análise. De fato, na árvore de *rbcL* de Krayesky *et al.* (2012) não há suporte para o monofiletismo do gênero em nenhuma análise, semelhante aos nossos resultados. A divisão do gênero em dois grupos principais corrobora os resultados obtidos por Krayesky *et al.* (2012). Os valores de divergência intraespecífica obtidos neste estudo (0,5%-1,3%) são comparáveis aos verificados por Krayesky *et al.* (2012) para o gene *rbcL* (0,4%-1,5%). Igualmente, a variação interespecífica observada neste estudo (2,5%-14,5%) está na faixa descrita por Krayesky *et al.* (2012) para *Caloglossa* (2,7%-14,1%).

A distinção de espécies de *Caloglossa* é feita principalmente por características morfológicas vegetativas, sendo consideradas importantes, o grau de constrição e o número de fileiras de células derivadas da primeira célula axial do eixo principal, a morfologia, número e distribuição dos rizoides, o tipo de ramo, endógeno ou adventício, e a morfologia dos entrenós (Krayesky *et al.* 2012).

Espécies de *Caloglossa* possuem uma alta plasticidade fenotípica formando complexo de espécies, como o complexo *C. leprieurii* (Krayesky *et al.* 2011) ou

apresentando diversidade críptica, como recentemente revelada para *Caloglossa ogasawaraensis* por Kamiya & West (2014).

*Caloglossa apomeiotica* foi descrita por West & Zuccarello in West *et al.* (1994) a partir de material previamente identificado como *C. lepriurii* do Pacífico mexicano, com base primariamente na reprodução assexuada apresentada por essa espécie. Mais tarde, a espécie foi reduzida a um sinônimo de *C. lepriurii sensu stricto* por Kamiya *et al.* (2003) devido a filogenia molecular obtida com o gene 26S rRNA que demonstrou que a assexualização surgiu mais de uma vez na linhagem de *C. lepriurii*. Portanto, os autores argumentaram que essas espécies não poderiam ser distinguidas com base em seus dados moleculares ou mesmo morfológicos. Krayesky *et al.* (2011), estudando o complexo *C. lepriurii* das Américas, restabeleceram *C. apomeiotica* como uma espécie distinta com base em dados moleculares (*rbcl* e LSU) e morfológicos, sendo considerados diagnósticos para a separação das espécies, o número de fileiras de células derivadas da primeira célula axial do eixo principal (2-5 em *C. apomeiotica* e 3-7 em *C. lepriurii*) e a largura das lâminas (*C. apomeiotica* é um pouco mais robusta [0,9 a 2,5 mm] do que *C. lepriurii* [0,5 a 1,4 mm]). Entretanto, essas características se sobrepõem e não são efetivas para distinção das espécies.

West *et al.* (1994) mostraram que *C. apomeiotica* difere de *C. lepriurii* pelo desenvolvimento de bisporângios, enquanto tetrasporângios são menos comuns. Apenas bísporos eram capazes de germinar e gerar novos esporófitos em cultura. Posteriormente, um isolado de *C. apomeiotica* cultivado por J. A. West (3376) foi descoberto se reproduzindo também sexualmente e foi sequenciado por Krayesky *et al.* (2011). Essa amostra se posicionou dentro do clado de *C. apomeiotica*. Segundo Krayesky *et al.* (2011) é possível que *C. apomeiotica* responda a sinais ambientais que permitam que um esporófito produza bisporângios ou tetrasporângios viáveis sob certas condições.

Bisporângios foram frequentemente encontrados no nosso material (Fig. 19A-D) de *C. apomeiotica*, enquanto tetrasporângios foram muito raros (Fig. 19D). Este caráter reprodutivo foi essencial para separar morfológicamente as espécies. Além da presença de bisporângios, a identificação da espécie pôde ser confirmada pelo gene *rbcl*. A baixa divergência encontrada (0,4%) entre a nossa sequência de *C. apomeiotica* e a da localidade tipo (HM775456) confirmou que ambas são a mesma



espécie. Além disso, nossa sequência divergiu em apenas 0,01% da sequência do Rio de Janeiro (HM775459), que constituiu a primeira citação de *C. apomeiotica* para o Brasil (Krayesky *et al.* 2011). Devido à semelhança vegetativa entre *C. apomeiotica* e *C. lepriurii* é possível que muitas citações de *C. lepriurii* para o Brasil sejam erros de identificação e correspondam a *C. apomeiotica*, principalmente se esporófitos não forem encontrados para análise. Assim, a abordagem molecular é cada vez mais necessária para a identificação e definição destas espécies. Ilustrações *C. lepriurii* estão em Kano *et al.* (2016, submetido, Apêndice B).

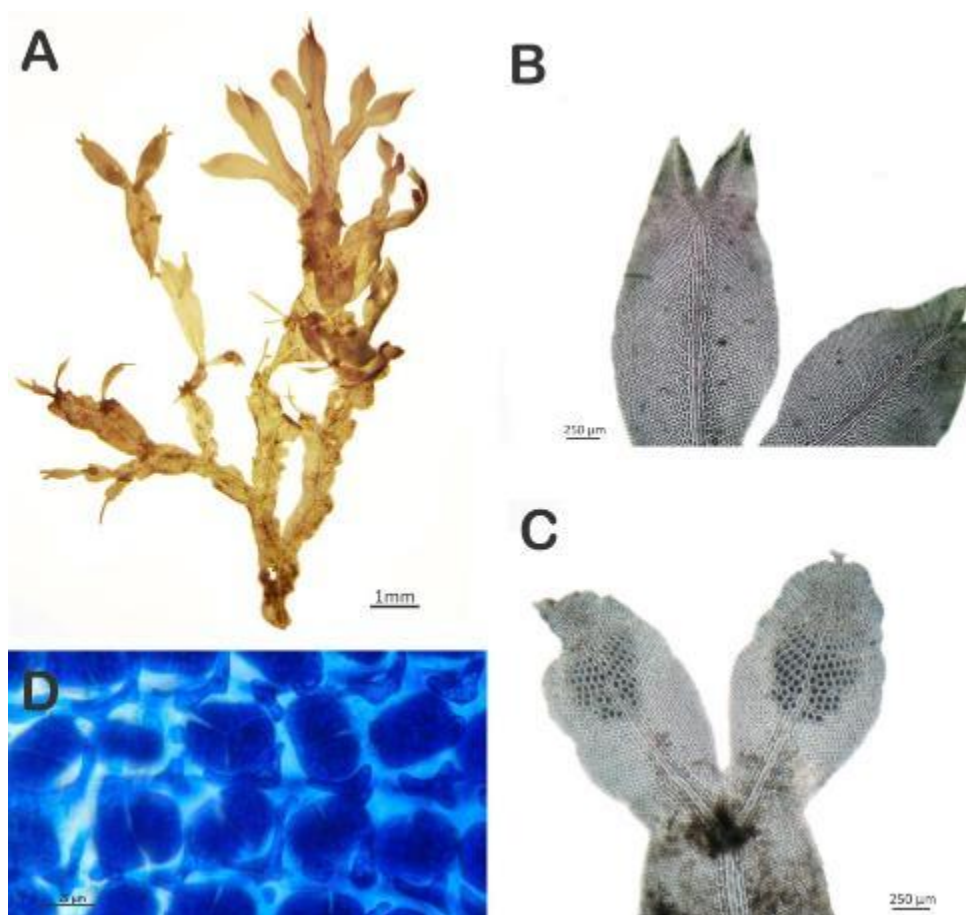
*Caloglossa confusa* foi previamente referida para o Brasil com base em espécimes coletados na Ilha do Cardoso, São Paulo (Krayesky *et al.* 2012). Os espécimes recém-coletados *C. confusa* estão de acordo com os estudados por Krayesky *et al.* (2012), compartilhando caracteres morfológicos, como o número de fileiras de células derivadas da primeira célula axial do eixo principal (1-2), o número de fileiras de células do ramo lateral oposto (1-3), além do tipo de distribuição dos rizoides (tipo G) e da forte constrição nodal. A distribuição dos rizoides tipo G estabelecida por Kamiya *et al.* (2003) é caracterizada pelo desenvolvimento de rizoides a partir da primeira e da segunda fileiras de células nos eixos principais e laterais. Além das características morfológicas, a análise molecular com o *rbcL* mostrou baixa divergência intraespecífica (0,5% a 1,3%) entre nossas amostras e a da localidade tipo (EUA, HM 845517), que está na faixa de variação intraespecífica verificada por Krayesky *et al.* (2012) (0,4% -1,5%), para espécies de *Caloglossa*. A Figura 20A-D mostra *C. confusa* encontrada na área estudada.

Dentre as espécies de *Caloglossa* encontradas no Brasil, *C. ogasawaraensis* é a mais facilmente identificada devido ao aspecto filamentososo do seu talo e a sua pouca plasticidade morfológica (Fig. 21A-C). Esta espécie tem distribuição mundial ocorrendo em ambientes marinhos e de água doce em ambos os hemisférios (Kamiya & West 2014). Esses autores demonstraram por meio de dados moleculares combinados (*rbcL*, espaçador *rbcL-S*, LSU e região espaçadora do *cox*) que *C. ogasawaraensis* possui diversidade críptica tendo sido dividida em três grupos filogenéticos com ampla faixa de distribuição geográfica, sugerindo um processo de especiação desses três grupos filogenéticos. De acordo com Kamiya & West (2014),

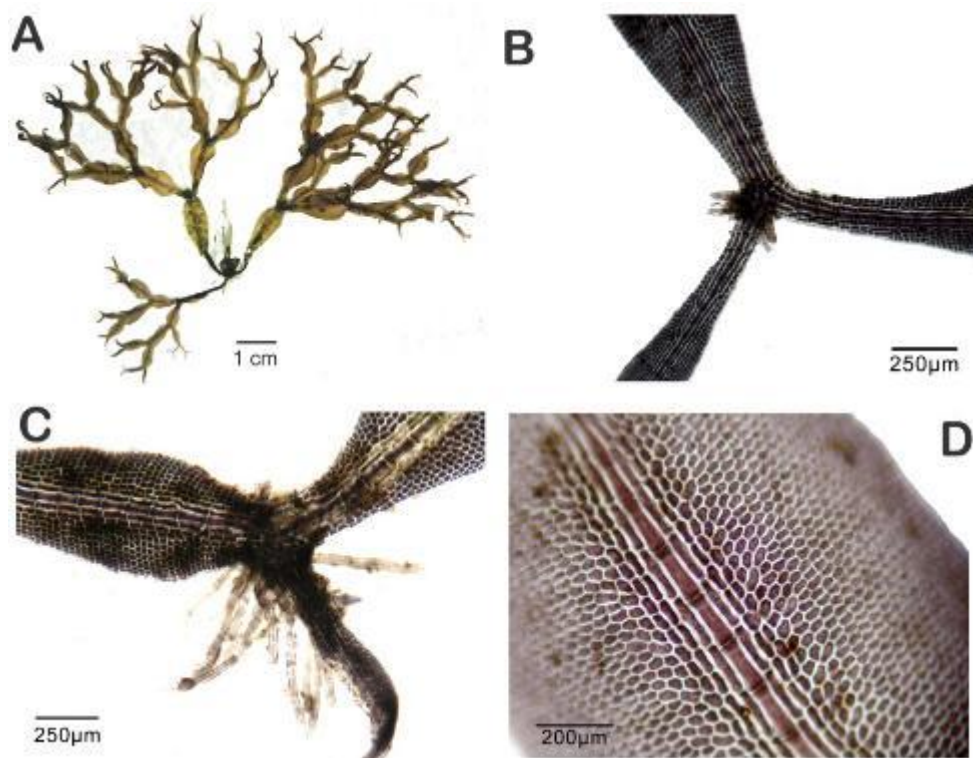
a ampla distribuição geográfica e a próxima similaridade genética dentro de cada um dos três grupos indicam ocorrências ocasionais de evento de dispersão a longa distância nesta espécie.

A divergência intraespecífica máxima dos espécimes brasileiros foi de 0,07% para o *rbcL*, confirmando que todos pertencem ao mesmo grupo de *C. ogasawaraensis* do Brasil (JN845521), previamente analisado por Kamiya & West (2014), e que incluiu amostras do leste do Pacífico-Atlântico e da Malásia. Apesar dos resultados obtidos para *C. ogasawaraensis*, Kamiya & West (2014) argumentaram que mais características são necessárias para descrever os grupos filogenéticos como espécies distintas.

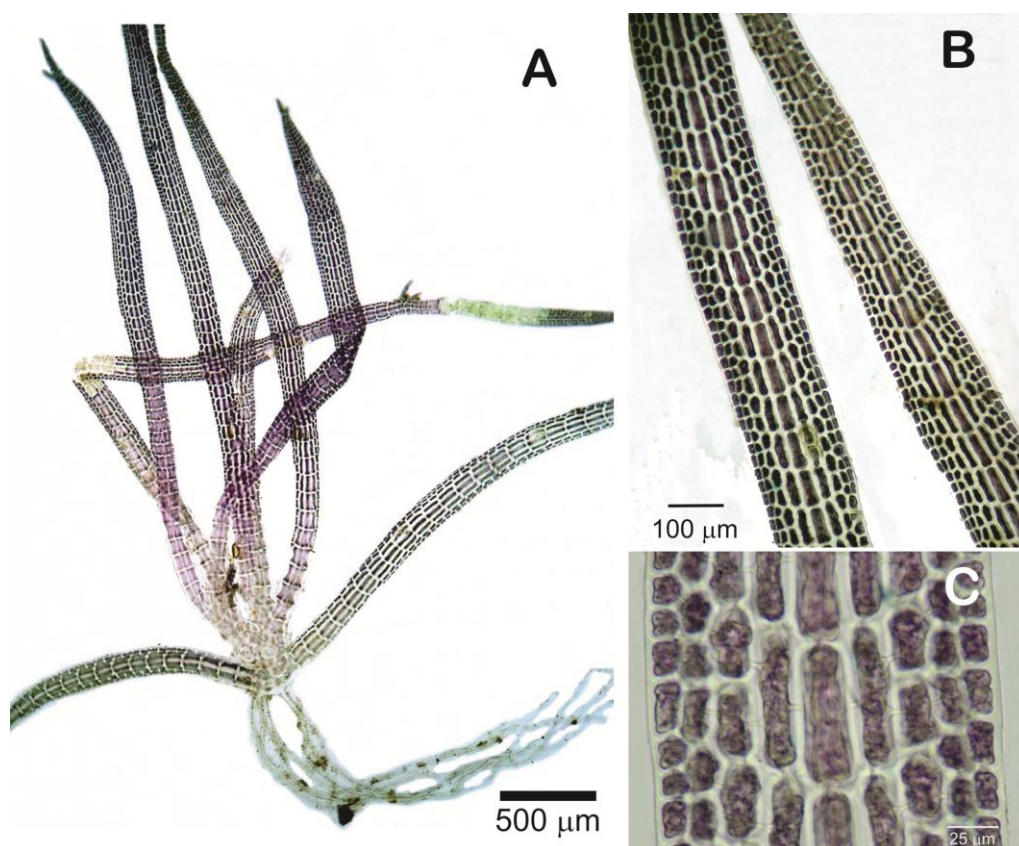
*Caloglossa rotundata* não foi encontrada na área de estudo e descrição e ilustrações detalhadas dessa espécie são fornecidas por Kano *et al.* (2016, submetido).



