

BEATRIZ BRUNELLI DE SOUZA

**Filogeografia de *Gelidium floridanum* e *Pterocladia*
capillacea (Gelidiales, Rhodophyta) e espécies
relacionadas no Atlântico ocidental, com ênfase no
Brasil, com base em dados morfológicos e
moleculares**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Avasculares e Fungos.

SÃO PAULO

2017

BEATRIZ BRUNELLI DE SOUZA

Filogeografia de *Gelidium floridanum* e *Pterocladella capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) e espécies relacionadas no Atlântico ocidental, com ênfase no Brasil, com base em dados morfológicos e moleculares

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos.

ORIENTADORA: DRA. MUTUE TOYOTA FUJII

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Souza, Beatriz Brunelli de
S729f Filogeografia de *Gelidium floridanum* e *Pterocladella capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) e espécies relacionadas no Atlântico ocidental, com ênfase no Brasil, com base em dados morfológicos e moleculares / Beatriz Brunelli de Souza -- São Paulo, 2017.
82p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.
Bibliografia.

1. Distribuição geográfica. 2. Diversidade intraespecífica. 3. Haplótipos. I. Título

CDU: 582.26

“I believe that we can move on
Conquer our goals and right what is wrong
I believe that we can stay true
True to ourselves and find something new”
(All or Nothing - Pennywise)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente e ao Instituto de Botânica, em especial ao Núcleo de Pesquisa em Ficologia pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. À Fapesp (Proc. 2012/18775-6) e ao CNPq (Proc. 484647/2012-1) pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Mutue T. Fujii, por todas as oportunidades concedidas, todo apoio, conhecimento transmitido, dedicação e por acreditar em mim.

À minha colaboradora e amiga, Dra. Daniela Milstein, que com paciência, dedicação e disposição me ensinou os princípios da biologia molecular. Muito obrigada por fazer parte da minha formação acadêmica e por toda contribuição neste trabalho, pelos ótimos conselhos, carinho e também por sempre acreditar em mim.

Ao Dr. Sung Min Boo do Chungman National University por ter me aceitado e recebido tão bem em seu laboratório e por tudo que me proporcionou. Agradeço também ao Dr. Ga Hun Boo e à Ms. Jung Yeon Kim pela disposição em me ajudar.

Agradeço a todos os pesquisadores de outras Instituições que forneceram materiais que contribuíram para o meu estudo.

À minha querida amiga Daniella Chen, pela amizade, carinho e por estar ao meu lado todo esse tempo sempre me dando força e proporcionando momentos de muita diversão e descontração. E aos meus amigos Bianca Trassi, Felipe Tadeu, Gabriel Franco, Isac Filho, Luanda Soares, Otávio Marques, Thaís Berti, Tiago Rodrigues e Victor França, que sempre transmitiram pensamentos positivos e por todas risadas.

E, especialmente, aos meus pais, Abigail e Moisés, e irmão, William, pelo amor e educação que recebi durante toda a vida e por sempre me apoiarem e incentivarem em tudo.

Muito obrigada!

RESUMO

A filogeografia, em algas marinhas, visa compreender a estrutura genética dos indivíduos, definir limites de distribuição e ajuda a identificar a origem da introdução de espécies exóticas e/ou invasoras. Neste sentido, no Brasil, até o momento não há estudos para os representantes de Gelidiales, evidenciando a existência de uma lacuna no conhecimento sobre diversidade e estrutura genética inter e intraespecífica, além do desconhecimento do real padrão de distribuição geográfica das suas espécies. Os gêneros *Gelidium* e *Pterocladia* são macroalgas de importância econômica, que produzem ágar de excelente qualidade. A distinção destes gêneros baseia-se principalmente na estrutura do cistocarpo e no sistema de fixação. Em *Gelidium* o cistocarpo é bilocular e o apressório é do tipo *brush-like*, enquanto que em *Pterocladia*, o cistocarpo é unilocular e apressório do tipo *peg-like*. Entretanto, as características morfológicas em muitos casos são insuficientes para delimitar adequadamente os táxons em nível genérico e infragenérico. O uso de métodos moleculares associados às análises morfológicas tem se mostrado uma ferramenta rápida e eficiente para a identificação de táxons, contribuindo com maior clareza o limite de segregação das espécies. Entre as espécies de Gelidiales identificadas para a costa brasileira, *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea* são facilmente confundidas, principalmente quando as estruturas reprodutivas estão ausentes. Além disso, a ocorrência destas espécies na costa nordeste brasileira foi controversa por muito tempo. Assim, o objetivo deste estudo foi conhecer a distribuição geográfica de *G. floridanum* e *P. capillacea* no Oceano Atlântico e validar sua ocorrência na costa brasileira. O material foi coletado no Brasil, mas espécimes de Cuba, Venezuela, Itália e Portugal também foram incluídos, totalizando 294 amostras. A identificação molecular dessas amostras resultou em nove espécies: *Pterocladia beachiae*, *P. capillacea*, *Gelidium floridanum*, *G. lineare* e outros cinco táxons não definidos em nível específico. A diversidade interespecífica encontrada para as espécies de *Pterocladia* e *Gelidium* foi de 9,9% e de 0,7-12,9%, respectivamente. A maior diversidade de espécies foi registrada para Espírito Santo. O estudo filogeográfico foi realizado em *G. floridanum*, *G. lineare*, *P. beachiae* e *P. capillacea*, com base nos marcadores *rbcL*-3P, *rbcL*, *COI*-5P, *cox1* e *cox2-3*. A distribuição geográfica de *G. floridanum* e *P. capillacea* é disjunta, ocorrendo em ambos os hemisférios, mas estão ausentes no nordeste brasileiro. *G. lineare* está restrito ao nordeste do Brasil, ocorrendo em substituição a *G. floridanum* e *P. capillacea*. *P. beachiae* teve ampla distribuição, ocorrendo em toda a costa brasileira. *G. lineare* foi a espécie que apresentou maior variação genética para todos os marcadores testados, enquanto que nas demais espécies essa variação não foi muito expressiva ou até ausente entre as populações brasileiras. Entanto, quando comparamos as sequências das populações brasileiras com as sequências disponíveis para espécimes de outras regiões do mundo, a diversidade intraespecífica fica maior, sugerindo barreiras biogeográficas entre essas populações.

Palavras-chave: distribuição geográfica, diversidade intraespecífica, haplótipos, macroalgas.

