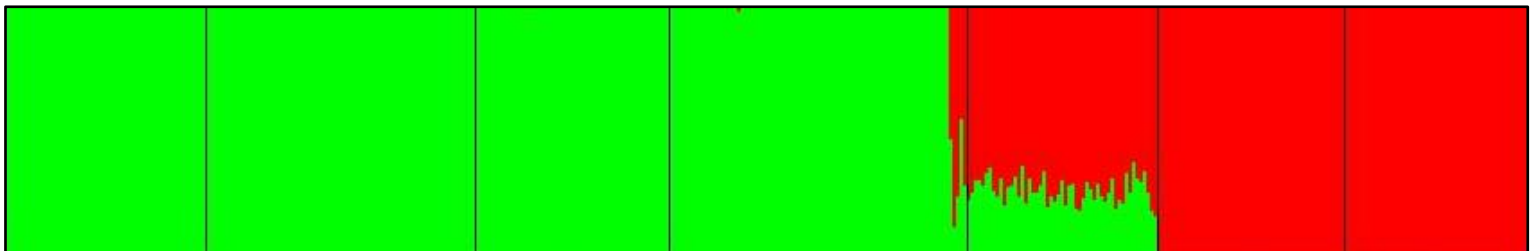


Lígia Maria Ayres-Ostrock

Versão corrigida

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

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



**São Paulo
2014**

Lígia Maria Ayres-Ostrock

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

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

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

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

**São Paulo
2014**

Ayres-Ostrock, Lígia Maria

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

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

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

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador (a)

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

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

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

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

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

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

Victor Hugo - Travailleurs du mer

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

Camille Bonneaud et al. (2008)

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

Montgomery Slatkin (1987)

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Daiana Sanches pela ajuda na edição das imagens.

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

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

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

Índice

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

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

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

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

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

Capítulo 1 - Introdução geral

1. Diversidade intraespecífica

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Aspectos fenológicos

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

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

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

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

3. Fotossíntese

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

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

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

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

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

Nas macroalgas, a t\u00e9cnica de fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a* vem sendo principalmente empregada nos \u00faltimos anos para avaliar o efeito de fatores abi\u00f3ticos, como temperaturas extremas, radia\u00e7\u00e3o ultravioleta, salinidade e condi\u00e7\u00f5es nutricionais. Al\u00e9m disso, os par\u00e2metros relacionados \u00e0 fotoss\u00edntese t\u00eam sido utilizados em avalia\u00e7\u00f5es intraespec\u00edficas, principalmente em diferentes popula\u00e7\u00f5es de esp\u00e9cies que apresentam uma ampla distribui\u00e7\u00e3o geogr\u00e1fica, como *Gracilaria chorda*, que ocorre ao longo da costa do Jap\u00e3o (Terrada *et al.*, 2013). Em *G. vermiculophylla*, as diferen\u00e7as fisiol\u00f3gicas observadas entre tr\u00eas popula\u00e7\u00f5es amostradas no Jap\u00e3o, e evidenciadas pelos diferentes par\u00e2metros da fotoss\u00edntese, sugerem a ocorr\u00eancia de adapta\u00e7\u00f5es a condi\u00e7\u00f5es ambientais

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

4. Marcadores moleculares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Justificativa

Capítulo 6 – Conclusões finais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

- Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer. 187-208.
- Enrriquez, S. 2005. Light absorption efficiency and the package effect in the leaves of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 289: 141-150.
- Espinoza-Avalos, J. 2005. Fenologia de Macroalgas Marinas. *Hidrobiologica*. 15: 109-122.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620.
- Faugeron, S., Valero, M., Destombe, C., Martínez, E.A. & Correa, J.A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 705-716.
- Felsestein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Féral, J. P. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 121-145.
- Fernandes, D.R.P., Caetano, V.S., Tenório, M.M.B., Reinert, F. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2012. Characterization of the photosynthetic conditions and pigment profiles of the colour strains of *Hypnea musciformis* from field-collected and *in vitro* cultured samples. *Braz. J. Pharmacogn.* 22: 753-759.
- Ferreira, L.B. 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 200p.
- Ferreira, L.B., Barufi, J.B. & Plastino, E.M. 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Rev. bras. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042006000100017>.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 3. Ed. 220p.
- Field, D. & Wills, C. 1996. Long, Polymorphic Microsatellites in Simple Organisms. *Proc. R. Soc. B.* 1367: 209-215.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A. & Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81-90.
- Ford, E.B. 1964. Ecological genetics. Methuen, London; John Wiley, New York. 335p.
- Frenette, J.J., Demers, S., Legendre, L. & Dodson, J. 1993. Lack of agreement among models for estimating the photosynthetic parameters. *Limnol. Oceanogr.* 38: 679-687.
- Freshwater, D.W., Fredericq, S., Butler, B.S., Hommersand, M.H. & Chase, M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7281-7285.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Rodrigues, R.R. & Lorenzetti, J.A. 2001. A numerical study of the effects of bottom topography and coastline geometry on the Southeast Brazilian coastal upwelling. *Cont. Shelf Res.* 21: 371-394.
- Rueness, J. 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia.* 44: 120-128.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, S., Hrbek, T., Farias, I.P., Schneider, H., & Sampaio, I. 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Mol. Ecol.* 5:4361-4373.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1879-1888.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 109: 365-371.
- Schoebel, C.N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leys, M., Ricanova, S., Segelbacher, G., Werth, S. & Csencsics, D. 2013. Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *J Evol Biol* 26:600-611.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecol. Stud.* 100: 49-70.
- Selkoe, K.A. & Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615–629.
- Shelly, K., Holland, D. & Beardall, J. 2010. Assessing nutrient status of microalgae using chlorophyll *a* fluorescence. In In Suggett, D. J., Borowitzka, M. A. & Prášil, O. (eds) *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer. 223-235.
- Sim, M.C., Lim, P.E., Gan, S.Y. & Phang S.M. 2007. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for differentiating male from female and sporophytic thalli of *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 19: 763-769.
- Song, S.L., Lim, P.E., Phang, S.M., Lee, W.W., Lewmanomont, K., Largo, D.B. & Han, N.A. 2013. Microsatellite markers from expressed sequence tags (ESTs) of seaweeds in differentiating various *Gracilaria* species. *J. Appl. Phycol.* 25: 839-846.
- Sosa, P. & Lindstrom, S. 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. *Eur. J. Phycol.* 34: 427-442.

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

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

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

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