**Figura 19** - *Caloglossa apomeiotica*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação. C- Detalhe ápice fértil. D- Detalhe dos bisporângios (vista superficial corada com azul de anilina 1% acidificada com HCl 1N). Note tetrasporângio em meio aos bisporângios.



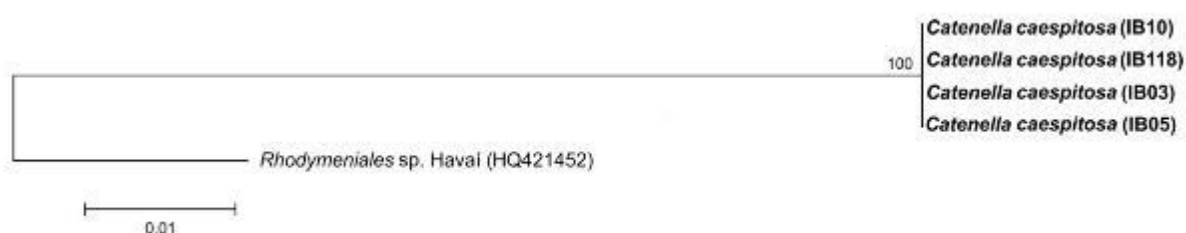
**Figura 20** – *Caloglossa confusa*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe da constrição. C- Detalhe da constrição com rizoides. D- Detalhe da fronde mostrado nervura central.



**Figura 21** – *Caloglossa ogasawaraensis*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe filamento delgado. C- Detalhe da fronde.

### 5.3.3. Gênero *Catenella* Greville

Para a análise com o UPA foram geradas quatro sequências de *C. caespitosa*. Não há sequências desse marcador disponíveis para comparação nos bancos de dados. Foi gerada uma matriz com um alinhamento final de 369 pb usando-se uma sequência do GenBank, que apresentou maior similaridade com as nossas sequências, denominada de *Rhodymeniales* sp. (Sherwood *et al.* 2010). Nossas amostras de *C. caespitosa* são 100% idênticas para esse marcador (Fig. 22).

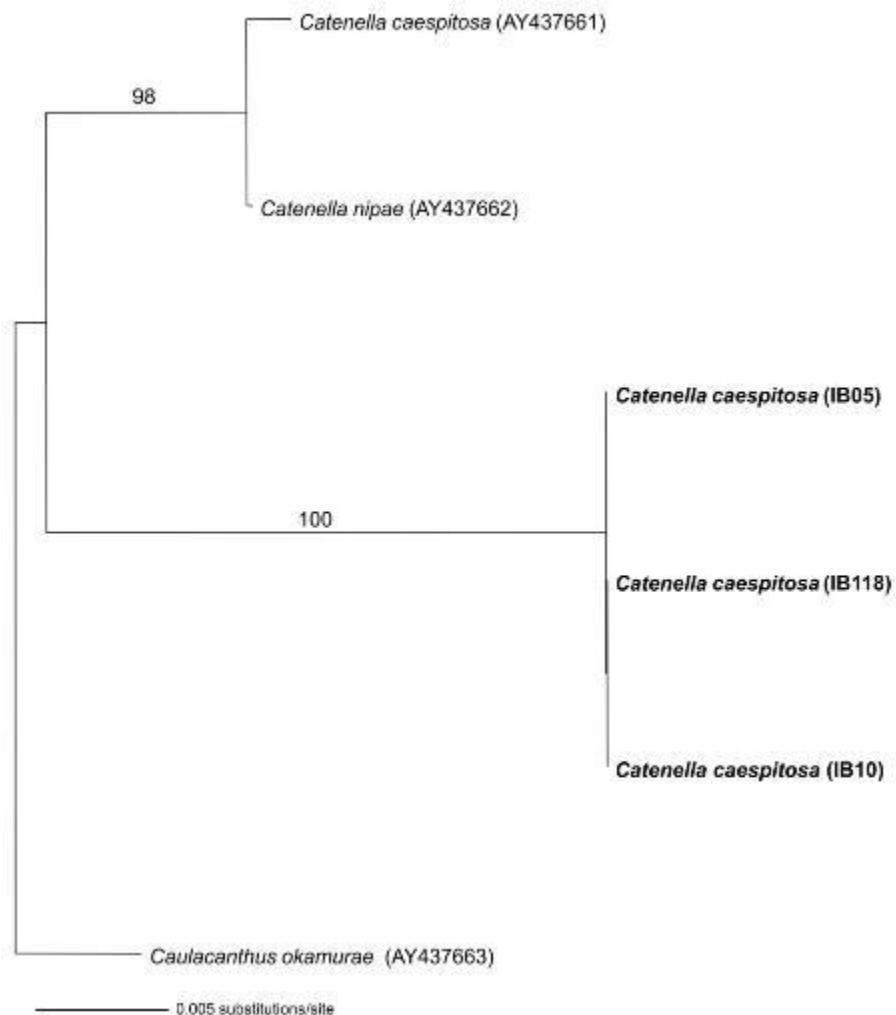


**Figura 22** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA para o gênero *Catenella*. O valor de bootstrap (2000 réplicas) está representado no ramo. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e a retirada do Genbank está seguida do local de coleta e do número de acesso.

Uma única sequência de *C. caespitosa* (IB05) foi obtida para o COI-5P, entretanto não há sequências desse marcador disponíveis nos bancos de dados para comparação. Apenas cinco sequências do gênero *Catenella* estão disponíveis no GenBank, sendo duas do marcador SSU rDNA, duas do *cox2* e uma do espaçador *rbcl-S*. Não há nenhuma sequência do gênero disponibilizada no BOLD (<http://www.barcodinglife.org>). Devido à falta de sequências nos bancos de dados de marcadores do tipo "DNA Barcode" e do *rbcl*, foram geradas sequências do SSU para as nossas amostras visando comparar com as disponibilizadas no GenBank.

A matriz de SSU foi gerada com seis sequências, sendo três sequências parciais obtidas nesse estudo e três do GenBank, com *Caulacanthus okamurae* Yamada (AY437663) usada como grupo externo. O alinhamento final foi de 533 pb. A Figura 23 mostra a árvore de NJ gerada para o SSU. Nossas amostras não apresentaram divergência intraespecífica, sendo 100% idênticas. As sequências do banco de dados, ambas de Saunders *et al.* (2004), *C. caespitosa* (AY437661) e *C. nipae* Zanardini (AY437662) divergiram em apenas 0,018% (1 pb) em 1791 posições. Nossas

amostras divergiram dessas últimas de 2,8% (15 pb) a 3,0% (16 pb) em 533 posições, indicando que se trata de táxons distintos.



**Figura 23** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador SSU para o gênero *Catenella*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as retiradas no Genbank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso.

O gênero *Catenella*, comum em regiões tropicais e subtropicais do mundo e conspícuo em flora de manguezais, inclui 12 espécies e categorias infraespecíficas, das quais seis são aceitas taxonomicamente (M.D. Guiry in Guiry & Guiry 2016).

*Catenella* é de fácil reconhecimento por seu talo essencialmente rastejante, regularmente constricto com segmentos cilíndricos ou comprimidos, fusiformes ou ovais, com ramificação dicotômica ou tricotômica nas constrictões (Taylor 1960, Joly 1965) (Fig. 24).

Duas espécies são referidas para o litoral brasileiro: *C. caespitosa* [como *C. repens* (Lightfoot) Batters (Joly 1957, 1965)], distribuída do Paraná ao Maranhão (Oliveira-Carvalho & Pereira 2016), e *C. impudica* (Montagne) J. Agardh com ocorrência restrita a Santa Catarina e São Paulo (Oliveira Filho 1977, Oliveira-Carvalho & Pereira 2016). *Catenella impudica* foi citada por Möbius (1889) para Santa Catarina e por Luederwaldt (1919) para São Paulo, sendo compilada na obra de Taylor (1960). Essa espécie nunca mais foi citada para o litoral brasileiro e, de acordo com Oliveira Filho (1977), *C. impudica* é rara e muito próxima de *C. caespitosa* (como *C. repens*) necessitando de estudos mais detalhados. De acordo com Cutrim (1998), as citações de *C. impudica* de Luederwaldt (1919) para os manguezais de São Paulo e de Santos correspondem a *C. caespitosa*, embora Cutrim (1998) não tenha justificado esta afirmação.

As espécies são separadas pela estrutura de fixação do talo, cujos haptera em *C. impudica* são formados a partir de segmentos terminais alongados projetados na axila das dicotomias, enquanto em *C. caespitosa* os haptera são formados como protuberâncias flagelares a partir de pontos de ramificação, mas não como segmentos regulares do ramo (Taylor 1960).

Nossos resultados moleculares como o SSU sugerem que a citação de *C. caespitosa* para o Brasil pode estar equivocada. Entretanto, esses resultados são ainda muito preliminares para qualquer afirmação conclusiva. Das seis espécies aceitas taxonomicamente, apenas duas foram sequenciadas (*C. caespitosa* e *C. nipae*), porém para nenhum marcador do tipo “DNA Barcode” e não há sequências da localidade tipo para comparação (Side Rocks, Anglesey, Wales, UK). O gênero necessita de investigações mais aprofundadas tanto moleculares quanto morfológicas para esclarecer sua diversidade específica.



**Figura 24** – *Catenella caespitosa*. Aspecto geral do talo. Note segmentos ovais e achatados com constrictões bem evidentes e ramificação dicotômica ou tricotômica.

## 5.4. Chlorophyta

### 5.4.1. Gênero *Boodleopsis* Gepp & E.S. Gepp

A análise molecular com o gênero *Boodleopsis* foi feita a partir de duas sequências parciais do gene *rbcL* para a espécie *B. vaucheroidea*. Não foi possível obter sequências para *B. pusilla*. Além do *rbcL*, tentativas de sequenciamento com os todos os demais marcadores utilizados neste estudo falharam para as duas espécies. Apenas uma sequência parcial de *rbcL* de *Boodleopsis* está depositada no banco de dados para comparação, *B. pusilla*, procedente de Cockroach Bay, Flórida, EUA (DQ469320).

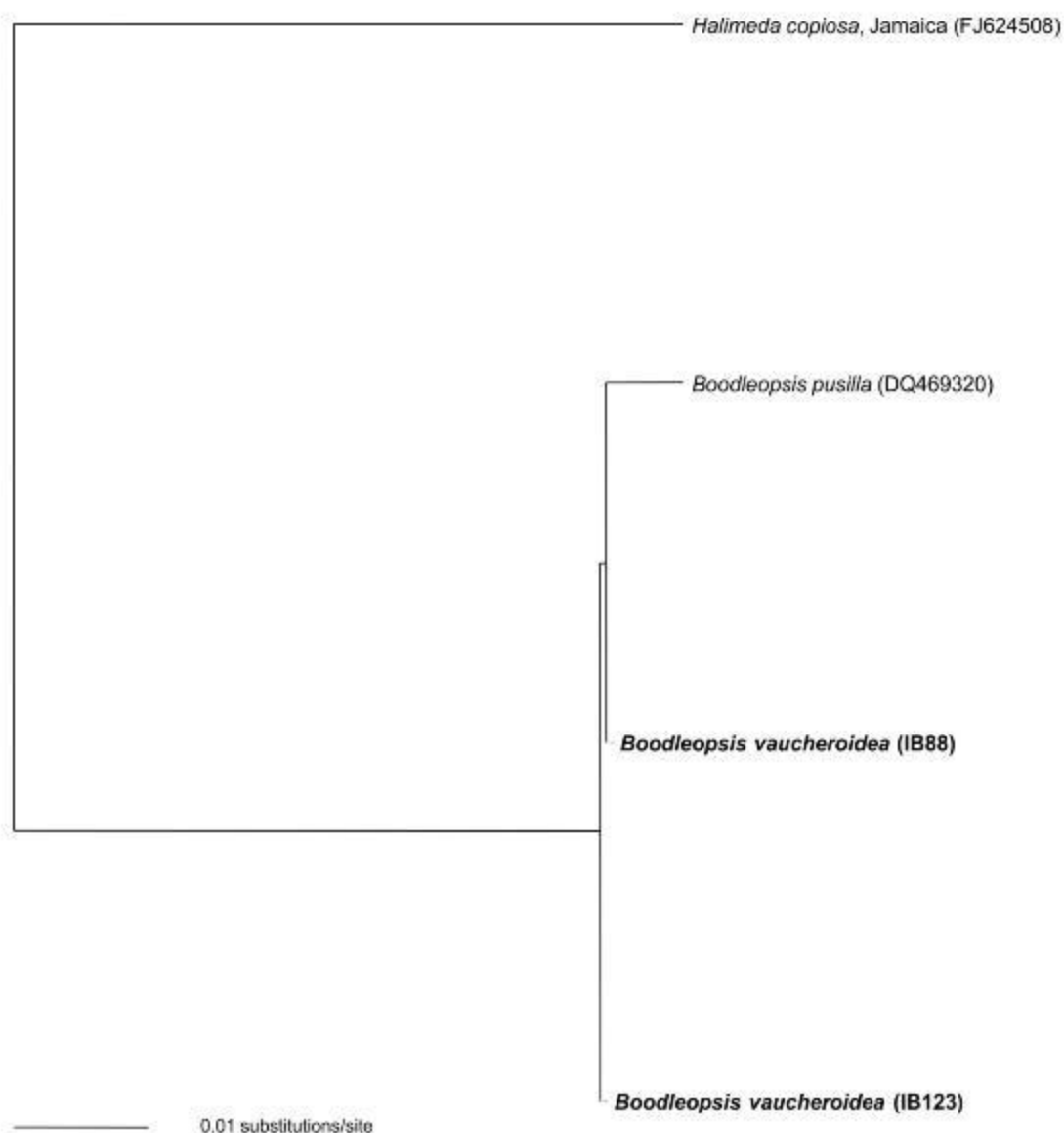
Foi gerada uma matriz com quatro sequências, duas de *B. vaucheroidea* obtidas neste trabalho e duas do GenBank, *B. pusilla* e *Halimeda copiosa* Goreau & E.A. Graham (FJ624508), usada como grupo externo. O alinhamento final consistiu em 598 pb. A árvore de NJ é mostrada na Fig. 25. As sequências de *B. vaucheroidea* são idênticas e divergiram de *B. pusilla* da Flórida em 0,5% (3 pb).

O gênero *Boodleopsis*, com distribuição tropical a subtropical, inclui nove espécies, todas aceitas taxonomicamente (M.D. Guiry in Guiry & Guiry 2016). Espécies de *Boodleopsis* são encontradas em manguezais e em costões rochosos (Taylor *et al.* 1953), crescendo desde o supralitoral até o infralitoral (Calderón-Sáenz & Schnetter 1989, Littler & Littler 2000).

*Boodleopsis pusilla*, descrita originalmente como *Dichotomosiphon pusillus* F.S. Collins, foi citada pela primeira vez para o Brasil crescendo sobre pneumatóforos de *Avicennia* na Baía de Guaratuba, Paraná, por Taylor *et al.* (1953), que providenciaram a nova combinação para o gênero *Boodleopsis*. A espécie possui ampla distribuição litoral brasileiro, se estendendo de Santa Catarina (Hadlich 1984) ao Amapá (Paula *et al.* 1989). *Boodleopsis pusilla* é comumente encontrada em manguezais formando tufos emaranhados sobre pneumatóforos ou fundos lodosos (Joly 1965) e também em costões rochosos de baías calmas (Taylor *et al.* 1953).