ABSTRACT

Phylogeography, in marine algae, aims to understand the genetic structure of individuals, define distribution limits and help identify the origin of the introduction of exotic and / or invasive species. In this sense, in Brazil, to date there are no studies for Gelidiales representatives, evidencing the existence of a gap in the knowledge about diversity and inter and intraspecific genetic structure, besides the lack of knowledge of the real pattern of geographic distribution of its species. The genus *Gelidium* and *Pterocladia* are seaweeds of economic importance, which produce excellent quality agar. The distinction of these genera is mainly based on the cystocarp structure and fixation system. In *Gelidium* the cystocarp is bilocular and the appressory is of the brush-like type, whereas in *Pterocladia*, the cystocarp is unilocular and appressory of the peg-like type. However, the morphological characteristics in many cases are not enough to adequately delimit the taxa at the generic and infrageneric. The use of molecular methods associated to morphological analysis has shown to be a fast and efficient tool for the identification of taxa, contributing with greater clarity the limit of species segregation. Among the *Gelidiales* species identified for the Brazilian coast, *Gelidium floridanum* and *Pterocladia capillacea* are easily confused, especially when the reproductive structures are absent. In addition, the occurrence of these species on the Brazilian northeast coast was controversial for a long time. Thus, the objective of this study was to know the geographic distribution of *G. floridanum* and *P. capillacea* in the Atlantic Ocean and to validate its occurrence in the Brazilian coast. The material was collected in Brazil, but specimens from Cuba, Venezuela, Italy and Portugal were also included, totaling 294 samples. The molecular identification of these samples resulted in nine species: *Pterocladia beachiae*, *P. capillacea*, *Gelidium floridanum*, *G. lineare* and five other taxa not defined at specific level. The interspecific diversity found for the species of *Pterocladia* and *Gelidium* was 9.9% and 0.7-12.9%, respectively. The greatest diversity of species was recorded for Espírito Santo. The phylogeographic study was carried out in *G. floridanum*, *G. lineare*, *P. beachiae* and *P. capillacea*, based on *rbcL*-3P, *rbcL*, *COI*-5P, *cox1* and *cox2-3* markers. The geographic distribution of *G. floridanum* and *P. capillacea* is disjunct, occurring in both hemispheres, but they are absent in the Brazilian northeast. *G. lineare* is restricted to northeastern Brazil, occurring in substitution of *G. floridanum* and *P. capillacea*. *P. beachiae* was widely distributed, occurring throughout the Brazilian coast. *G. lineare* was the species that presented the greatest genetic variation for all the markers tested, whereas in the other species this variation was not very expressive or even absent among the Brazilian populations. However, when comparing the sequences of Brazilian populations with those available for specimens from other regions of the world, intraspecific diversity is larger, suggesting biogeographic barriers between these populations.

Key words: geographic distribution, intraspecific diversity, haplotypes, seaweeds.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

COI-5P: região 5' do gene mitocondrial *cox1*

cox1: gene mitocondrial que codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase

cox2-3: região espaçadora dos genes mitocondriais que codificam as subunidades 2 e 3 da enzima citocromo oxidase

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GB: GenBank

NJ: Neighbor-joining

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase

***rbcL*:** gene plastidial que codifica a subunidade grande da enzima RuBisCO

***rbcL*-3P:** região 3' do gene *rbcL* e o espaçador *rbcL*-S

***rbcL*-S:** espaçador dos genes do cloroplasto que codificam a subunidade grande e pequena da enzima RuBisCO

RuBisCO: ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de espécimes coletados por praia e sequenciados por marcador molecular analisado.	10-12
Tabela 2: Marcadores moleculares e respectivos <i>primers</i> utilizados para amplificação por PCR e sequenciamento.	14
Tabela 3: Etapas do ciclo de amplificação utilizadas na PCR.	14
Tabela 4: Sequências obtidas do GenBank para comparação.	17-18
Tabela 5: Distribuição geográfica e a quantidade de amostras analisadas das espécies de <i>Gelidium</i> e <i>Pterocladia</i>	19
Tabela 6: Valores de divergência interespecífica para o marcador <i>rbcL</i> em espécies <i>Gelidium</i>	21
Tabela 7: Diferenças morfológicas vegetativas entre <i>G. floridanum</i> e <i>Gelidium</i> sp. 2.	33
Tabela 8: Diferenças morfológicas entre <i>Gelidium</i> sp. 4 e <i>Gelidium</i> sp. 5.	38
Tabela 9: Quantidade e tamanho das sequências analisadas por marcador de cada espécie.	46
Tabela 10: Valores de diversidade haplotípica (<i>H</i>) e nucleotídica (π), Tajima's <i>D</i> e Fu's <i>F_s</i> para <i>G. lineare</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Barreiras biogeográficas hipotéticas.	9
Figura 2: Árvore de agrupamento por NJ com o marcador <i>rbcL</i> para <i>Gelidium</i>	20
Figura 3: Árvore de agrupamento por NJ com o marcador <i>rbcL</i> para <i>Pterocladella</i>	23
Figura 4: <i>Gelidium floridanum</i>	26
Figuras 5 - 6: <i>Gelidium lineare</i>	29-30
Figura 7: <i>Gelidium</i> sp. 1.	31
Figura 8: <i>Gelidium</i> sp. 2.	33
Figura 9: <i>Gelidium</i> sp. 3.	35
Figura 10: <i>Gelidium</i> sp. 4.	36
Figura 11: <i>Gelidium</i> sp. 5.	38
Figura 12: <i>Pterocladella beachiae</i>	41
Figuras 13 - 14: <i>Pterocladella capillacea</i>	44-45
Figura 15: Redes de haplótipos de <i>Gelidium floridanum</i>	46
Figura 16: Redes de haplótipos e distribuição de <i>Gelidium lineare</i>	48
Figura 17: Redes de haplótipos de <i>Pterocladella beachiae</i>	52
Figura 18: Redes de haplótipos e distribuição de <i>Pterocladella capillacea</i>	54

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Taxonomia e Filogenia em Gelidiales.....	2
1.2 Filogeografia.....	5
2. Objetivos.....	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Hipóteses	9
4. Material e Métodos	9
4.1 Coletas e Processamento das amostras	9
4.2 Estudos morfológicos	12
4.3 Estudos moleculares	13
4.3.1 Extração de DNA	13
4.3.2 Amplificação por PCR	13
4.3.3 Eletroforese em gel e Purificação	14
4.3.4 Reação de sequenciamento e Precipitação	15
4.3.5 Alinhamento das sequências	15
4.3.6 Análise de agrupamento	16
4.3.7 Análise de diversidade da população	16
5. Resultados e Discussão	18
5.1 Delimitação molecular das espécies de <i>Gelidium</i> e <i>Pterocladia</i>	19
5.2 Aspectos morfológicos	24
<i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor	24
<i>Gelidium lineare</i> Iha & Freshwater	27
<i>Gelidium</i> sp. 1	30
<i>Gelidium</i> sp. 2	32
<i>Gelidium</i> sp. 3	34
<i>Gelidium</i> sp. 4	35
<i>Gelidium</i> sp. 5	37
<i>Pterocladia beachiae</i> Freshwater	39
<i>Pterocladia capillacea</i> (Gmelin) Santelices & Hommersand	42