*Boodleopsis pusilla* é caracterizada por seus filamentos cenocíticos ramificados de forma dicotômica (raramente tricotômica, irregular ou verticilada) com constrictões regulares profundas a rasas nas dicotomias, vestigiais ao longo do talo, e dicotomias em ângulo agudo, 60-80° (Taylor *et al.* 1953, Joly 1965, Yoneshigue-Braga 1970, Kanawaga 1984, Calderón-Sáenz & Schnetter 1989, Barata 2004, Coto & Pupo 2009, Almeida 2013).



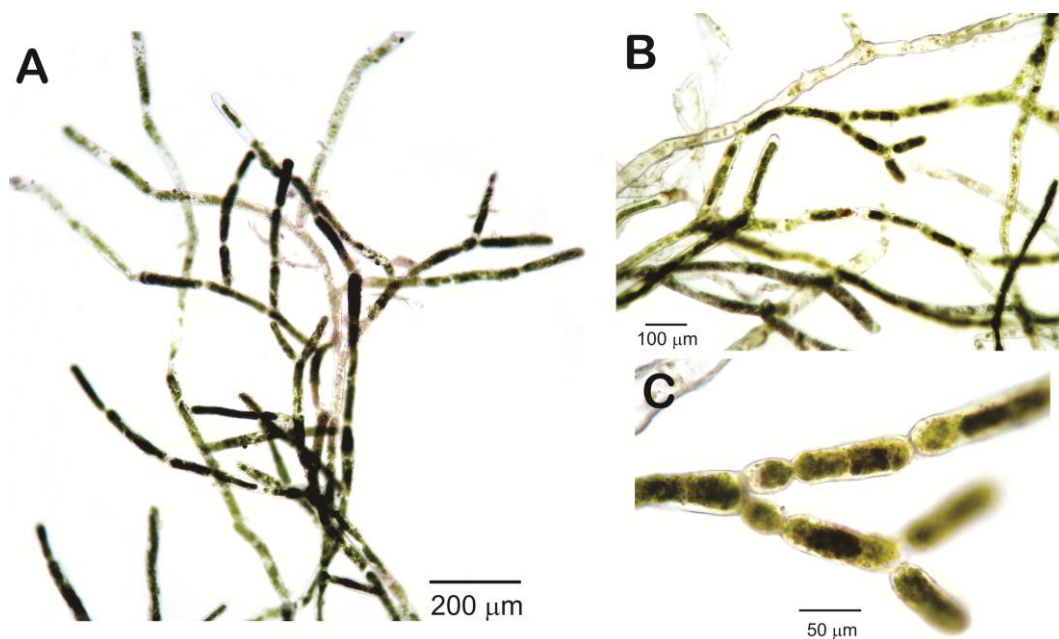


**Figura 25** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador *rbcl* para o gênero *Boodleopsis*. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore e as sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta, quando disponível, e do número de acesso.

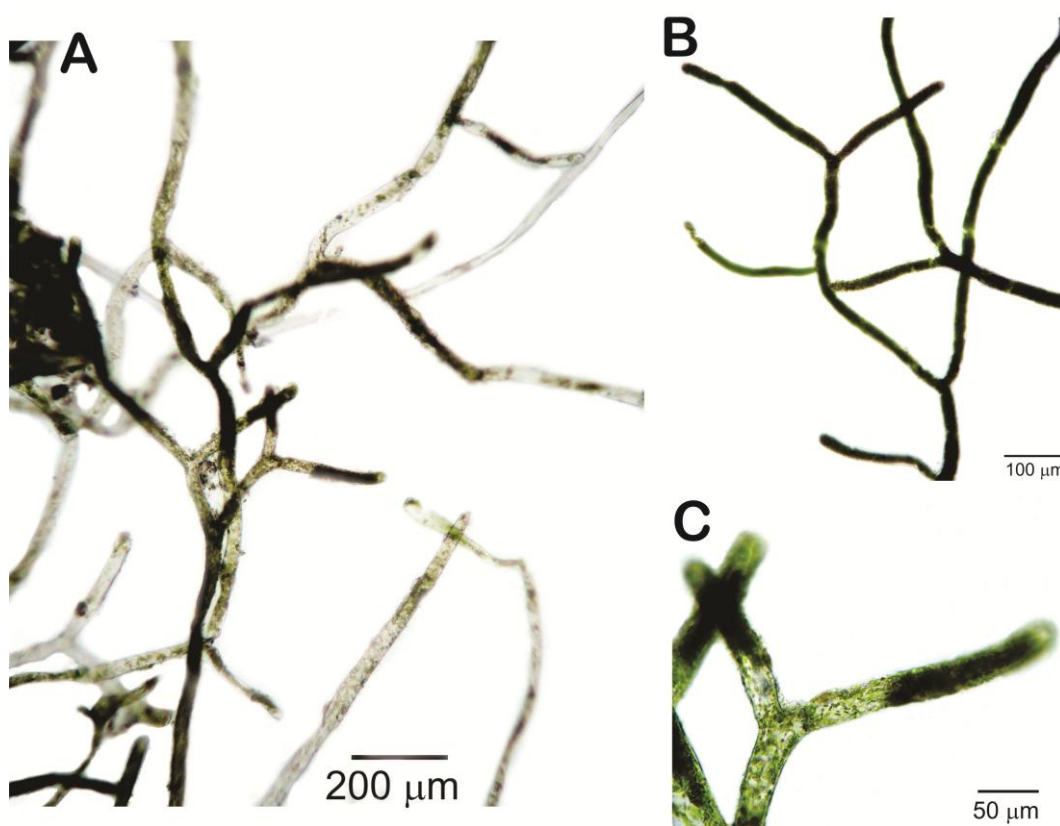
*Boodleopsis vaucheroidea* foi descrita originalmente para a Colômbia (Caribe) por Calderón-Sáenz & Schnetter (1989). A espécie foi citada pela primeira vez para o Brasil crescendo em costões rochosos da Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro, por Cassano *et al.* (2004). A espécie é distinta de *B. pusilla* pela sua ramificação divaricada em ângulo de 90°–140°, raramente menor, sem contrações nas dicotomias (Cassano *et al.* 2004). Características secundárias para a separação desta espécie

de *B. pusilla* incluem: o maior diâmetro dos filamentos eretos, núcleos menores, cloroplastos normalmente discoides com dois grãos de amido em *B. vaucheroidea* (Calderón-Sáenz & Schnetter 1989). Entretanto, Cassano *et al.* (2004) verificaram sobreposição do diâmetro dos filamentos, variação na forma dos cloroplastos e número de grãos de amido entre *B. vaucheroidea* e *B. pusilla* descritas por diferentes autores. No presente estudo, nossos espécimes de *B. vaucheroidea* mostraram menor diâmetro dos filamentos eretos (15,7-29 µm de diâmetro vs. 21,5-36 µm de diâmetro em *B. pusilla*), embora haja sobreposição deste caráter nas duas espécies estudadas. Espécimes de *B. vaucheroidea* foram cultivados por Cassano *et al.* (2004) e as características diagnósticas da espécie foram mantidas em cultura, i.e., contrações ausentes nas dicotomias e râmulos divaricados. As autoras salientaram a possibilidade de *B. vaucheroidea* ter sido identificada erroneamente como *B. pusilla* para outras localidades do Brasil e recomendaram a reavaliação das citações *B. pusilla* para o litoral brasileiro.

Morfologicamente, os espécimes de *B. pusilla* (Fig. 26A-C) e *B. vaucheroidea* (Fig. 27A-C) da Ilha Barnabé foram facilmente identificados, especialmente por se encaixarem nas características diagnósticas de valor taxonômico usadas para a separação das espécies, como o ângulo dos râmulos e a presença ou ausência de contrações nas dicotomias. Em contrapartida, nossos resultados moleculares não são conclusivos, já que amostras de *B. pusilla* não puderam ser sequenciadas, mesmo após várias tentativas, para comparação com as sequências de *B. vaucheroidea*. A única sequência parcial de *rbcL* de *B. pusilla* do GenBank, proveniente da Flórida, região próxima as localidades-tipo, Jamaica e Bermuda (Leliaert *et al.* 2001), mostrou baixa divergência genética (0,5%) com nossas amostras de *B. vaucheroidea*. O esclarecimento dessas entidades taxonômicas depende de uma maior amostragem e sequenciamento completo do *rbcL* e de outros marcadores moleculares. Há possibilidade dos caracteres considerados de valor taxonômico corresponderem a plasticidade fenotípica, e, portanto, a coespecificidade desses táxons não pode ser desconsiderada.



**Figura 26** – *Boodleopsis pusilla*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe do padrão de ramificação dicotômico. C- Detalhe das constrictões nas dicotomias e ao longo do filamento.

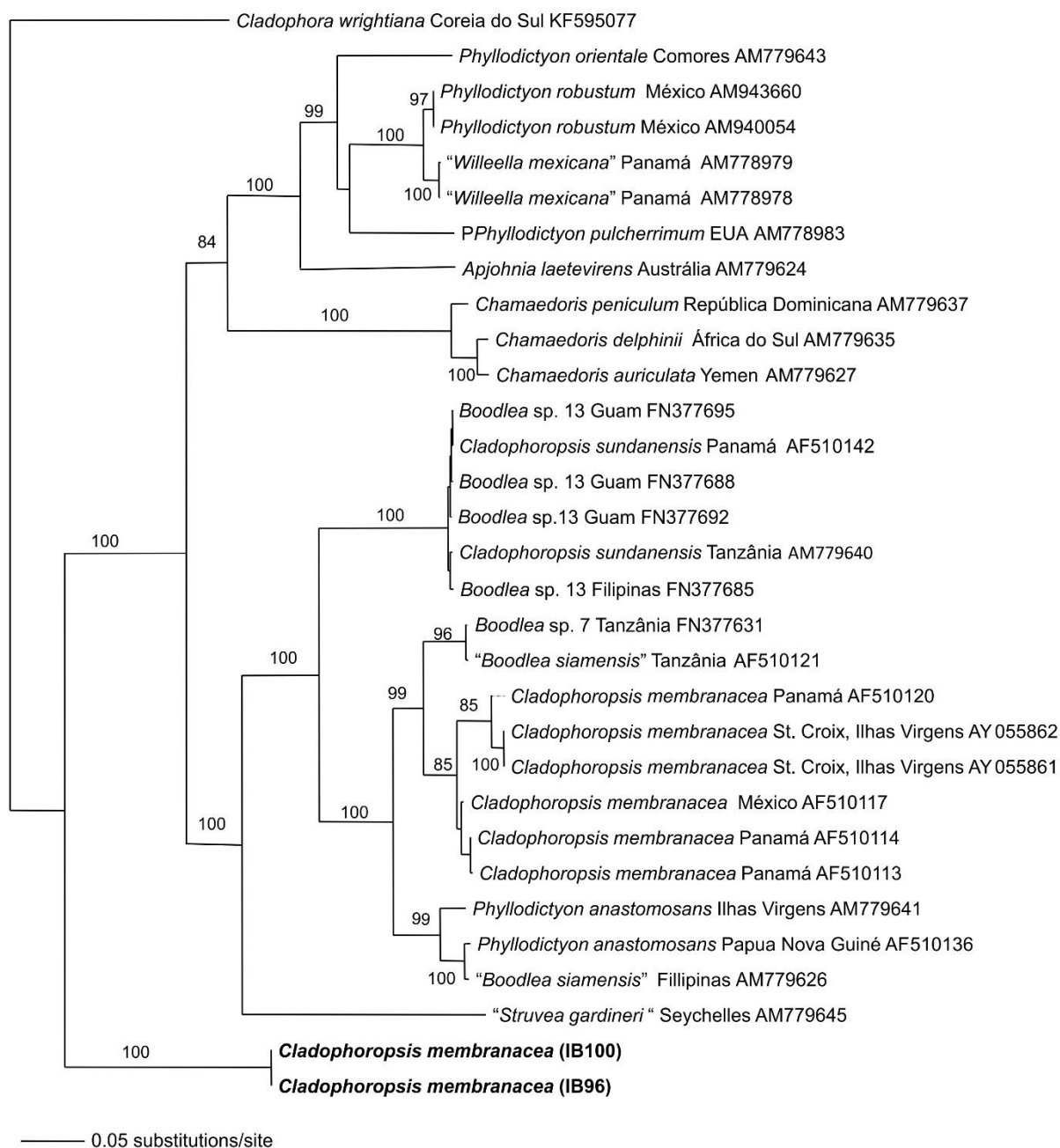


**Figura 27** – *Boodleopsis vaucheroidea*. A- Aspecto geral do talo. B- Detalhe da ramificação dicotômica divaricada. C- Detalhe dos râmulos sem constricção nas dicotomias.