5.3 Estudo da diversidade de haplótipos e distribuição geográfica	46
<i>Gelidium floridanum</i>	46
<i>Gelidium lineare</i>	47
<i>Pterocladella beachiae</i>	51
<i>Pterocladella capillacea</i>	53
6. Considerações Finais	56
Referências bibliográficas.....	57
Anexo	67

1. Introdução

A ordem Gelidiales Kylin está inserida na classe Florideophyceae e atualmente está representada por 220 espécies, distribuídas em 16 gêneros dentro de quatro famílias: Gelidiaceae Kützinger, Gelidiellaceae K.-C. Fan, Orthogonocladiaceae G.H. Boo, Le Gall, K.A. Miller & S.M. Boo e Pterocladiaceae G.P. Felicini & C. Perrone (Schneider & Wynne 2007, Guiry & Guiry 2017). Essas espécies estão reunidas por apresentarem características em comum que as distinguem de representantes de outras ordens dentro do filo Rhodophyta (Hommersand & Fredericq 1988, Santelices 1990), tais como: ligações celulares com uma única *cap-layer* (Pueschel & Cole 1982), talo pseudoparenquimatoso com organização uniaxial e uma célula apical evidente (Dixon 1958, Fan 1961), histórico de vida trifásico e isomórfico e padrão de germinação dos esporos do tipo - *Gelidium* (Guiry 1990). O carpogônio é intercalar, com filamentos gonimoblásticos originando carposporângios e ausência de célula auxiliar (Hommersand & Fredericq 1988). Os espermatângios são originados a partir da divisão transversal das células corticais (Fan 1961, Guiry & Womersley 1993).

A família Gelidiaceae, objeto do presente estudo, tem o maior número de espécies presentes no gênero *Gelidium* J.V. Lamouroux, com 135 espécies, enquanto a família Pterocladiaceae está representada principalmente pelo gênero *Pterocladella* Santelices & Hommersand, com 22 espécies (Guiry & Guiry 2017).

Ambos os gêneros constituem macroalgas de grande importância econômica, por serem produtoras de ágar de excelente qualidade, atingindo alto nível de força do gel (McHugh 1991, Critchley 1997). A extração do ágar permite uma série de aplicações na indústria alimentícia, biotecnológica e química, tais como agente gelificante, espessante, emulsões líquidas para produtos farmacêuticos e, principalmente, a produção do ágar bacteriológico (Scariot 2010). Cerca de 40% do ágar que é produzido no mundo é proveniente de espécies de *Gelidium*, enquanto 3% é obtido de espécies de *Pterocladella* (McHugh 1991).

Espécies de *Gelidium* na Coreia do Sul têm sido estudadas para produção de celulose e papel a partir das endofibras (filamentos rizoidais, filamentos internos e rizinas) obtidas da extração do material mucilaginoso da alga. Isso tem revelado que os papéis produzidos com o material algáceo possuem uma maior opacidade e suavidade quando comparados a papéis feitos a partir da madeira (Seo *et al.* 2010).

Pterocladella capillacea (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand também tem sido amplamente estudada por apresentar em seu extrato aquoso lectinas com atividade antiviral

(Liao *et al.* 2003), atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (Silva *et al.* 2010). Também possui papel ecológico importante por constituir parte da dieta alimentar das tartarugas-verdes (Awabdi *et al.* 2013).

As populações de Gelidiales utilizadas para fins econômicos têm sido extraídas apenas dos bancos naturais, de acordo com a revisão de Friedlancer (2008). Segundo Yokoya & Oliveira (1993), isso tem causado diminuição dessas algas nas regiões da América do Sul. Como consequência, a maricultura tem servido de alternativa, porém tem sido extremamente difícil e não muito viável economicamente, para atingir escala comercial, visto que para isso é preciso ter um bom entendimento de fisiologia e ecologia dessas espécies (Yokoya & Oliveira 1992). Para conseguir alto rendimento econômico com o cultivo comercial, de acordo com Friedlancer (2008), serão necessários estudos de melhoramento genético a partir da seleção de linhagens potencialmente capazes de serem produzidas em grande escala com eficiência.

1.1 Taxonomia e Filogenia em Gelidiales

Os gêneros *Gelidium* e *Pterocliadiella* se diferenciam por duas características morfológicas principais, as do cistocarpo e da estrutura de fixação. Em ambos os gêneros o carpogônio se desenvolve em direção às superfícies da fronde e os filamentos nutritivos são formados para ambos os lados, porém o cistocarpo em *Pterocliadiella* apresenta os filamentos nutritivos organizados em um núcleo central ao redor do filamento axial (cistocarpo unilocular) e em *Gelidium*, os filamentos formam uma rede em torno das células nutritivas de segunda e terceira ordem (cistocarpo bilocular) (Santelices & Hommersand 1997). Em relação ao sistema de fixação, *Gelidium* possui apressório do tipo *brush-like*, que consiste em um conjunto de filamentos rizoidais que crescem de forma desorganizada a partir das células corticais internas do estolão. Em *Pterocliadiella* os filamentos rizoidais crescem paralelamente uns aos outros e são circundados por uma bainha grossa, sendo denominado *peg-like* (Perrone *et al.* 2006). Entretanto, as características morfológicas em muitos táxons de Gelidiales se tornam sutis e sobrepostas, sendo insuficientes para delimitar adequadamente os gêneros e as categorias infragenéricas, levando a constantes mudanças taxonômicas e nomenclaturais (Santelices 1990, Millar & Freshwater 2005, Tronchin & Freshwater 2007).

O emprego de métodos moleculares juntamente com as análises morfológicas tem mostrado ser uma ferramenta rápida e eficaz para identificação de espécies, contribuindo para atribuição correta de nomes aos táxons ambíguos e mostrado maior clareza entre os limites de separação das espécies, principalmente, para as crípticas e pseudocrípticas dentro de Gelidiales (Kim *et al.* 2011, Boo *et al.* 2014). Segundo Sohrabipour *et al.* (2013), para uma

identificação com maior exatidão dos táxons em Gelidiales se faz necessária a combinação da análise molecular com o estudo morfológico detalhado dos caracteres vegetativos e reprodutivos.

A abordagem filogenética molecular na ordem Gelidiales começou a ser aplicada por Freshwater & Rueness (1994) com base no marcador do gene plastidial que codifica a subunidade grande da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) (*rbcL*), visando a filogenia de espécies europeias de *Gelidium*. Esse trabalho revelou que Gelidiales é bastante complexa e que havia espécies identificadas de forma equivocada. Posteriormente, Freshwater *et al.* (1995) realizaram análises filogenéticas incluindo diversos gêneros de Gelidiales e notaram que os espécimes de *Gelidium* estudados não formavam um grupo monofilético e que ficavam separados em diversos complexos. Nesse trabalho, os autores analisaram também a possível distribuição cosmopolita de *Pterocladia capillacea* (como *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Bornet & Thuret) a partir de amostras provenientes dos oceanos Atlântico e Pacífico. Os dados mostraram divergência intraespecífica, porém concluíram que a espécie não possuía um padrão de distribuição clara e coerente com a geografia. Ainda segundo os autores, isso poderia ser devido à recente dispersão dessa espécie em todo o mundo, e que o gene *rbcL* não seria eficaz de determinar a direção desse evento, necessitando de estudos similares com marcadores mais sensíveis para saber o ponto de origem e posterior dispersão.

A partir dos trabalhos de Freshwater & Rueness (1994) e Freshwater *et al.* (1995), outros trabalhos empregando diferentes marcadores moleculares também têm auxiliado na identificação de espécies e na inferência filogenética do grupo, tais como: o gene que codifica a subunidade pequena do RNA ribossômico nuclear (SSU) (Bailey & Freshwater 1997, Shimada & Masuda 2000); a região variável (domínios D2 e D3) do gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade grande do ribossomo (LSU) (Thomas & Freshwater 2001, Tronchin & Freshwater 2007); o espaçador interno transcrito do gene nuclear ribossômico (ITS) (Patwary *et al.* 1998); o gene mitocondrial que codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase (*cox1*) (Sohrabipour *et al.* 2013, Boo *et al.* 2016); e a região 5' do gene mitocondrial *cox1* (COI-5P) (Freshwater *et al.* 2010, Iha *et al.* 2015).

Mais recentemente, Boo *et al.* (2016) baseados em morfologia e no sequenciamento de cinco marcadores moleculares, entre eles o gene da subunidade A da celulose sintase (*CesA*), mostraram que *Pterocladia* é um gênero monofilético bem suportado, enquanto que *Gelidium* é um gênero parafilético, agrupando com os gêneros *Acanthopeltis* Okamura, *Capreolia* Guiry & Womersley, *Gelidiophycus* G.H.Boo, J.K.Park & S.M.Boo e *Ptilophora* Kützinger. Além disso, propuseram diversas mudanças taxonômicas, incluindo a descrição da

nova família Orthogonacladiaceae e a transferência de *Gelidium madagascariense* Andriamampandry para *Orthogonacladia madagascariense* (A.V. Andriamampandry) G.H. Boo & L. Le Gall, dentro de Orthogonacladiaceae.

Portanto, apesar do emprego de diferentes marcadores em estudos moleculares e inclusão de espécimes de várias localidades do mundo, é possível notar que *Gelidium* é um gênero complexo que ainda não foi resolvido monofileticamente, e pouco se conhece sobre sua real diversidade (Freshwater & Bailey 1998, Thomas & Freshwater 2007, Kim *et al.* 2011, Boo *et al.* 2014a).

No Brasil, com base em estudos morfológicos e anatômicos, sete espécies de *Gelidium* e cinco espécies de *Pterocliadiella* haviam sido reconhecidas (Joly 1965, Ugadim 1987, Fernandes & Guimarães 1998, Guimarães 2006). Entretanto, os trabalhos integrando os dados morfológicos aos moleculares de DNA *barcoding* na ordem Gelidiales retrataram o quão pouco se conhece sobre a diversidade dessa ordem e quão complexa ela é, identificando novas ocorrências, propondo mudanças taxonômicas, além de mais de uma dezena de táxons não definidos em nível específico (Iha *et al.* 2015, 2016, Jamas 2015). Com isso, as espécies atualmente aceitas para o Brasil dos gêneros *Gelidium* e *Pterocliadiella* são: *Gelidium americanum* (W.R. Taylor) Santelices, *G. crinale* (Hare ex Turner) Gaillon, *G. floridanum* Taylor, *G. lineare* Iha & Freshwater, *G. microdonticum* Taylor, *G. spinosum* (S.G. Gmelin) P.C. Silva, *G. torulosum* Kützinger, *Pterocliadiella australafricanensis* Tronchin & Freshwater, *P. bartlettii* (W.R. Taylor) Santelices, *P. beachiae* Freshwater, *P. caerulescens* (Kützinger) Santelices & Hommersand, *P. capillacea*, *P. sanctarum* (Feldmann & G. Hamel) Santelices e *P. taylorii* (A.B. Joly) Santelices (Iha *et al.* 2015, Jamas 2015, Guiry & Guiry 2017).

Dentre as espécies de Gelidiales identificadas para o litoral brasileiro, *Gelidium floridanum* e *Pterocliadiella capillacea* são de difícil distinção em campo devido à sua similaridade morfológica, principalmente, quando as estruturas reprodutivas estão ausentes (Ugadim 1985, Thomas & Freshwater 2001, Boo *et al.* 2010).

Gelidium floridanum tem distribuição restrita ao Atlântico ocidental, com afinidades para águas tropicais e temperadas quentes. Seu limite norte de distribuição é Flórida, EUA, cuja localidade tipo é Indian River (Taylor 1943, Freshwater *et al.* 1995) e o limite sul é o estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Guimarães 2014), com registros também para Costa Rica (Thomas & Freshwater 2001) e Venezuela (Freshwater *et al.* 1995). Para o Brasil, a espécie foi citada pela primeira vez para São Paulo e Paraná por Ugadim (1974), e posteriormente ampliada para demais localidades do litoral sudeste e sul (Ugadim 1987, Iha *et al.* 2015) e nordeste (Fernandes & Guimarães 1998, Guimarães 2006, Creed *et al.* 2010,

Guimarães 2014). Entretanto, para o Brasil, Jamas (2015) e Iha *et al.* (2015) mostraram que a distribuição desta espécie está restrita ao litoral sudeste e sul.