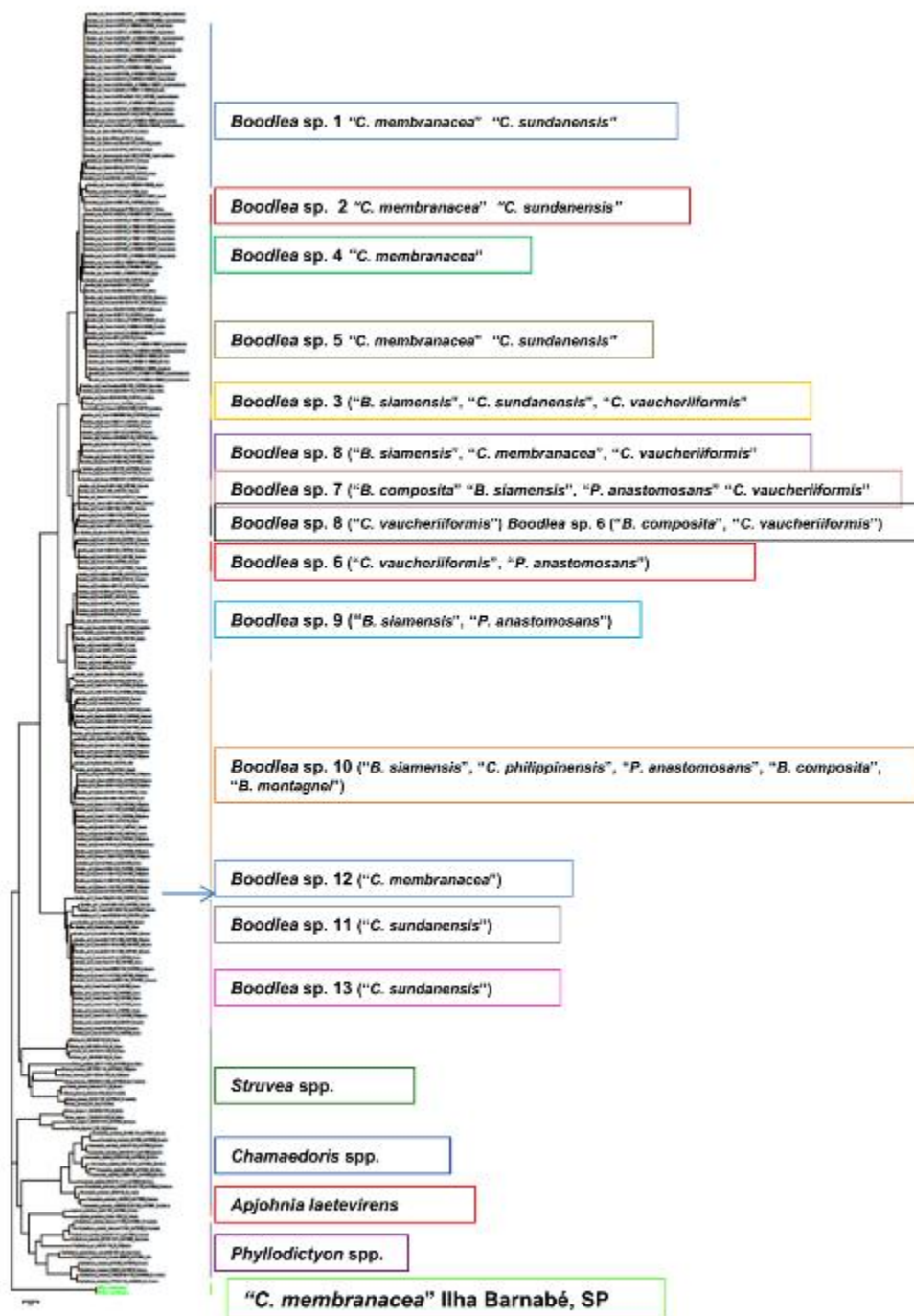
#### 5.4.2. Gênero *Cladophoropsis* Børgesen

A análise molecular do gênero *Cladophoropsis* foi baseada em sequências do marcador ITS rDNA nuclear (ITS 1, ITS 2 e 5.8S), uma vez que as numerosas tentativas de amplificação do marcador *rbcL* e dos marcadores do tipo “DNA Barcode”, incluindo o *tufA*, eleito “DNA Barcode” padrão para algas verdes, falharam. Além disso, a disponibilidade de inúmeras sequências de ITS rDNA nuclear para a família Boodleaceae no banco de dados viabilizou uma ampla comparação entre as sequências. A árvore de NJ (Fig. 28) foi construída com 31 sequências, duas geradas neste trabalho e 29 provenientes do GenBank, com *Cladophora wrightiana* Harvey (KF595077) usada como grupo externo. O alinhamento final consistiu em 1325 pb. O ITS rDNA nuclear é um marcador altamente variável e, portanto, muitas regiões de alinhamento são instáveis. No entanto, na análise gerada os agrupamentos correspondentes aos gêneros e espécies são claramente observáveis.

As nossas amostras de *C. membranacea*, 100% idênticas (IB96 e IB100), se posicionaram em um ramo isolado e não são relacionadas a nenhuma sequência de ITS rDNA nuclear disponível nos bancos de dados. O clado de *C. membranacea* do GenBank, que agrupou amostras da localidade tipo (Saint Croix, Ilhas Virgens, EUA), do Panamá e do México, com suporte moderado (85%), se posicionou molecularmente distante das amostras brasileiras. Uma análise de NJ com uma maior amostragem (218 sequências), inclusive com sequências inéditas de Boodleaceae disponibilizadas gentilmente por Frederik Leliaert (Universidade de Ghent, Bélgica) corrobora que as amostras brasileiras de *C. membranacea* são distintas de qualquer espécie ou mesmo gênero da família Boodleaceae (Fig. 29). Espécimes com morfologia *C. membranacea* estão espalhados em sete clados distintos, nomeados por Leliaert *et al.* (2009) como *Boodlea* sp. 1, *Boodlea* sp. 2, *Boodlea* sp. 4, *Boodlea* sp. 5, *Boodlea* sp. 8, *Boodlea* sp. 12, além do clado de *C. membranacea* da Ilha Barnabé, SP. Amostras da localidade tipo estão posicionadas no clado *Boodlea* sp. 5.



**Figura 28** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador ITS rDNA nuclear para o gênero *Cladophoropsis*. Apenas valores de bootstrap maiores que 70% (2000 réplicas) estão representados nos ramos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em negrito na árvore. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do local de coleta e do número de acesso.



**Figura 29** - Árvore de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador ITS rDNA nuclear para o gênero *Cladophoropsis*. Espécimes com morfologia *C. membranacea* estão espalhados em sete clados distintos. As sequências obtidas neste estudo estão representadas em verde na árvore.

O gênero *Cladophoropsis* abriga 41 espécies e categorias infraespecíficas, das quais 12 são aceitas taxonomicamente (M.D. Guiry in Guiry & Guiry 2016). *Cladophoropsis* é caracteristicamente reconhecido pela ausência de septos na base de ramos laterais, pelo menos nos ramos jovens (Joly 1965, Barata 2004, Coto & Pupo 2009). A espécie *Cladophoropsis membranacea* foi citada pela primeira vez para o Brasil para Pernambuco por Taylor (1931) como *Aegagropila membranacea* (C.Agardh) Kützing). A espécie possui ampla distribuição no litoral brasileiro, tendo como limite sul o estado de Santa Catarina e como limite norte, o estado do Maranhão (Moura 2016a). É reconhecidamente uma espécie encontrada com frequência em manguezais, mas também em recifes de arenito e costões rochosos com ampla distribuição em águas tropicais e temperadas quentes (Joly 1965, Leliaert & Coppejans 2006, Alves *et al.* 2012, Almeida 2013). *Cladophoropsis membranacea* é próxima morfologicamente de *C. macromeres* W.R. Taylor, uma espécie também citada para o Brasil, porém de ocorrência restrita aos estados de Santa Catarina, Rio de Janeiro, Paraíba e Rio Grande do Norte (Moura 2016a). *Cladophoropsis macromeres* foi citada pela primeira vez para o litoral do Brasil a partir de material coletado no Rio de Janeiro (Yoneshigue-Valentin & Amado Filho 1989). *Cladophoropsis membranacea* pode ser diferenciada de *C. macromeres* pelo diâmetro do filamento principal, até aproximadamente duas vezes maior em *C. macromeres* (280-510  $\mu\text{m}$  de diâmetro vs. 80-310  $\mu\text{m}$  em *C. membranacea*), pela presença de septos em alguns ramos laterais mais velhos em *C. membranacea*, ausentes em *C. macromeres* e pelo talo formando tapetes soltos, não fixos ao substrato, ou frouxamente emaranhado a outras macroalgas em *C. macromeres* (Taylor 1960, Yoneshigue-Valentin & Amado Filho 1989, Leliaert & Coppejans 2006, Almeida *et al.* 2012, Alves *et al.* 2012).

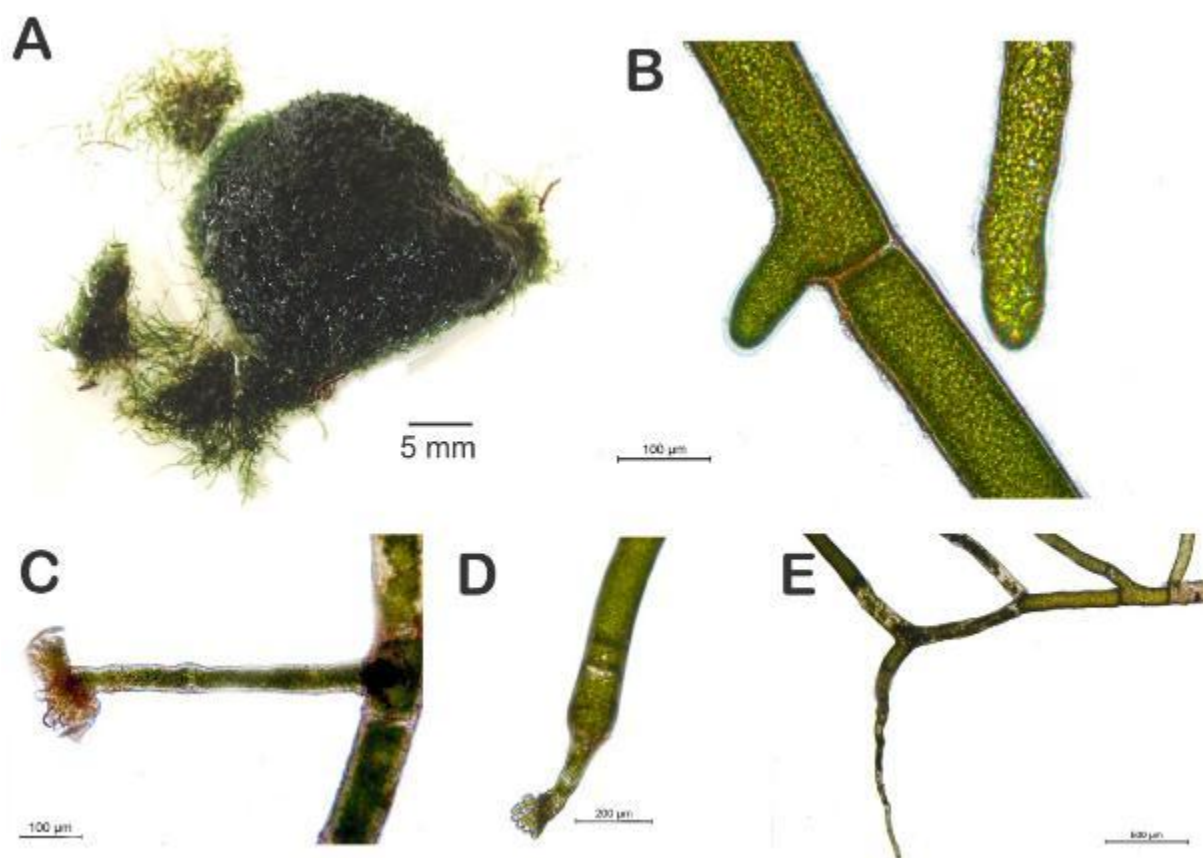
Morfologicamente, nossos exemplares (Fig. 30A-E) se encaixam perfeitamente em *C. membranacea* estando de acordo com as descrições fornecidas na literatura quanto às dimensões das células do eixo principal (75-112,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), ausência de septos na base dos ramos (pelo menos nos ramos jovens), ramificação irregular a unilateral, fixação do talo por células tenaculares oriundas de células basais ou rizoides formados em qualquer parte do talo, células tenaculares também originadas de qualquer parte do talo, nas regiões das ramificações, meio e ápice das células e filamentos fortemente entrelaçados por células tenaculares (Taylor 1960,

Joly 1965, Leliaert & Coppejans 2006, Coto & Pupo 2009, Almeida *et al.* 2012, Alves *et al.* 2012, Almeida 2013).

Desde o início da década de 1990, *Cladophoropsis* é reconhecido como um gênero polifilético, com espécies, incluindo a espécie-tipo, *C. membranacea*, formando um clado com gêneros de “Siphonocladales” (*Boodlea* G. Murray & De Toni, *Phyllodictyon* J.E. Gray, *Struveopsis* Rhyne & H. Robinson, *Struvea* Sonder e *Chamaedoris* Montagne), enquanto outras espécies de *Cladophoropsis* formam um clado com espécies de *Cladophora* Kützing da Seção *Longi-articulatae* (Kooistra *et al.* 1993, Leliaert *et al.* 2003, 2007b, Leliaert & Coppejans 2006). Uma revisão desses gêneros feita por Leliaert *et al.* (2009) usando o marcador ITS rDNA nuclear resultou no reconhecimento de 13 espécies filogenéticas, com um conflito considerável entre as definições de espécies tradicionais e filogenéticas, incluindo diversidade críptica com formas morfológicas idênticas distribuídas em diferentes clados e variação morfológica intraespecífica com a maior parte das espécies filogenéticas contendo uma mistura de diferentes morfologias (Fig. 29). Devido à complexidade evolutiva observada pelos autores e as grandes mudanças nomenclaturais necessárias para acomodar os táxons, Leliaert *et al.* (2009) propuseram considerar todas espécies ou clados dentro de um complexo, chamado de complexo *Boodlea*, salientando que todos (*Cladophoropsis*, *Boodlea*, *Phyllodictyon*, *Struveopsis*, *Struvea* e *Chamaedoris*) poderiam ser reconhecidos como um único gênero. Além disso, como seria impossível fornecer nomes de táxons para as 13 espécies filogenéticas, por não poderem ser ligadas prontamente a tipos nomenclaturais, os autores mantiveram o gênero *Cladophoropsis* para fins de estabilidade taxonômica, aguardando evidência molecular adicional.

*Cladophoropsis membranacea*, assim como *C. macromeres* do Brasil necessitam de uma revisão, empregando-se uma abordagem molecular a partir de uma ampla amostragem no litoral brasileiro. Uma única sequência de SSU rDNA de *C. macromeres* está disponível no GenBank, gerada a partir de uma amostra da localidade tipo (Flórida, EUA). Além de uma maior amostragem das nossas espécies, sequências de outros marcadores como o SSU rDNA e o LSU rDNA seriam necessárias para fins comparativos, assim como seriam informativas para esclarecer a posição filogenética de nossos espécimes dentro das Cladophorales.





**Figura 30** – *Cladophoropsis membranacea*. A- Aspecto geral do talo mostrando denso tufo. B- Detalhe ramo lateral novo sem septo na base. C- Detalhe de rizoide. D- Detalhe da célula tentacular. E- Detalhe da ramificação unilateral e rizoide.

#### 5.4.3. Gênero *Rhizoclonium* Kützing

As espécies de *Rhizoclonium* identificadas na Ilha Barnabé: *R. africanum* Kützing e *R. riparium* (Roth) Kützing foram encontradas em pequenos filamentos emaranhados, principalmente a *Bostrychia* spp. Poucas sequências parciais de LSU, SSU e ITS2 para espécies desse gênero estão depositadas nos bancos de dados. Como o marcador padrão do tipo “DNA Barcode” para as algas verdes, *tufA* é ineficiente para Cladophorales, foram feitas inúmeras tentativas de amplificação com os marcadores ITS rDNA nuclear e SSU para ambas espécies, visando a comparação das sequências com as disponíveis no GenBank. Além disso, foram testados todos os marcadores utilizados neste estudo, entretanto, nenhuma tentativa teve sucesso para qualquer marcador.

O gênero *Rhizoclonium* é considerado cosmopolita ocorrendo em águas marinhas, dulcícolas e salobras, e abriga 78 espécies e categorias infraespecíficas, das quais 32 são aceitas taxonomicamente (M.D. Guiry in Guiry & Guiry 2016). Três espécies de *Rhizoclonium* são referidas para o Brasil: *R. africanum*, *R. riparium* e *R. hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, esta última citada para águas continentais (Branco & Necchi 1998, Moura 2016b). *Rhizoclonium africanum* e *R. riparium* possuem ampla distribuição no litoral brasileiro, se estendendo de Santa Catarina ao Amapá (*R. africanum*) e do Rio Grande do Sul ao Amapá (*R. riparium*) (Moura 2016b). Ambas espécies são comuns em manguezais, mas também encontradas em recifes de arenito e costões rochosos, crescendo da região entremarés até 10 m de profundidade (Alves *et al.* 2009, Rocha-Jorge 2015).