Pterocladia capillacea é considerada uma espécie cosmopolita (Boo *et al.* 2010) e tem o Mar Mediterrâneo como localidade tipo (Gmelin, 1768). Sua distribuição para a costa brasileira por muito tempo foi questionável devido a alguns trabalhos, como os de Ferreira & Pinheiro 1966, Pinheiro-Vieira & Ferreira 1968 e Guimarães 2014, que identificaram sua ocorrência também para a região nordeste do país. Entretanto, Ugadim (1985, 1987, 1988) já havia postulado de que a identificação de *P. capillacea* (como *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Bornet) para o nordeste brasileiro poderia estar equivocada e confundida com *Gelidium lineare* (como *G. coarctatum* Kützinger), uma espécie abundante nessa região e com hábito e características semelhantes. Essa hipótese pôde ser corroborada com os primeiros trabalhos moleculares de Gelidiales para a costa do Brasil, na qual *P. capillacea* apresentou ocorrência somente a partir do Espírito Santo em direção ao sul do país (Iha *et al.* 2015, Jamas 2015).

Estes quadros apresentados resumem a confusão taxonômica envolvendo as espécies dos gêneros *Gelidium* e *Pterocladia* para o Brasil.

1.2 Filogeografia

O termo filogeografia foi proposto por Avise *et al.* (1987) com o intuito de integrar a relação entre filogenética e genética de populações, baseado em genes de herança uniparental. A filogeografia é definida por buscar entender o padrão e os processos de distribuição geográfica (aspecto de espaço) da diversidade genética intraespecífica e de espécies proximamente relacionadas, associando com a evolução (aspecto de tempo) (Avise *et al.* 1987, Avise 2000). Isso permite compreender como os eventos históricos ajudaram a formar a atual distribuição de genes, populações e espécies (Avise & Hamrick 1996). Dessa maneira, a filogeografia proporciona uma conexão entre os processos de macro e microevolução e é fundamental para entender a relação das análises filogenéticas nos contextos geográficos, podendo testar as hipóteses que se referem à relação casual entre os fenômenos geográficos, distribuição de espécies e mecanismos de especiação (Bermingham & Moritz 1998, Diniz-Filho *et al.* 2008, Hickerson *et al.* 2009). Segundo Beheregaray (2008), com uma boa amostragem de indivíduos é possível entender processos da origem, distribuição e manutenção da biodiversidade, determinar o quanto as mudanças no ambiente físico e biótico e o isolamento reprodutivo de uma população influenciaram a sua diversidade genética, e levantar hipóteses biogeográficas.

Até os dias de hoje, a filogeografia tem como base as três premissas propostas por Avise *et al.* (1987): 1) grande parte das espécies são compostas por populações geograficamente estruturadas, cujos membros ocupam ramos distintos de uma genealogia; 2) áreas com ausência de barreiras físicas impedindo o fluxo gênico são mais ocupadas por espécies com pouca ou nenhuma estrutura filogeográfica; 3) e quando há presença de barreiras físicas contínuas, a separação por distância genética faz surgir grupos intraespecíficos monofiléticos.

Apesar do grande aumento de estudos na área de filogeografia, pouco se tem focado em organismos presentes no Hemisfério Sul (Beheregaray 2008). Além disso, a região Neotropical, que corresponde ao México e Caribe, América Central e América do Sul, é a menos estudada até o momento (Martins & Domingues 2011). Como é uma região que apresenta alta biodiversidade e sendo que 14% da biota mundial está no Brasil (Lewinsohn & Prado 2005), é muito importante que estudos de filogeografia sejam realizados, pois isso fornecerá informações sobre a atual distribuição da biodiversidade, ajudar na detecção de importantes áreas destinadas a conservação e compreender melhor como os processos evolutivos ocorreram e resultaram na contemporânea biota Neotropical, especialmente na América do Sul (Turchetto-Zolet *et al.* 2013a, 2013b).

Em relação ao ambiente marinho também ocorre escassez de estudos filogeográficos, sendo que dos trabalhos realizados entre 1994 - 2014, somente 17% foram feitos com esses organismos. Esse ecossistema é muito influenciado por condições ambientais, tais como os fatores oceanográficos, mudanças ambientais de curto e longo prazo e as atividades humanas. Essas influências causam impactos significativos na distribuição da biodiversidade, funcionam como barreiras interferindo na variação da genética populacional e nas histórias evolutivas das espécies. Portanto, com as condições ambientais agindo de forma independente ou em conjunto, é possível entender os padrões filogeográficos desses organismos marinhos (Hu *et al.* 2015).

O trabalho pioneiro em filogeografia de algas marinhas foi realizado em Chlorophyta por van Oppen *et al.* (1994) com a espécie *Acrosiphonia arcta* (Dillwyn) Gain. O estudo foi feito com base em técnicas de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição da região espaçadora intergênica do DNA nuclear ribossomal (IGS) e marcadores de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD), comparando espécimes dos dois hemisférios. Em Rhodophyta, o primeiro estudo foi feito em 1995 por van Oppen *et al.* com *Phycodrys rubens* (Linnaeus) Batters com amostras do Atlântico Norte. Analisando sequências de ITS e *rbcL* foi possível sugerir que essa espécie invadiu o Atlântico Norte a partir do Pacífico logo após a abertura do Estreito de Bering, colonizando ambas as costas do Atlântico.

Até 1999, os trabalhos na área de filogeografia tinham como ferramenta o uso de técnicas de polimorfismos e análises de sequências de DNA nuclear e do cloroplasto. Porém, o trabalho de Zucarello *et al.* (1999) foi o ponto inicial para a utilização de sequências de DNA mitocondrial para esse tipo de estudo. Sequências de genes mitocondriais por serem regiões que possuem alta taxa de mutação, resultando em grande variabilidade, têm mostrado ser eficientes para identificação em nível de espécie e dentro de populações (Zuccarello *et al.* 1999, Saunders 2005). Zucarello *et al.* (1999) utilizaram a região espaçadora dos genes mitocondriais que codificam as subunidades 2 e 3 da enzima citocromo oxidase (*cox2-3*) para espécies de ordem diferentes. Com a variação genética significativa encontrada dentro da espécie *Caloglossa leprieurii* (Montagne) G.Martens e em *Bostrychia moritziana* (Sonder ex Kützinger) J.Agardh, os autores sugeriram que o marcador mitocondrial poderia ser útil para os estudos genéticos de população e filogeografia em algas vermelhas.

A partir do trabalho de Zucarello *et al.* (1999), vários estudos empregando o espaçador *cox2-3* como marcador molecular para análises filogeográficas foram realizados em algas (Zuccarello & West 2002, Zuccarello *et al.* 2002, Milstein *et al.* 2008). Outros marcadores moleculares também foram incluídos, tais como o *cox1* (Kim & Boo 2012, Kim *et al.* 2012), o COI-5P (Montecinos *et al.* 2012), o espaçador dos genes do cloroplasto que codificam a subunidade grande e pequena da enzima RUBISCO (*rbcL-S*) (Zuccarello *et al.* 2006, Andreakis *et al.* 2007), o *rbcL* (Dumilag & Aguinaldo 2017, Kim & Boo 2012), o LSU (Andreakis *et al.* 2007) e o ITS1 e ITS2 (Zuccarello & West 2002). Assim, os trabalhos de filogeografia objetiva conhecer a estrutura genética de indivíduos, buscando compreender a variabilidade genética (Zuccarello *et al.* 2006, Yow *et al.* 2011, Payo *et al.* 2012), definir limites de distribuição (Andreakis *et al.* 2004, Montecinos *et al.* 2012) e a identificação de origem de introdução de espécies exóticas e invasoras (McIvor *et al.* 2001, Andreakis *et al.* 2007, Sherwood 2008). Essa ferramenta também foi utilizada para estudos de genética de conservação em algas com risco de extinção, e a partir disso foi possível propor unidades prioritárias para conservação (Couceiro *et al.* 2011).

No Brasil até o momento, os estudos de filogeografia incluem os trabalhos de Vis *et al.* (2008), com a espécie de alga doce *Batrachospermum macrosporum* Montagne, e Milstein *et al.* (2008) com populações de *Pyropia spiralis* (E.C. Oliveira & Coll) M.C. Oliveira, D. Milstein & E.C. Oliveira (como *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*).

Para Gelidiales poucos trabalhos sobre filogeografia têm sido realizados. Kim & Boo (2012) e Kim *et al.* (2012), com base nos marcadores *cox1* e *rbcL*, analisaram a estrutura genética, a distribuição e as suas correlações com os padrões geográficos das espécies *Gelidium crinale*, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis e *Gelidium elegans* Kützinger. Boo

et al. (2014b) estudaram a espécie *Capreolia implexa* Guiry & Womersley visando comparar a diversidade genética entre suas populações transoceânicas e testar em qual período houve a distribuição dessa espécie entre o oceano Pacífico sul. Para a costa brasileira, até hoje nenhum trabalho sobre filogeografia de representante da ordem Gelidiales foi realizado.

Diante do panorama apresentado, é evidente a existência de lacuna no conhecimento da estrutura e diversidade genética inter e intraespecífica e o real padrão de distribuição das espécies de Gelidiales no Brasil, além da sua correlação dentro do contexto geográfico, extremamente importante para um melhor entendimento do comportamento dos representantes desta ordem. Além disso, é fundamental que se conheça a variação intraespecífica de *Gelidium* e *Pterocliadiella* a fim de permitir a seleção de linhagens visando o melhoramento genético e, conseqüentemente, servir para melhor aproveitamento do seu produto comercial e como suporte para o uso sustentável e conservação, estimulando a preservação da riqueza biológica de Gelidiales do nosso país. Deste modo, é importante analisar os aspectos filogeográficos de *Gelidium floridanum* e *Pterocliadiella capillacea*, como representantes das famílias Gelidiaceae e Pterocliadiaceae para a costa brasileira.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Considerando a importância do uso sustentável e a conservação de Gelidiales no Brasil, o objetivo geral deste trabalho foi realizar estudos filogeográficos em *Gelidium floridanum* e *Pterocliadiella capillacea* e espécies relacionadas que ocorrem no oceano Atlântico ocidental, com base em dados morfológicos e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a distribuição e diversidade intraespecífica dos espécimes encontrados utilizando os marcadores da mitocôndria e do cloroplasto.
- Realizar análises filogeográficas das espécies estudadas no oceano Atlântico, com ênfase no Brasil.
- Identificar, descrever e ilustrar as características morfológicas utilizadas para delimitar as espécies estudadas.

- Conhecer a diversidade de espécies formadas por táxons morfológicamente relacionadas a *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea*, encontradas neste estudo.

3. Hipóteses

1. *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea* apresentam diversidade intraespecífica devido às barreiras biogeográficas atuantes na costa brasileira.
2. Em vista da similaridade morfológica e complexidade na delimitação de espécies, há mais de uma entidade taxonômica identificada como *G. floridanum* e *P. capillacea*.

4. Material e Métodos

4.1 Coletas e processamento das amostras

Os pontos de coleta foram baseados nos registros de ocorrência das espécies e em locais que possuem algumas características biogeográficas que podem ser caracterizadas como barreiras, tais como afluentes de rios, correntes marítimas, tipo de substrato, regiões de manguezais e estuários, e as divisões ficogeográficas propostas por Horta *et al.* (2001) (Figura 1). Além disso, neste estudo foram também utilizadas amostras que já estavam coletadas e disponíveis no Instituto de Botânica de São Paulo. Sendo assim, todas as amostras pré-identificadas como *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea* foram incluídas e estas são provenientes do: Brasil (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina), Cuba (Cuidad de la Habana e Cienfuegos), Venezuela (Nueva Esparta e Miranda), Itália (Genova) e Portugal (Açores).

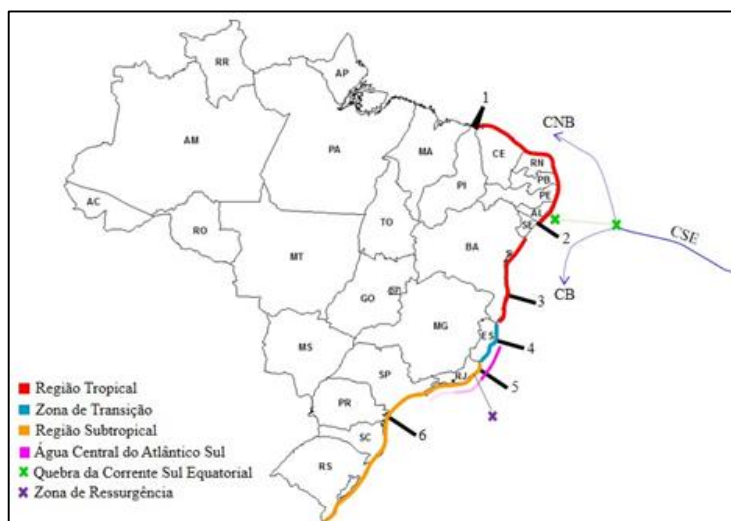


Figura 1: Barreiras biogeográficas hipotéticas. (1) Delta do Parnaíba; (2) Rio São Francisco; (3) Rio Jequitinhonha; (4) Rio Doce; (5) Rio Paraíba do Sul; (6) Baía de Paranaguá; CSE - Corrente Sul Equatorial; CNB - Corrente Norte do Brasil; CB - Corrente do Brasil.