De acordo com Zhao *et al.* (2014), os critérios mais importantes que caracterizam o gênero são: longos filamentos não ramificados, ramificados apenas na região basal do talo ou com ramos rizoidais, e células com múltiplos cloroplastos formando um retículo com vários pirenoides, mais com pouco ou limitado número de núcleos [1-4 (-15)]. Ao contrário da circunscrição tradicional, Zhao *et al.* (2014) afirmam que *Rhizoclonium* pode ter ramos verdadeiros. Os caracteres comumente empregados para delimitação de espécies incluem o diâmetro do filamento, a razão comprimento/largura das células, a presença e números de rizoides e o habitat, se marinho ou de água doce.

Os espécimes de *R. africanum* estudados (Fig. 31A-C) são similares aos descritos por Taylor (1960), Joly (1965, como *Rhizoclonium hookeri* Kützing), Barata (2004), Coto & Pupo (2009), Dawes & Mathieson (2008), Alves *et al.* (2009), Almeida *et al.* (2012) e Rocha-Jorge (2015), especialmente nas medidas de diâmetro dos filamentos.

Morfologicamente, *R. africanum* é segregado de *R. riparium* pelo maior diâmetro do filamento (> 80 µm vs. < 60 µm em *R. riparium*), ramos secundários ocasionais, junção intercalar em ângulo de 90°, semelhantes a “articulação de joelho”, e rizoides laterais multicelulares, enquanto que em *R. riparium* os rizoides laterais são unicelulares (Coppejans *et al.* 2002, Alves *et al.* 2009, Almeida *et al.* 2012). Entretanto, ramificação rizoidal multicelular foi descrita para *R. riparium* por Zhao *et al.* (2014). A presença de rizoides multicelulares e junções intercalares em ângulo de 90° foram

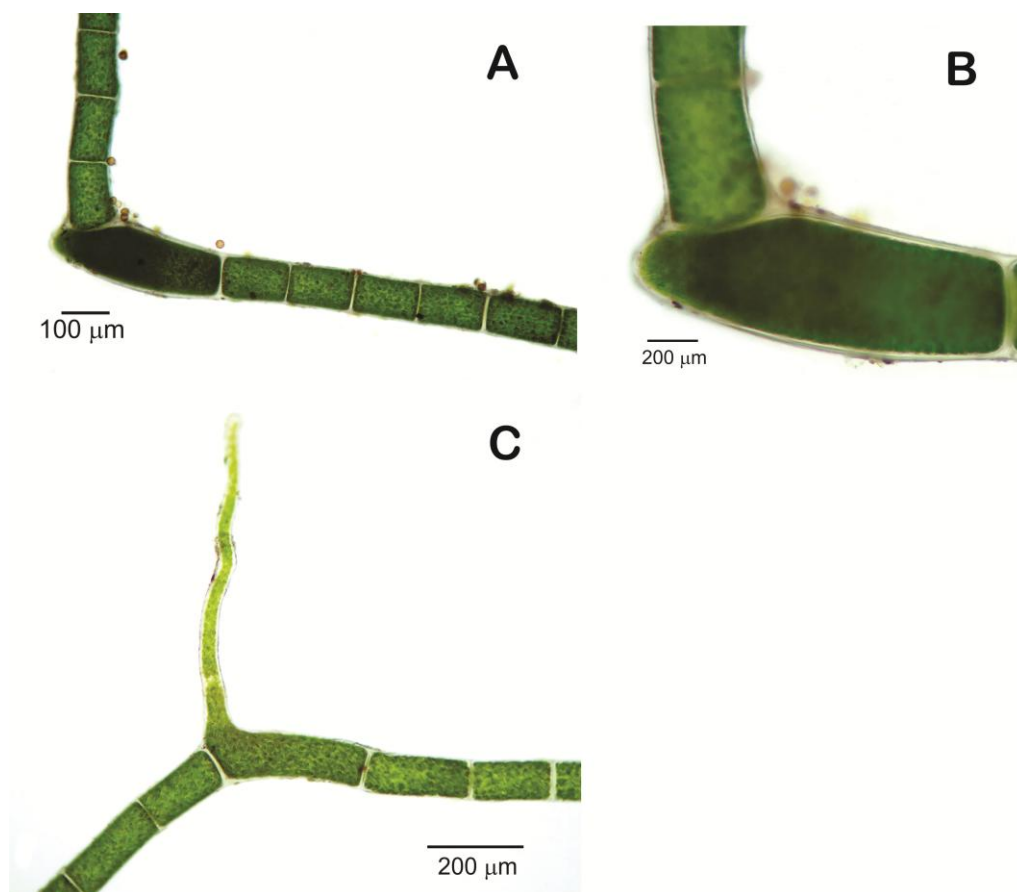
frequentes no material estudado, assim como descrito por Alves *et al.* (2009) e Almeida *et al.* (2012), para material procedente da Bahia. A ocorrência de ramificação secundária no material estudado (Fig.31A-B), também descrita por Alves *et al.* (2009) e ilustrada por Almeida *et al.* (2012, Fig. 4e), corrobora a presença de ramos verdadeiros nesta espécie conforme salientado por Zhao *et al.* (2014).

O material estudado de *R. riparium* (Fig. 32A-C) está de acordo com as descrições dessa espécie fornecidas por Taylor (1960), Joly (1965), Barata (2004), Coto & Pupo (2009), Dawes & Mathieson (2008), Alves *et al.* (2009), Almeida *et al.* (2012) e Rocha-Jorge (2015), especialmente no diâmetro dos filamentos, que não ultrapassa 70 µm (Zhao *et al.* 2014).

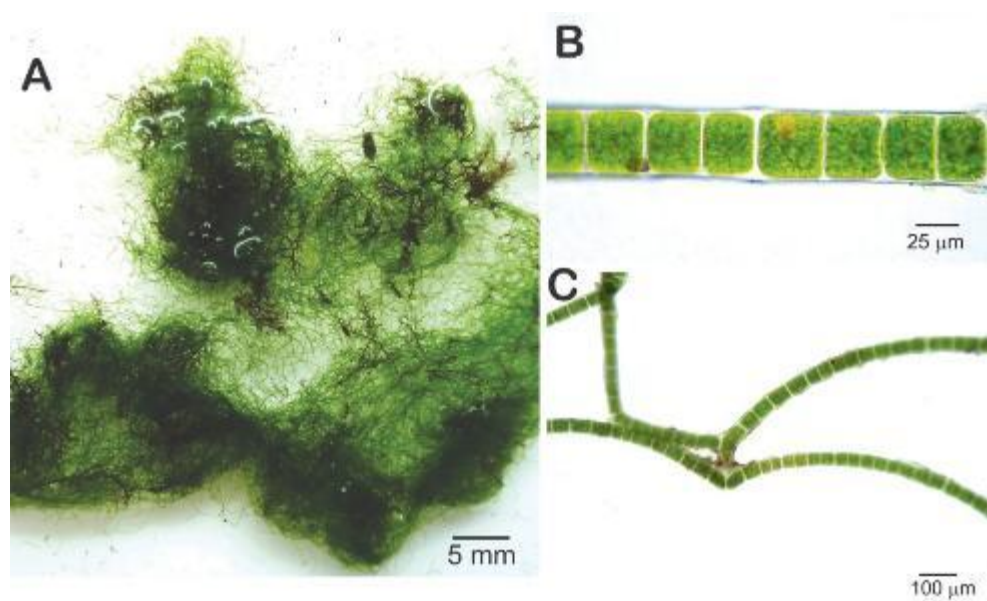
Estudos filogenéticos moleculares tem demonstrado que *Rhizoclonium* é polifilético, posicionando-se em clados que incluem *Cladophora* ou *Chaetomorpha* Kützinger, sugerindo que a morfologia do tipo *Rhizoclonium* (filamentos essencialmente não ramificados com laterais rizoidais) evoluiu várias vezes independentemente em Cladophorales (Hanyuda *et al.* 2002, Leliaert *et al.* 2003).

Dados moleculares têm apontado que a espécie *R. riparium* e táxons morfológicamente relacionados, formam um complexo de espécies crípticas ou possivelmente uma espécie global polimórfica com populações poliploides (Leliaert & Boedeker 2007).

Todas as nossas tentativas de sequenciamento do material coletado falharam e não há nenhum estudo molecular com espécies de *Rhizoclonium* feito no Brasil, indicando que investigações com ampla amostragem e abordagem molecular são necessárias para esclarecer o posicionamento e a delimitação das espécies brasileiras.



**Figura 31 – *Rhizoclonium africanum*.** A- Detalhe da ramificação secundária. B- Detalhe do septo na ramificação. C- Detalhe rizoide multicelular.



**Figura 32 – *Rhizoclonium riparium*.** A- Aspecto geral do talo formando tufos emaranhados. B- Detalhe do filamento unisseriado. C- Detalhe filamento com falsa ramificação.

Apesar dos impactos antrópicos causados na Ilha Barnabé como as construções dos terminais portuários bem como os diversos eventos envolvendo lançamento de produtos químicos na região (derramamentos de óleo) e incêndios (Menghini 2008), a composição de espécies de macroalgas encontrada na área é semelhante à de outros manguezais estudados no Brasil (Eston *et al.* 1992, Yokoya *et al.* 1999, Cunha & Costa 2002, Fontes 2012) e no mundo (Beanland & Woelkerling 1982, Phillips *et al.* 1996, Laursen & King 2000, Zuccarello *et al.* 2012). Considerando apenas Rhodophyta, Fernandes *et al.* (2005) observaram sete espécies para os manguezais do Pará, distribuídos nos gêneros *Bostrychia*, *Caloglossa* e *Catenella*, destas apenas *B. pilulifera* Montagne, referida somente para os estados do Amapá (Paula *et al.* 1989), Pará (Fernandes *et al.* 2005) e Maranhão (Cutrim & Avezedo 2005), não foi encontrada na Ilha Barnabé. No nordeste, Cutrim (1998) e Fontes *et al.* (2007) registraram 14 e nove espécies, respectivamente.

No levantamento de macroalgas de manguezais do Maranhão realizado por Cutrim (1998), além dos gêneros citados acima, foram registradas espécies dos gêneros *Centroceras* Kützinger, *Ceramium* Roth, *Polysiphonia* Greville e *Murrayella* F.Schmitz, enquanto Fontes *et al.* (2007) registraram para manguezal de Permambuco, os gêneros *Murrayella* e *Hypnea*. Esses cinco gêneros não foram encontrados no presente estudo e tampouco no trabalho de Yokoya *et al.* (1999) para a região sudeste do país (São Paulo), para a qual Yokoya *et al.* (1999) observaram nove táxons. Na região sul do país (Santa Catarina), Hadlich & Bouzon (1985) registraram a presença de nove táxons, entre eles espécies dos gêneros *Polysiphonia* e *Murrayella*. No presente estudo foram identificados 10 táxons de Rhodophyta, cuja composição de espécies foi mais similar a encontrada por Yokoya *et al.* (1999) para a Ilha do Cardoso (SP), excetuando o registro de *Bostrychia kelanensis* (como *Stictosiphonia kelanensis* (Grunow ex Post) King & Puttock), não registrada na Ilha Barnabé.

Miranda & Pereira (1989) avaliando a distribuição espaço-temporal das macroalgas no manguezal do Rio Ceará (CE) e correlacionando com as condições hidrológicas locais observaram que a variação da concentração salina influencia a composição de espécies. Assim, em áreas de manguezal mais próximas ao mar, onde não há variações significativas de salinidade, espécies como as dos gêneros citados acima, *Centroceras*, *Ceramium* e *Hypnea*, são comumente encontrados.

Vale ressaltar que em todos os trabalhos citados acima, o gênero *Bostrychia* prevaleceu em número de táxons registrados. Entretanto, a citação de um maior número de táxons de *Caloglossa* encontrado neste estudo em comparação com os anteriores citados acima, e que foi desvendado essencialmente por dados moleculares, aponta para a subestimação desse gênero quando abordado apenas do ponto de vista morfológico.

Em relação as Chlorophyta, Cutrim (1998) citou cinco táxons, entretanto, *Ulva* Linnaeus (como *Enteromorpha* Link) e *Caulerpa* não foram encontrados na Ilha Barnabé. Yokoya *et al.* (1999) registraram oito táxons, desconsiderando *Rhizoclonium kernerii* Stockmayer sinonimizada com *R. riparium*. Entre as algas verdes citadas por Yokoya *et al.* (1999), quatro gêneros: *Gayralia* K.L.Vinogradova (como *Ulvaria* Ruprecht), *Monostroma* Thuret, *Chaetomorpha* Kützing [*C. ligusta* (Kützing) Kützing como *Rhizoclonium tortuosum* (Dillwyn) Kützing] e *Ulva* (como *Enteromorpha*), não foram encontrados na nossa área de estudo. Fontes *et al.* (2007) citaram as mesmas espécies observadas na Ilha Barnabé, com exceção de *B. vaucheroidea* encontrada pela primeira vez em manguezais brasileiros no presente trabalho. Fernandes *et al.* (2005) registraram o maior número de algas verdes em manguezais, nove espécies, entres elas, espécies de *Caulerpa* e *Ulva* (como *Enteromorpha*). Entre todas as algas verdes registradas em manguezais brasileiros, *C. membranacea* foi a espécie mais comum sendo referida em todos os estudos citados acima.

A análise preliminar morfológica realizada por Sena *et al.* (2012) sobre a comunidade de macroalgas que cresce sobre penumatóforos no manguezal da Ilha Barnabé registrou 10 táxons, os mesmos foram reencontrados no presente estudo acrescidos de mais cinco táxons, alguns deles revelados pela aborgagem molecular empregada.

No presente estudo, os gêneros *Bostrychia* e *Caloglossa* foram os mais representativos, cada um com quatro táxons identificados e ocorrendo nas três áreas amostradas em todas as coletas realizadas (Tabela 5). A parasita *D. bostrychiae* foi encontrada em todas as coletas sobre os hospedeiros "*B. calliptera*" e *B. radicans*. Dentre as espécies de *Caloglossa*, *C. ogasawaraensis* foi a mais comum, enquanto

*C. apomeiotica* foi encontrada apenas uma vez, na área 3 – noroeste da Ilha Barnabé. Excetuando *B. vaucheroidea*, cuja ocorrência foi restrita à área 2 em duas épocas do ano, as demais algas verdes foram frequentes ocorrendo em todas as coletas das áreas amostradas.