Os locais de coleta de cada amostra, incluindo o país de origem, estado, município, praias e as coordenadas geográficas obtidas com um GPS (Global Positioning System), bem como os coletores, data da coleta, número de tombo no herbário (SP) e número de amostras para estudos moleculares do Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Ficologia (IBT), encontram-se no Anexo A.

O número de amostras por espécie coletado foi de acordo com sua abundância naquele determinado local, sendo assim foi obtido de 1 a 10 indivíduos, excepcionalmente até 19, em cada praia (Tabela 1). A maioria das coletas foi realizada uma única vez em cada praia, nas zonas mediolitoral, durante as marés baixas e, esporadicamente, também no infralitoral.

O material foi coletado com o auxílio de uma espátula, raspando o substrato a fim de conseguir retirar o espécime juntamente com a sua estrutura de fixação. Durante o período de coletas, as amostras foram rapidamente lavadas em água do mar, para retirar o excesso de sedimento e organismos associados e colocadas em sacos plásticos.

Após a coleta, foi realizada a triagem das amostras em bandejas contendo água do mar e utilizando pinça e pincel para retirada das impurezas e organismos acompanhantes. Posteriormente, as algas foram armazenadas em sacos plásticos com fecho hermético, tipo zip, de duas formas: para os estudos moleculares as regiões mais limpas e jovens foram secas em papel absorvente, colocadas individualmente em saquinhos de chá e estes imediatamente em sílica gel para desidratação rápida. Para a análise morfológica e posterior confecção de exsiccatas, o restante do material foi fixado em formol a 4%. Eventualmente, na ausência de formol, algumas amostras foram congeladas. E quando a amostra não era obtida em quantidade suficiente para ser armazenada de duas formas, foi preservada apenas em sílica gel e utilizada para ambos os estudos.

Tabela 1: Número de espécimes coletados por praia e sequenciados por marcador molecular analisado. Cada IBT é referente a uma praia.

<i>Espécie</i>	Código	Estado	Amostras coletadas	N° de amostras sequenciadas				
				<i>rbcL</i> -3P	<i>rbcL</i>	COI-5P	<i>cox1</i>	<i>cox2-3</i>
<i>G. floridanum</i>	IBT0677	ES	1	-	-	1	-	1
<i>G. floridanum</i>	IBT0678	ES	1	-	-	1	-	1
<i>G. floridanum</i>	IBT1579	ES	5	5	1	5	1	5
<i>G. floridanum</i>	IBT1608	SP	10	10	1	9	2	7
<i>G. floridanum</i>	IBT1631	SC	1	1	1	1	1	1
<i>G. floridanum</i>	IBT1991	NE	1	1	1	1	1	1
<i>G. floridanum</i>	IBT2175	RJ	2	2	1	2	2	1
<i>G. floridanum</i>	IBT2184	SP	2	2	-	2	2	-
<i>G. floridanum</i>	IBT2185	SP	1	-	-	1	1	-
<i>G. lineare</i>	IBC0602	CE	1	1	-	-	-	1

Espécie	Código	Estado	Amostras coletadas	N° de amostras sequenciadas				
				<i>rbcL</i> -3P	<i>rbcL</i>	COI-5P	<i>cox1</i>	<i>cox2-3</i>
<i>G. lineare</i>	IBC0603	CE	1	1	-	1	-	1
<i>G. lineare</i>	IBT0350	BA	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT0524	PE	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1523	PB	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1566	PI	1	1	1	1	-	1
<i>G. lineare</i>	IBT1576	ES	5	3	1	4	1	3
<i>G. lineare</i>	IBT1580	CE	10	2	2	2	2	2
<i>G. lineare</i>	IBT1581	CE	10	4	2	4	-	4
<i>G. lineare</i>	IBT1582	CE	10	5	3	5	2	4
<i>G. lineare</i>	IBT1688	RN	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1700	RN	3	3	1	3	1	3
<i>G. lineare</i>	IBT1717	PB	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1891	AL	5	4	2	5	2	2
<i>G. lineare</i>	IBT1892	AL	4	4	3	4	4	3
<i>G. lineare</i>	IBT1937	PE	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1938	PE	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT1948	ES	1	1	1	1	1	1
<i>G. lineare</i>	IBT2053	BA	7	7	3	7	7	2
<i>G. lineare</i>	IBT2063	BA	6	3	2	2	1	2
<i>G. lineare</i>	IBT2065	BA	6	4	1	2	1	2
<i>G. lineare</i>	IBT2078	BA	8	5	2	3	1	3
<i>Gelidium</i> sp. 1	IBT1952	ES	3	3	2	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 1	IBT2097	BA	4	4	1	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBC0555	ES	2	2	1	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBC0558	ES	1	-	-	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1578	ES	2	2	2	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1609	ES	3	3	3	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1824	ES	1	-	-	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 3	IBT1825	ES	1	1	1	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 4	IBT1942	CF	1	1	1	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 4	IBT1944	CF	1	-	-	-	-	-
<i>Gelidium</i> sp. 5	IBT2079	BA	1	1	1	-	-	-
<i>P. beachiae</i>	IBC590	AL	1	1	1	-	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT0351	BA	1	1	-	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1488	BA	1	1	-	-	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1492	BA	1	1	-	-	-	-
<i>P. beachiae</i>	IBT1508	RN	1	1	-	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1583	CE	10	10	1	8	1	4
<i>P. beachiae</i>	IBT1616	PE	1	1	-	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1622	PE	1	-	-	1	-	-
<i>P. beachiae</i>	IBT1692	RN	1	-	-	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1711	PB	1	1	1	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT1714	PB	1	1	-	1	-	-
<i>P. beachiae</i>	IBT1893	PE	2	2	1	2	1	2
<i>P. beachiae</i>	IBT1945	CH	2	2	2	2	1	2
<i>P. beachiae</i>	IBT1946	CH	4	4	1	4	-	4
<i>P. beachiae</i>	IBT1951	BA	5	5	1	5	-	3
<i>P. beachiae</i>	IBT2055	BA	5	4	1	2	-	2