**Tabela 6** – Ocorrência dos táxons identificados por estações de coleta/amostragem.

Espécies identificadas	Estações de Coleta				
	Área 1 - Norte		Área 2 - Sul		Área 3 - Noroeste
	Fevereiro/2013	Setembro/2013	Setembro/2013	Fevereiro/2014	Junho/2013
<i>B. pusilla</i>	x	x	x	x	x
<i>B. vaucheroidea</i>	-	-	x	x	-
“ <i>C. membranacea</i> ”	x	x	x	x	x
<i>R. africanum</i>	x	x	x	x	x
<i>R. riparium</i>	x	x	x	x	x
“ <i>B. calliptera</i> ”	x	x	x	x	x
<i>B. montagnei</i>	x	x	-	-	-
<i>B. moritziana</i> 1	x	x	-	-	-
<i>B. moritziana</i> 2	-	-	x	x	-
<i>B. radicans</i> 1	x	x	x	x	x
<i>B. radicans</i> 2	x	x	x	x	x
<i>C. apomeiotica</i>	-	-	-	-	x
<i>C. confusa</i>	x	x	-	-	-
<i>C. leprieurii</i>	-	-	x	x	-
<i>C. ogasawaraensis</i>	x	x	x	x	-
<i>C. caespitosa</i>	x	x	x	x	-
<i>D. bostrychia</i>	x	x	x	x	x

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo molecular e morfológico das espécies de macroalgas da Ilha Barnabé permitiu identificar 17 espécies, 12 Rhodophyta e cinco Chlorophyta, das quais apenas três puderam ser confirmadas por comparação com sequências das suas localidades-tipo, as quais apresentaram baixa divergência intraespecífica com as nossas sequências: *C. apomeiotica*, *C. leprieurii* e *C. confusa*. A espécie críptica *C. ogasawaraensis* forma três linhagens genéticas verificadas por Kamiya & West (2014), em uma das quais se enquadraram nossos espécimes (linhagem do Atlântico-

Pacífico/Malásia). Embora não haja sequências da localidade tipo de *C. ogasawaraensis* (Ogasawara-jima, Bonin Islands) para comparação, sequências do Japão, região mais próxima à localidade tipo estão disponíveis, sendo que as sequências japonesas fazem parte de outra linhagem filogenética (Pacífico ocidental/Micronesia/Madagascar). A divergência intraespecífica máxima do *rbcl* entre as três linhagens de *C. ogasawaraensis* (5,2%) indica que estas poderiam ser descritas como espécies distintas. Porém, Kamiya & West (2014) preferiram adotar um posicionamento conservador argumentando que mais características são necessárias para descrever os grupos filogenéticos como espécies diferentes. Nossos resultados mostraram, sem dúvida, que os espécimes brasileiros fazem parte do complexo *C. ogasawaraensis*.

O reconhecimento de espécies crípticas e polifiléticas em *Bostrychia* não é recente na literatura e vem sendo confirmado desde Zuccarello & West (2003, 2006). Das quatro espécies identificadas neste estudo, apenas *B. montagnei* não forma complexo de espécies e mostrou-se bem definida tanto do ponto de vista morfológico quanto molecular, apresentando baixa divergência genética intraespecífica para todos os marcadores utilizados. O complexo *B. radicans/moritziana* forma sete linhagens distintas reconhecidas por Zuccarello *et al.* (2009). Espécimes brasileiros desse complexo, analisados neste estudo, formaram cinco linhagens moleculares com alta divergência intraespecífica. Entretanto, não há características morfológicas que sustentem todas as diferentes linhagens desse complexo. Pelas nossas análises morfológicas, o maior tamanho do talo e o padrão de ramificação alterno-dístico mais denso de *B. radicans* 2 a separa do agrupamento denominado *B. radicans* 1, enquanto talos mais delicados e menos ramificados diferem *B. moritziana* 2 de *B. moritziana* 1. As características taxonômicas de valor diagnóstico correntemente empregadas para separação de espécies de *Bostrychia* são insuficientes para a separação dessas linhagens moleculares.

Nossos espécimes de "*B. calliptera*" apresentaram alta divergência genética com *B. calliptera* de Fontes (2012) e apresentam morfologia *B. pinnata*, atualmente considerada um sinônimo de *B. calliptera*. A possibilidade de restabelecimento de *B. pinnata* deve ser considerada, entretanto, mais estudos morfológicos e moleculares são necessários para redefinição do *status* taxonômico de *B. pinnata*.



Os espécimes identificados como *Catenella caespitosa* neste estudo mostraram alta divergência intraespecífica com sequências dessa espécie disponíveis nos bancos de dados para o marcador SSU rDNA, apesar de morfologicamente se enquadrarem perfeitamente nas descrições de *C. caespitosa* da literatura. Os resultados como o SSU rDNA sugerem que a citação dessa espécie para o Brasil pode estar equivocada. Não há sequências da localidade tipo para comparação (Side Rocks, Anglesey, Wales, UK), tampouco sequências de outros marcadores nos bancos de dados. O estudo molecular do gênero *Catenella* ainda é muito incipiente e aparentemente negligenciado, talvez pela suposta facilidade de identificação genérica e específica. Nossos resultados ainda que preliminares apontam para uma possível diversidade críptica em *C. caespitosa*. As sequências obtidas neste estudo são as primeiras da espécie para o Brasil e há necessidade de maior amostragem e utilização de outros marcadores moleculares, especialmente os do tipo “DNA Barcode”. O gênero merece investigações mais aprofundadas globalmente tanto do ponto de vista molecular quanto morfológico para esclarecer sua diversidade específica.

Para a maioria das espécies de algas verdes encontradas neste estudo não foi possível a confirmação de sua identificação utilizando técnicas moleculares, ou por falhas na amplificação e sequenciamento das amostras ou por falta de sequências nos bancos de dados para comparação. Portanto, a obtenção de sequências para o nosso material foi extremamente laboriosa e problemática exigindo inúmeras tentativas de amplificação e sequenciamento. O marcador padrão do tipo “DNA Barcode” para as algas verdes, *tufA* falhou para todas as espécies analisadas, não apenas para Cladophoraceae, cuja ineficiência já é relatada na literatura (Saunders & Kucera 2010), mas também para o outro representante de Cladophorales (*Cladophoropsis*), assim como para os representantes de Bryopsidales (*Boodleopsis*). Marcadores alternativos foram utilizados como o ITS rDNA nuclear e SSU rDNA, além do *rbcL* e do marcador do tipo “DNA Barcode”, UPA. Todos falharam na amplificação de amostras de *Rhizoclonium* e igualmente não foi possível obter sequências de UPA e SSU rDNA para nenhuma outra espécie de alga verde estudada. Apenas para *Boodleopsis vaucheroidea* foi possível obter sequências parciais de *rbcL*, o que inviabilizou a comparação com nossos espécimes de *B. pusilla*. A comparação entre a única sequência parcial de *rbcL* de *B. pusilla* disponível nos bancos de dados e as nossas amostras de *B. vaucheroidea* mostrou baixa divergência genética (0,5%). A

proposta de uma possível coespecificidade dessas espécies exige maior amostragem, sequenciamento completo do *rbcL* e comparação com sequências das localidades tipo, além do uso de outros marcadores moleculares.

*Cladophoropsis membranacea* forma seis linhagens filogenéticas de acordo com os resultados de ITS rDNA nuclear obtidos por Leliaert *et al.* (2009). Nossos espécimes não se posicionaram em nenhuma delas e se mantiveram externas a todo o complexo *Boodlea*. Mantivemos o nome "*C. membranacea*" seguindo Leliaert *et al.* (2009), entretanto essa espécie necessita de maior amostragem na costa brasileira e a obtenção de sequências de outros marcadores nucleares para melhor compreender o posicionamento de "*C. membranacea*" dentro das Cladophorales. De acordo com Leliaert (com. pess.) apesar de todo o esforço na investigação dessas algas verdes, o clado "Siphonocladales" ainda teria de ser revisto.

Para as algas vermelhas o marcador COI-5P também foi muito problemático para obtenção de sequências com uma taxa de sucesso muito menor do que o UPA. Embora o UPA seja mais conservado, este marcador foi eficiente para o gênero *Bostrychia*, resolvendo praticamente os mesmos grupos genéticos que o COI-5P, com exceção de *B. radicans* com uma linhagem a menos detectada pelo UPA. O UPA também foi eficiente para *Caloglossa*, ao contrário dos resultados de Kano (2015). Não houve sobreposição entre valores de divergência intraespecífica e interespecífica para o UPA pelos nossos resultados, diferentemente do observado por Yang & Kim (2014) para as Halymeniaceae. Entretanto, o UPA pode não ser um marcador efetivo na resolução de espécies estreitamente relacionadas, uma vez que a menor divergência interespecífica poderia levar a uma subestimação da diversidade, como já salientado na literatura (Saunders & Kucera 2010, Clarkston & Saunders 2013).

Os resultados obtidos neste estudo sobre as macroalgas da Ilha Barnabé demonstram que é necessário um grande esforço amostral e maiores análises moleculares para se desvendar a diversidade específica de macroalgas de manguezais brasileiros.

## REFERÊNCIAS

- Agostinho, D.C. & Necchi Jr., O. 2014. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycologia* 53: 561-570.
- Almeida, W.R. 2013. *Macroalgas marinhas bentônicas da Ilha Bimbarras, região norte da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana. 408 p.
- Almeida, W.R., Alves, A.M., Guimarães, S.M.P.B. & Moura, C.W.N. 2012. Cladophorales and Siphonocladales (Chlorophyta) from Bimbarras Island, Todos os Santos Bay, Bahia State, Brazil. *Iheringia, Sér. Bot.* 67: 149-164.
- Alvarez, I. & Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution* 29: 417-434.
- Alves, A.M., Moura, C.W.N., Alves, G.L. & Gestinari, L.M.S. 2009. Os gêneros *Chaetomorpha* Kütz. nom. cons. e *Rhizoclonium* Kütz. (Chlorophyta) do litoral do Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 545-570.
- Barata, D. 2004. *Clorófitas marinhas bentônicas do Estado do Espírito Santo*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 210p.
- Barata, D. 2008. *Taxonomia e filogenia do gênero Caulerpa J.V. Lamouroux (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil*. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo, 200p.
- Barros-Barreto, M.B., McIvor, L., Maggs, C.A. & Ferreira, P.C.G. 2006. Molecular systematics of *Ceramium* and *Centroceras* (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Brazil. *Journal of Phycology* 42: 905–921.
- Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A. & Ragan M.A. 1992. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia* 31: 510–522.
- Bouzon, Z.L. & Ouriques, L.C. 1999. Occurrence and distribution of *Bostrychia* and *Caloglossa* (Rhodophyta, Ceramiales) in the Ratoles River Mangrove, Florianópolis-SC-Brazil. *Insula* 28:43-52.
- Branco, L.H.Z. & Necchi, O.Jr. 1998. Distribution of stream macroalgae in three tropical drainage basin of southeastern Brazil. *Archiv für Hydrobiologie* 142: 241-256.
- Calderón-Sáenz, E. & Schnetter, R. 1989. The life histories of *Boodleopsis vaucherioidea* sp. nov. and *B. pusilla* (Caulerpales) and their phylogenetic implications. *Phycologia* 28: 476–490.
- Caridade, E. & Ferreira-Correia, M.M. 2007. Taxonomia das macroalgas dos manguezais da Baía de Turiaçu, Estado do Maranhão, Brasil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia* 65085:53.
- Cassano, V. 2009. *Taxonomia e filogenia do complexo Laurencia (Ceramiaceae, Rhodophyta), com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil*. São Paulo, Tese de Doutorado, Instituto de Botânica de São Paulo. 328p.

- Cassano, V., Brito, L.V.R. & Széchy, M.T.M. 2004. The occurrence of *Boodleopsis vaucherioidea* Calderón-Sáenz *et* Schnetter (Udoteaceae, Chlorophyta) in Brazil. *Botanica Marina* 47: 251-254.
- Cassano, V., Díaz-Larrea, J., Sentíes, A., Oliveira, M.C., Gil-Rodríguez, M.C. & Fujii, M.T. 2009. Evidence for the conspecificity of *Palisada papillosa* with *P. perforata* (Ceramiales, Rhodophyta) from the western and eastern Atlantic Ocean on the basis of morphological and molecular analyses. *Phycologia* 48: 86–100.
- Cassano, V., Oliveira, M.C., Gil-Rodríguez, M.C., Sentíes, A., Díaz-Larrea, J. & Fujii, M.T. 2012. Molecular support for the establishment of the new genus *Laurenciella* within the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 55: 349-357
- Chase, M.W.; Salamin, N.; Wilkinson, M.; Dunwell, J.M.; Kesanakurthi, R.P.; Haidar, N.; Savolainen, V. 2005 Land plants and DNA barcoding: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, B 360.
- Clarkston, B.E. & Saunders, G.W. 2010. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family *Kallymeniaceae* (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* 88:119–131.
- Clarkston B.E. & Saunders G.W. 2013. Resolving species diversity in the red algal genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Gigartinales) in Canada using molecular assisted alpha taxonomy. *European Journal of Phycology* 48: 27-46.
- CETESB. 1991. Avaliação do estado da degradação dos ecossistemas da Baixada Santista. CETESB, São Paulo.
- Coppejans, E., Leliaert, F. & Schils, T. 2002. New records of marine benthic algae for the Mozambican coast, collected at Inhaca Island. *South African Journal of Botany* 68:342-348.
- Cordeiro-Marino, M. 1978. Rodofíceas bentônicas marinhas do estado de Santa Catarina. *Rickia* 7: 1-243.
- Costa E.S., Plastino E.M., Petti R., Oliveira E.C. & Oliveira M.C. 2012. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil-a DNA barcoding approach. *Journal of Applied Phycology* 24: 1643 - 1653.
- Coto, A.C.S.P. & Pupo, D. 2006. *Flora ficológica do Estado de São Paulo*, vol. 3. Ulvophyceae, São Carlos: RiMa Editora, FAPESP, 86p.
- Cunha, S.R. & Costa, C.S. 2002. Gradientes de salinidade e frequência de alagamento como determinantes da distribuição e biomassa de macroalgas associadas a troncos de manguezais na Baía de Babitonga, SC. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 6:93–102.
- Cunha, S.R. & Duarte, N.R. 2002. Taxas Fotossintéticas e Respiratórias de Macroalgas do Gênero *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 6:103–110.
- Cunha, S.R., Nascimento, J., Zacharjasiewicz, G., Crestani, D., Mafra Jr, L.L., Pazeto, F., Sant'anna, F. & Costa, C. 1999. Distribuição e biomassa de macroalgas em um manguezal da Baía da Babitonga, SC: Resultados Preliminares. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 3:1–15.

- Curtis, N. E., Dawes, C. J. and Pierce, S. K. 2008. Phylogenetic analysis of the large subunit rubisco gene supports the exclusion of *Avrainvillea* and *Cladocephalus* from the Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 44: 761–767.
- Cutrim, M.V.J., SILVA, E.F. & AZEVEDO, A.C.G. 2004. Distribuição vertical das macroalgas aderidas em rizóforos de *Rhizophora mangle* Linnaeus nos manguezais de Parna-Açu e Tauá-Mirim (Ilha de São Luís/MA-Brasil). *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia* 17:9–18.
- Dawes, C.J. & Mathieson, A.C. 2008. *The Seaweeds of Florida*. University Press of Florida, 592 p.
- Díaz-Larrea, J., Senties, A., Fujii, M.T., Pedroche, F.F. & Oliveira, M.C. 2007. Molecular evidence for *Chondrophyucus poiteau* var. *gemmiferus* comb. et stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the *Laurencia* complex. *Botanica Marina* 50: 250–256.
- Dijoux, L., Verbruggen, H., Mattio, L., Doung, N. & Payri, C. 2012 Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: A combined morphological and molecular study. *Journal of Phycology* 48: 1465–1481.
- Diretoria de Hidrografia e Navegação (DHN). (<http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm>). acessado em 3/julho/2012.
- Eston, V.R., Braga, M.R.A., Cordeiro-Marino, M., Fujii, M.T. & Yokoya, N.S. 1992. Macroalgal colonization patterns on artificial substrates inside southeastern Brazilian mangroves. *Aquatic Botany* 42:315–325
- Falkenberg, P. 1901. Die Rhodomelaceen des golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-abschnitte. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-abschnitte* 26: 1-754.
- Famà, P., Wysor, B., Kooistra, W.H.C.F., Zuccarello, G.C. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of Phycology* 38: 1040-1050.
- Feliner, G.N. & Rossello, J.A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species species-level evolutionary studies in plants. *Molecular phylogenetics and evolution* 44: 911-919.
- Fernandes, M.E.B. & Alves, E. de F.S. 2011. Occurrence and distribution of macroalgae (Rhodophyta) associated with mangroves on the Ajuruteua peninsula, Bragança, Pará, Brazil. *UAKARI* 7:35-42.
- Fernandes, M.E.B., Silva, E.F., Lima, J.F., Varela, E.S. & Hercos, A.P. 2005. Distribuição espacial das macroalgas associadas às florestas de mangue na península de Ajuruteua, Bragança-Pará. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*. 18:11-17.
- Fontes, K.A.A. 2012. Taxonomia e distribuição geográfica do gênero *Bostrychia montagnei* (Ceramiales-Rhodophyta) nos manguezais do litoral brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 94p.
- Fraser, C.I., Zuccarello, G.C., Spencer, H.G., Svatore, L.C., Garcia, G.R. & Waters, J.M. 2013. Genetic Affinities between Trans-Oceanic Populations of Non-Buoyant Macroalgae in the High Latitudes of the Southern Hemisphere. *PLoS ONE* 8(7): e69138. doi:10.1371/journal.pone.0069138.

- Fredericq, S., Hommersand, M. H. & Freshwater, D. W. 1996. The molecular systematics of some agar- and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327: 125-135.
- Fredericq, S., Freshwater, D. W. & Hommersand, M. H. 1999. Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Rhodophyta, Gigartinales) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398/399: 25-38.
- Freshwater, D.W. & Rueness, J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* Gelidiales (Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-194.
- Freshwater, D.W., Fredericq, S. & Hommersand, M.H. 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid *rbcL* nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 31: 616-632.
- Freshwater D.W., Fredericq S., Bradley, B.S., Hommersand M.H. & Chase M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7281-7285.
- Fujii, M.T.; Cassano, V. *Bostrychia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB99838>>, acessado em 16 Dez. 2015.
- Fujii, M.T. & Guimarães, S.M.B.P. 1999. Morphological studies of the parasitic red alga *Janczewskia moriformis* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil. *Phycologia* 38: 1-7.
- Goff, L. J. 1982. The biology of parasitic red algae. *Progress in Phycological Research*: 289-369.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2015.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 04 January 2016.
- Gurgel, C. F. D. & Fredericq, S. 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *Journal of Phycology* 40: 138–159.
- Hadlich, R.M. 1984. Contribuição ao levantamento taxonômico das algas marinhas bentônicas do mangue de Itacorubi-Florianópolis, Ilha de Santa Catarina, Brasil, I: Chlorophyta. *Ínsula* 14: 121–138.
- Hadlich, R.M. & Bouzon, Z.L. 1985. Contribuição ao levantamento taxonômico das algas marinhas bentônicas do mangue do Itacorubi-Florianópolis-Ilha de Santa Catarina-Brasil—II Rhodophyta. *Ínsula* 15:89-116.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hanisak, M. 1993. Nitrogen release from decomposing seaweeds: species and temperature effects. *Journal of Applied Phycology* 5:175-181.

- Hanyuda, T., Wakana, I., Arai, S., Miyaji, K., Watano, Y. & Ueda, K. 2002. Phylogenetic relationships within Cladophorales (Ulvophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rRNA gene sequences, with special reference to *Aegagropila linnaei*. *Journal of Phycology* 38: 564-571.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:313-321.
- Hollenberg, G.J. 1967. New genera in the Rhodomelaceae from the Central Pacific. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 66: 201–221.
- Hooker J.D. & Harvey W.H. 1847. Algae tasmanicae. *London Journal of Botany* 6: 397–417.
- Iha, C. 2014. *Diversidade de Gelidiales (Rhodophyta) baseada em marcadores moleculares e estudos morfoanatômicos para região Sudeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 210 p.
- Iha C., Milstein D., Guimarães S.M.P.B., Freshwater D.W. & Oliveira M.C. 2015. DNA barcoding reveals high diversity in the Gelidiales of the Brazilian southeast coast. *Botanica Marina* 58: 295-305.
- Joly, A. B. 1954. The genus *Bostrychia* Montagne in southern Brazil. taxonomic and ecological data. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, série Botânica 11: 55-74.
- Joly, A.B. 1957. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e Arredores. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, Botânica 14: 3-199.
- Joly, A.B. 1965. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, série Botânica 21: 1-393.
- Joly, A.B. & Yamaguishi-Tomita, N. 1967. *Dawsoniella bostrychiae* a new parasite of mangrove algae. *Sellowia* 19: 63-70.
- Joly, A.B. & Yamaguishi-Tomita, N. 1969. Note on *Dawsoniella* Joly & Yamaguishi-Tomita. *Rickia* 4: 209-210.
- Kamiya, M., Tanaka, J., King, R.J, West, J.A., Zuccarell,o G.C. & Kawai, H. 1999. Reproductive and genetic distinction between broad and narrow entities of *Caloglossa continua* (Delesseriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 38: 356–367.
- Kamiya, M., Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2003. Evolutionary relationships of the genus *Caloglossa* (Delesseriaceae, Rhodophyta) inferred from large-subunit ribosomal RNA gene sequences, morphological evidence and reproductive compatibility, with description of a new species from Guatemala. *Phycologia* 42: 478-497
- Kamiya, M. & West, J.A. 2014. Cryptic diversity in the euryhaline red alga *Caloglossa ogasawaraensis* (Delesseriaceae, Ceramiales). *Phycologia* 53: 374-382
- Kanagawa, A. 1984. Clorofíceas marinhas bentônicas do estado da Paraíba, Brasil. Tese. De Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 470p.

- Kano, C.H. 2015. *Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) no sudeste brasileiro baseado em morfologia, DNA barcode e distribuição geográfica*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 101p.
- Kano, C.H. & Fujii, M.T. 2016. *Caloglossa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB99891>>. Acesso em: 04 Jan. 2016.
- Kano, C.H., Sena, F., Cassano, V. & Fujii, M.T. 2016. Diversity of of *Caloglossa* species with emphasis on the southeastern Brazil accessed by morphology and DNA barcoding. *Brazilian Journal of Botany* (BRJB-D-15-00348, submetido).
- King, R. J., Puttock, C. 1989. Morphology and taxonomy of *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic of Botany* 21: 1-73.
- King, R. J., Puttock, C. & Paula, E. J. 1991. The morphology of *Bostrychia pilulifera* .Montagne (Rhodomelaceae, Rhodophyta) *Japanese Journal of Phycology* 39: 31-36.
- Kooistra, W.H.C.F., Olsen, J.L., Stam, W.T. & van Den Hoek, C. 1993. Problems relating to species sampling in phylogenetic studies: an example of non-monophyly in *Cladophoropsis* and *Struvea* (Siphonocladales, Chlorophyta). *Phycologia* 32: 419–428.
- Krayesky, D.M., Norris, J., West, J.A. & Fredericq, S. 2011. The *Caloglossa leprieurii* complex (Delesseriaceae, Rhodophyta) in the Americas: the elucidation of overlooked species based on molecular and morphological evidence. *Cryptogamie Algologie* 32: 37-62.
- Kurihara, A., Abe, T., Tani, M. & Sherwood, A.R. 2010. Molecular phylogeny and evolution of red algal parasites: a case study of *Benzaitenia*, *Janczewskia*, and *Ululania* (Ceramiales). *Journal of Phycology* 46: 580-590.
- Le Gall, L. & Saunders, G.W. 2010. DNA Barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: A case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *Journal of Phycology* 46: 374–389.
- Leliaert, F., Rousseau, F., De Reviere, B. & Coppejans, E. 2003. Phylogeny of the Cladophorophyceae (Chlorophyta) inferred from partial LSU rRNA gene sequences: is the recognition of a separate order Siphonocladales justified? *European Journal of Phycology* 38: 233–246.
- Leliaert, F. & Coppejans, E. 2006. A revision of *Cladophoropsis* Børgesen (Siphonocladales, Chlorophyta). *Phycologia* 45: 657-679.
- Leliaert, F. & Boedeker, C. 2007. Cladophorales. In: Brodie J., Maggs C.A. & John D. (eds.) *Green seaweeds of Britain and Ireland*. The British Phycological Society. pp 131-183.
- Leliaert, F., Millar, A.J.K., Vlaeminck, C. & Coppejans, E. 2007a. Systematics of the green macroalgal genus *Chamaedoris* Montagne (Siphonocladales), with an emended description of the genus *Struvea* Sonder. *Phycologia* 46: 709–725.
- Leliaert, F., De Clerck, O., Verbruggen, H., Boedeker, C. & Coppejans, E. 2007b. Molecular phylogeny of the Siphonocladales (Chlorophyta: Cladophorophyceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1237–1256.
- Leliaert, F., Wysor, B., Verbruggen, H., Vlaeminck, C. & De Clerck, O. 2008. *Phyllodictyon robustum* (Setchell et Gardner) comb. nov. (Siphonocladales, Chlorophyta), a



- morphologically variable species from the tropical Pacific coast of America. *Cryptogamie Algologie* 29: 217-233.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Wysor, B. & De Clerck, O. 2009. DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: Algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Cladophorales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 122–133.
- Littler, D.S. & Littler, M.M. 2000. *Caribbean reef plants*. Offshore Graphics Inc., Washington, DC. 542p.
- Luederwaldt, H. 1919. Os manguesais de Santos. *Revista do Museu Paulista* 11: 309-408.
- Lewis, C.T., Bilkhu, S., Robert, V., Eberhardt, U., Szoke, S., Seifert, K.A. & Lévesque, C.A. 2011. Identification of Fungal DNA Barcode targets and PCR Primers based on Pfam protein families and taxonomic hierarchy. *Open Applied Informatics Journal* 5:72–86.
- Lugo, A.E. & Snedaker, S.C. 1974. The Ecology of Mangroves. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:39-64.
- Lyra, G.D.M., Costa, E.D.S., de Jesus, P.B., de Matos, J.C.G., Caires, T.A., Oliveira, M.C., Oliveira, E.C., Xi, Z., Nunes, J.M.D.C. & Davis, C.C. 2015. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyte): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 51: 356-366.
- Mamoozadeh, N.R. & Freshwater, D.W. 2012. *Polysiphonia sensu lato* (Ceramiales, Florideophyceae) species of Caribbean Panama including *Polysiphonia lobophoralis* sp. nov. and *Polysiphonia nuda* sp. nov. *Botanica Marina* 55: 317-347.
- Mann, F.D. & Steinke, T.D. 1988. Photosynthetic and respiratory responses of the mangrove-associated red algae, *Bostrychia radicans* and *Caloglossa leprieurii*. *South African Journal of Botany* 54:203-207.
- McDevit, D.C. & Saunders, G.W. 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological Research* 57:131-141.
- Menghini, R.P. 2008. *Dinâmica da recomposição natural em bosques de mangue impactados: Ilha Barnabé (Baixada Santista), SP, Brasil*. Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, São Paulo, 206p.
- Milstein D., Medeiros A.S., Oliveira E.C. & Oliveira M.C. 2012. Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? *Journal of Applied Phycology* 24: 837-845.
- Milstein D., Medeiros A.S., Oliveira E.C. & Oliveira M.C. 2015. Native or introduced? A re-evaluation of *Pyropia* species ((Bangiales, Rhodophyta) from Brazil based on molecular analyses. *European Journal of Phycology* 50: 37-45.
- Miranda, P.T.C. & Pereira, S.M.B. 1989. Macroalgas bentônicas no manguezal do rio Ceará (Ceará-Brasil). II - Distribuição em função das condições hidrológicas. *Arquivos de Ciências do Mar*. 28:39-52.
- Montagne, J.F.C. 1842. Algae. In: *Histoire physique, politique et naturelle de l'île de Cuba. Botanique-plantes cellulaires*. (De La Sagra, R. Eds), pp. 1-104. Paris.

- Moura, C.W.N. 2016a. *Cladophoropsis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB99162>>. Acesso em: 07 Jan. 2016.
- Moura, C.W.N. 2016b. *Rhizoclonium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB123944>>. Acesso em: 08 Jan. 2016.
- Muangmai, N., West, J.A. & Zuccarello, G.C. 2014. Evolution of four Southern Hemisphere *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) species: phylogeny, species delimitation and divergence times. *Phycologia* 53: 593–601.
- Muangmai, N., Fraser, C.I. & Zuccarello, G.C. 2015. Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *Journal of Phycology* 51:574-585.
- Möbius, M. 1889. Bearbeitung der von H. Schenck in Brasilien gesammelten Algen. *Hedwigia* 28: 309-347
- Nauer, F., Guimarães, N.R., Cassano, V., Yokoya, N.S. & Oliveira, M.C. 2014. *Hypnea* species (Gigartinales, Rhodophyta) from the southeastern coast of Brazil based on molecular studies complemented with morphological analyses, including descriptions of *Hypnea edeniana* sp. nov. and *H. flava* sp. nov. *European Journal of Phycology* 49: 550-575.
- Nauer, F., Cassano, V. & Oliveira, M.C. 2015. Description of *Hypnea pseudomusciformis* sp. nov., a new species based on molecular and morphological analyses, in the context of the *H. musciformis* complex (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 27: 2405-2417.
- O' Kelly, C.J., Wysor, B. & Bellows, W.K. 2004. Gene sequence diversity and the phylogenetic position of algae assigned to the genera *Phaeophila* and *Ochlochaete* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 40: 789-799.
- Oliveira, M.C. 2001. Estudios de la macro y microbiodiversidad de las algas. Secuenciamento del DNA ribossomal (rDNA). In: Alveal, K. & ANtezana, T. (Eds.). Sustentabilidad de la biodiversidad, Universidad de Concepción-Chile, p. 85-96.
- Oliveira Filho, E. C. 1977. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. Universidade de São Paulo, São Paulo, Tese de Livre Docência em Ficologia, 407p.
- Oliveira-Carvalho, M.F., Oliveira, M.C., Pereira, S.M.B. & Verbruggen, H. 2012. Phylogenetic analysis of *Codium* species from Brazil, with the description of the new species *C. pernambucensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* 47: 355-365.
- Oliveira-Carvalho, M. F. & Pereira, S .M. B. *Catenella* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB99897>>. Acesso em: 06 Jan. 2016.
- Paiano, M.O. & Necchi Jr. O. 2013. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycological Research* 61: 249–255.
- Paula, E.J., Ugadim, Y. & Kanagawa, A.I. 1989. Macroalgas de Manguezais da Ilha de Maracá, Estado do Amapá, Brasil. *Ínsula* 19, supl.: 95-114.

- Pedroche, F. F., West, J. A., Zuccarello, G. C., Senties, A. G. & Karsten, U. 1995. Marine red algae of the mangroves in south Pacific Mexico and Pacific Guatemala. *Botanica Marina* 38:111-119.
- Peña, E.J., Zingmark, R. & Nietch, C. 1999. Comparative photosynthesis of two species of intertidal epiphytic macroalgae on mangrove roots during submersion and emersion. *Journal of Phycology* 35:1206–1214.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998 MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817 – 818.
- Post, E. 1936. Systematische und pflanzengeographische Notizen zur *Bostrychia-Caloglossa*-Assoziation. *Revue Algologie* 9: 1–84.
- Post, E. 1939. Weitere Daten zur Verbreitung des Bostrychietum III. *Archiv für Protistenkunde* 93: 6–37.
- Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84: 1434-1443.
- Rindi, F., McIvor, L., Sherwood, A.R., Friedl, T., Guiry, M.D. & Sheath, R.G. 2007. Molecular phylogeny of the green algal order Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 43: 811-822.
- Rocha-Jorge, R. 2015. *Diversidade de macroalgas nas Unidades de Conservação Insulares do estado de São Paulo, Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo, 222p.
- Rodriguez, C. & Stoner, A.W. 1990. The epiphyte community of mangrove roots in a tropical estuary: distribution and biomass. *Aquatic Botany* 36:117–126.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003 MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572- 1574.
- Santos, E. 1965. Características climáticas. Baixada Santista: aspectos geográficos. In: Departamento de Geografia da Faculdade de Filosofia e Letras da Universidade de São Paulo. V. 1.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1879–1888.
- Saunders, G.W. & Kucera, H. 2010. An evaluation of *rbcl*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie, Algologie* 31: 487-528.
- Saunders, G.W. & Millar, K.R. 2014. A DNA barcode survey of the red algal genus *Mazzaella* in British Columbia reveals overlooked diversity and new distributional records: descriptions of *M. dewreedei* sp. nov. and *M. macrocarpa* sp. nov. *Botany* 92: 223-231.
- Schaeffer-Novelli, Y. 1995. *Manguezal: Ecosystema entre a terra e o mar*. 1º ed., Caribbean Ecological Research, São Paulo.
- Schaeffer-Novelli, Y. & Cintrón, G. 1986. Guia para estudo de áreas de manguezal: Estrutura, função e flora. 1º ed., *Caribbean Ecological Research*.

- Sena, F.S. 2012. *Distribuição vertical das macroalgas aderidas em pneumatóforos no manguezal da Ilha Barnabé (Baixada Santista), SP, Brasil*. Monografia final de curso, Universidade Paulista, São Paulo.
- Sena, F.S, Menghini, R.P., Cassano, V. & Sebastiani, R. 2012. Macroalgal community of pneumatophores in a mangrove of Barnabé Island (Baixada Santista), SP, Brazil: preliminary analysis. *Communications in Plant Sciences* 2: 149-151.
- Sherwood, A.A. & Sheath, R.G. 2003. Systematics of the Hildenbrantiales (Rhodophyta): gene sequence and morphometric analyses of global collections. *Journal of Phycology* 39: 409-422.
- Sherwood, A.R., Kurihara, A., Conklin, K.Y., Sauvage, T. & Presting, G.G. 2010. The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings. *BMC Plant Biology* 10: 258.
- Sherwood, A.R. & Presting, G.G. 2007. Universal primers amplify a 23s rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43:605-608.
- Sherwood, A.R., Vis, M.L., Entwisle, T.J., Necchi Jr, O. & Presting, G.G. 2008. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. *Phycological Research* 56:269–279.
- Sogin M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In: PCR protocols. A guide to methods and applications (Ed. by M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White), Academic Press, San Diego, CA. pp. 307–314.
- Stam, W.T., Olsen, J.L., Zaleski, S.F., Murray, S.N., Brown, K.R. & Walters, L.J. 2006. A forensic and phylogenetic survey of *Caulerpa* species (Caulerpales, Chlorophyta) from the Florida coast, local aquarium shops, and e-commerce: establishing a proactive baseline for early detection. *Journal of Phycology* 42: 1113-1124.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* 53: 796-797.
- Sutherland, J.E., Lindstrom, S.C., Nelson, W.A., Brodie, J., Lynch, M.D., Hwang, M.S., Choi, H.-G., Miyata, M., Kikuchi, N., Oliveira, M.C., Farr, T., Neefus, C., Mols-Mortensen, A. Milstein, D. & Müller, K.M. 2011. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 47: 1131-1151.
- Swofford, D. L. 2000. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland Taylor, W.R. 1931. A synopsis of the marine algae of Brasil. *Revue Algologique* 5: 1-35.
- Taylor, W.R., Joly, A.B. & Bernatowicz, A.J. 1953. The relation of *Dichotomosiphon pusillus* to the algal genus *Boodleopsis*. *Papers of the Michigan Academy of Sciences, Arts and Letters* 38: 97-107, Plates I-III.
- Taylor, W.R. 1960. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. Ann Arbor: The University of Michigan Press. xi + 870 p.
- Ugadim, Y. 1976. Ceramiales (Rhodophyta) do litoral sul do estado de São Paulo e do litoral do estado do Paraná (Brasil). *Boletim de Botânica*, Universidade de São Paulo 4: 133-172.
- Verbruggen, H., Tyberghein, L., Paul, Y. K., Vlaeminck C., van Nieuwenhuyze, K., Koositra, W. H. C. F., Leliaert, F. & De Clerck O. 2009a. Macroecology meets macroevolution:

- evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda*. *Global Ecology and Biogeography* 18: 393-405.
- Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S.T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F. W., Littler, D.S., Littler, M.M., Leliaert, F. & De Clerck, O. 2009b. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 642–653.
- Ximenes, C.F. 2015 *Taxonomia e Filogenia dos representantes do gênero Halimeda Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 81p.
- West, J.A. & Calumpong. H.P. 1988. *Dawsoniocolax bostrychiae* (Choreocolacaceae, Gigartinales), an alloparasitic red alga new to Australia. *Phycologia* 27: 463-468.
- West, J.A., Zuccarello, G.C., Pedroche, F.F. & Karsten, U. 1994. *Caloglossa apomeiotica* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from Pacific México. *Botanica Marina* 37: 381-390.
- Yang, M.Y. & Kim, M.S. 2014. Taxonomy of *Grateloupia* (Halymeniales, Rhodophyta) by DNA barcode marker analysis and a description of *Pachymeniopsis volvita* sp. nov. *Journal of Applied Phycology* 27: 1373-1384.
- Yokoya, N. S. et al. 1999. Temporal and spatial variations in the structure of macroalgal communities associated with mangrove trees of Ilha do Cardoso, São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. 22: 195–204
- Yoneshigue-Braga, Y. 1970. Flora marinha bentônica da Baía de Guanabara e cercanias. I. Chlorophyta. *Publicações do Instituto de Pesquisa da Marinha*, Rio de Janeiro 42: 1–55.
- Yoneshigue-Valentin, Y. & Amado-Filho, G.M. 1989. Ocorrência de *Cladophoropsis macromeres* (Siphonocladales, Chlorophyta) na região sudeste do Brasil (Estado do Rio de Janeiro). *Ensaio de cultivo*. *Ínsula* 19: 83-94.
- Zuccarello, G. C. & West, J. A. 1994. Host specificity on the red algal parasites *Bostrychiocolax australis* and *Dawsoniocolax bostrychiae* (Choreocolacaceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 30: 462-473.
- Zuccarello, G. C. and West, J. A. 1995. Hybridization studies in *Bostrychia*: 1. *B. radicans* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from Pacific and Atlantic North America. *Phycological Research* 43: 233-40.
- Zuccarello, G. C. & West, J. A. 1997. Hybridization studies in *Bostrychia*: 2. correlation of crossing data and plastid DNA sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 36: 293-304.
- Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera/B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41: 49–60.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2003. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans/B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. *Journal of Phycology* 39:948–959.

- Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2006. Molecular phylogeny of the subfamily Bostrychioideae (Ceramiales, Rhodophyta): subsuming *Stictosiphonia* and highlighting polyphyly in species of *Bostrychia*. *Phycologia* 45: 24–36.
- Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2008. *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) species of New Zealand, and relationships in the Southern Hemisphere. *New Zealand Journal of Marine and freshwater Research* 42: 315-324.
- Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2011. Insight into evolution and speciation in the red alga *Bostrychia*: 15 years of research. *Algae* 26: 21–32.
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A. & King, R.J. 1999a. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443–1447.
- Zuccarello, G. C., West, J. A. & King, R. J. 1999b. Evolutionary divergence in the *Bostrychia moritziana*/*B. radicans* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta): molecular and hybridization data. *Phycologia* 38: 234-244.
- Zuccarello, G.C., Buchanan, J. & West, J.A. 2006. Increased sampling for inferring phylogeographic patterns in *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* in the eastern USA. *Journal of Phycology* 42: 1349–1352.
- Zuccarello, G.C., Buchanan, J. & West, J.A. & Pedroche, F. 2011. Genetic diversity of the mangrove-associated alga *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta) from southern Central America. *Phycological Research* 59: 98-104.
- Zuccarello, G., Kamiya, M., Ootsuki, R., Göer, S.L., Pedroche, F.F. & West, J.A. 2012. New records of red algae from mangroves in El Salvador and Pacific Mexico, combining culture and molecular observations. *Botanica Marina* 55: 101-111.
- Zuccarello, G.C., Moon, D. & Goff, L.J. 2004. Phylogenetic study of parasitic genera placed in the family Choreocolacaceae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 40: 937-945.
- Zuccarello, G., Price, N., Verbruggen, H. & Leliaert, F. 2009. Analysis of a plastid multigene data set and the phylogenetic position of the marine macroalga *Caulerpa filiformis* (Chlorophyta). *Journal of phycology* 45: 1206-1212.

## APÊNDICE A – Tabela de amostras sequenciadas

**Tabela 7** – Amostras sequenciadas neste estudo.

Amostra	Coletor	Data da Coleta	Local de coleta	COI-5P	UPA	rbcL	SSU	ITS
<i>Bostrychia</i> Montagne								
C115***	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2015	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
C116***	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2015	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB001	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*	*		
IB002	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*			
IB003	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB004	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*			
IB007	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*			
IB008	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*	*		
IB009	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB011	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB117	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*	*		
IB012	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB013	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB014	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB015	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB016	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB023	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB024	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*			
IB028	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB029	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB030	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB042	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*	*		
IB043	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*	*		
IB045	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*			
IB063	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*	*		

Tabela 6 - Continuação

Amostra	Coletor	Data da Coleta	Local de coleta	COI-5P	UPA	rbCL	SSU	ITS
IB070	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*			
IB072	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3	*	*	*		
IB083	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*	*		
IB095	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2		*	*		
IB099	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2	*	*	*		
10S*	Khey Fontes	21/08/2009	Taperoá, BA (13°32'09.83"S; 39°05'31.56"O)	*	*	*		
11S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)	*	*			
13S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)		*			
14S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)		*			
16S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)		*			
17S*	Khey Fontes	04/11/2009	Florianópolis, SC (27°38'56.97"S; 48°31'22.70"O)		*	*		
18S*	Khey Fontes	04/11/2009	Florianópolis, SC (27°38'56.97"S; 48°31'22.70"O)		*	*		
19S*	Khey Fontes	04/11/2009	Florianópolis, SC (27°38'56.97"S; 48°31'22.70"O)		*	*		
1S*	Khey Fontes	13/04/2009	Bragança, PA (0°50'42.08"S; 46°38'51.08"O)	*	*			
20S*	Khey Fontes	04/11/2009	Florianópolis, SC (27°38'56.97"S; 48°31'22.70"O)		*			
21S*	Khey Fontes	04/11/2009	Florianópolis, SC (27°38'56.97"S; 48°31'22.70"O)	*	*			
22S*	Natália Guimarães	01/06/2010	Ilha do Cardoso, SP (25°09'20.9"S; 47°54'55.9"O)		*	*		
24S*	Cícero Silva	08/09/2010	Parna Açú, São Luís, MA (2°35'35.00"S; 44°24'13.00"O)	*	*	*		
2S*	Khey Fontes	14/04/2009	Bragança, PA (0°50'42.08"S; 46°38'51.08"O)		*			
31S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)			*		
5S*	Khey Fontes	26/05/2009	Vila Velha, Itamaracá, PE (7°48'41.32"S; 34°51'25.83"O)		*			
6S*	Khey Fontes	26/05/2009	Vila Velha, Itamaracá, PE (7°48'41.32"S; 34°51'25.83"O)		*			
7S*	Khey Fontes	26/05/2009	Vila Velha, Itamaracá, PE (7°48'41.32"S; 34°51'25.83"O)	*	*	*		
8S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)	*	*			
9S*	Khey Fontes	21/08/2009	Galeão, BA (13°24'06.85"S; 39°02'10.85O)	*	*			



Tabela 6 - Continuação

Amostra	Coletor	Data da Coleta	Local de coleta	COI-5P	UPA	rbcl	SSU	ITS
<i>Caloglossa</i> (Harvey) G.Martens								
C2***	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB006	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB075	F.Sena, R.P.Menghini	09/06/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 3		*	*		
IB119	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*	*		
IB125	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1	*	*	*		
IB129	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2		*	*		
IB211	F.Sena, R.P.Menghini	16/02/2014	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2			*		
IBt342**	C. Kano	08/05/2012	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1640**	C. Kano	13/05/2013	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1645**	C. Kano	13/05/2013	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1647**	C. Kano	13/05/2013	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1649**	C. Kano	23/06/2013	Luis Correia, Delta do Paraíba-PI (- 2.879667, -41.660395)			*		
IBt1780**	C. Kano	13/07/2014	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1781**	C. Kano	13/05/2013	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)	*		*		
IBt1782**	C. Kano	02/07/2014	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)	*		*		
IBt1783**	C. Kano	19/09/2013	Cibratel, Itanhaem-SP (-24.197501, -46.801924)			*		
IBt1787**	C. Kano	13/07/2014	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)	*		*		
IBt1791**	C. Kano	13/07/2014	Rio Escuro, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)			*		
IBt1792**	C. Kano	02/07/2014	Praia Dura, Ubatuba-SP (- 23.491165, -45.165709)	*				
IBt1820**	C. Kano	13/07/2014	Ilha do Mel, Encantadas-PR (- 25.572485, -48.316054)	*				
IBt1821**	C. Kano	13/07/2014	Ilha do Mel, Encantadas-PR (- 25.572485, -48.316054)	*		*		

Tabela 6 - Continuação

Amostra	Coletor	Data da Coleta	Local de coleta	COI-5P	UPA	rbcL	SSU	ITS
<i>Catenella</i> Greville								
IB003	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*			
IB005	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*		*	
IB010	F.Sena, R.P.Menghini	24/02/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*		*	
IB118	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1		*		*	
<i>Boodleopsis</i> Gepp & E.S. Gepp								
IB088	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2			*		
IB123	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 2			*		
<i>Cladophoropsis</i> Børgesen								
IB096	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1					*
IB100	F.Sena, R.P.Menghini	08/09/2013	Ilha Barnabé, Santos, SP - área 1					*

\* Amostras gentilmente cedidas por K.A. Fontes

\*\* Amostras gentilmente cedidas por C.H. Kano

\*\*\* Amostras do cultivo