Espécie	Código	Estado	Amostras coletadas	N° de amostras sequenciadas				
				<i>rbcL</i> -3P	<i>rbcL</i>	COI-5P	<i>cox1</i>	<i>cox2</i> -3
<i>P. beachiae</i>	IBT2083	BA	2	1	1	1	-	1
<i>P. beachiae</i>	IBT2101	BA	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	Açores	AC	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT0095	SP	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT0172	SP	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT0300	SP	1	1	-	-	-	-
<i>P. capillacea</i>	IBT0441	SP	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1477	RJ	1	1	-	-	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1574	ES	10	2	-	3	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1575	ES	8	3	1	3	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1577	ES	8	4	1	4	1	2
<i>P. capillacea</i>	IBT1632	SC	9	5	1	8	1	2
<i>P. capillacea</i>	IBT1684	SP	2	2	1	2	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1767	RJ	12	9	1	11	1	3
<i>P. capillacea</i>	IBT1768	SC	5	2	1	2	1	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1818	SP	6	2	1	4	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1826	ES	3	3	1	3	1	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1827	ES	1	1	-	1	-	-
<i>P. capillacea</i>	IBT1828	ES	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1936	RJ	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1939	RJ	1	1	-	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1940	RJ	1	1	-	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1941	ES	5	5	1	3	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT1950	ES	1	1	-	-	-	-
<i>P. capillacea</i>	IBT1955	SP	9	2	1	3	1	-
<i>P. capillacea</i>	IBT1977	SP	19	1	1	19	19	-
<i>P. capillacea</i>	IBT1992	MI	1	1	-	1	1	1
<i>P. capillacea</i>	IBT2100	SP	3	1	1	2	2	1
<i>P. capillacea</i>	IBT2102	SP	7	-	-	1	1	-
<i>P. capillacea</i>	IBT2176	RJ	1	1	1	1	-	1
<i>P. capillacea</i>	IBT2177	RJ	2	2	-	2	-	1
<i>P. capillacea</i>	Itália	GN	1	1	-	-	-	-
Total:			294	190	79	192	73	115

(-) ausência de amostras sequenciadas.

4.2 Estudos morfológicos

A identificação das espécies foi baseada em abordagens atualizadas da taxonomia contemplando especialmente aquelas que são diagnósticas para a identificação das espécies (Thomas & Freshwater 2001, Boo *et al.* 2010, Iha 2014, Jamas 2015). Os cortes anatômicos foram feitos à mão-livre com auxílio de lâmina de aço, corados com azul de anilina a 1% e acidificados com HCl 1M. As ilustrações dos aspectos gerais e dos caracteres diagnósticos de cada espécie foram obtidas com a câmera digital (Canon, Japão) acoplada diretamente à ocular do microscópio e/ou do estereomicroscópio (Zeiss, Alemanha). Para cada espécie

identificada foi montada uma prancha com as fotografias das principais características vegetativas e reprodutivas para sua identificação, juntamente com a descrição desses caracteres e o material examinado.

4.3 Estudos moleculares

4.3.1 Extração de DNA

Uma pequena quantidade (cerca de 30 mg) de amostra do material desidratado foi macerada em um homogeneizador de tecidos (Precellys), utilizando três ciclos de 10 segundos a 6800 rpm. Em seguida, para a realização da extração dos ácidos nucleicos foi seguido os protocolos dos kits de extração de tecidos vegetais “NucleoSpin®Plant II” (Machery-Nagel), “DNeasy® Plant Mini Kit” (Quiagen) ou “GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich). Com todos os kits testados o resultado foi satisfatório. No fim da extração as alíquotas de DNA foram eluídas nas concentrações de 50 e 100 µl. O produto final ficou armazenado no freezer em temperatura de -25°C.

4.3.2 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação através da PCR usando os ‘primers’ específicos para cada região a ser amplificada (Tabela 2). Para o marcador *rbcL*-3P (região 3’ do gene *rbcL* e o espaçador *rbcL*-S) o conjunto de *primers* foi o F993 x RrbcS; no *rbcL*, a amplificação foi obtida em partes com as seguintes combinações: F7 x R753 e F645 x RrbcS ou F57 x R753 e F753 x RrbcS ou F57 x R753, F492 x R1150 e F993 x RrbcS; para o COI-5P foram usados dois conjuntos, GazF1 x GazR1 ou GWSFn x COX1R1; para o *cox2-3* foi desenhado um primer 5’, COX2Fi, para ser combinado com o COX3R; e para o *cox1* foi utilizado a combinação do COX1F43 x COX1R1549. Os ciclos utilizados para cada marcador estão detalhados na tabela 3.

A PCR foi realizada utilizando os kits “ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix” (Sigma-Aldrich), “GoTaq® Green Master Mix” (Promega) ou “puReTaq Ready-To-Go PCR Beads” (GE Healthcare). Todos os kits apresentaram resultados satisfatórios. Para os dois primeiros kits citados foi possível realizar a reação utilizando apenas metade (25 µl) do volume dos reagentes sugerido pelo protocolo (50 µl), mantendo o volume de 1 µl de DNA.

Tabela 2: Marcadores moleculares e respectivos *primers* utilizados para amplificação por PCR e sequenciamento.

Marcadores	<i>primers</i>	Sequências 5' - 3'	Referências
<i>rbcL</i>	F7	AACTCTGTAGAACGNACAAG	Gavio & Fredericq 2002
	F57	GTAATTCGATATGCWAAAATGGG	Freshwater & Rueness 1994
	F492	CGTATGGATAAATTTGGTCG	Freshwater & Rueness 1994
	F645	ATGCGTTGGAAAGAAAGATTCT	Lin <i>et al.</i> 2001
	F753	GGAAGATATGTATGAAAGAGC	Freshwater & Rueness 1994
	F993	GGTACTGTTGTAGGTAAATTWGAAGG	Freshwater & Rueness 1994
	R753	GCTCTTTCATACATATCTTCC	Freshwater & Rueness 1994
	R1150	GCATTTGTCCGCAGTGAATACC	Freshwater & Rueness 1994
	RrbcS	GTTCTTTGTGTTAATCTCAC	Freshwater & Rueness 1994
<i>cox1</i>	COXI43F	TCAACAAATCATAAAGATATTGGWACT	Geraldino <i>et al.</i> 2006
	COXI1549R	AGGCATTTCAAANGTATGATA	Geraldino <i>et al.</i> 2006
COI – 5P	GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	Saunders 2005
	GWSFn	TCAACAAAYCAYAAAAGATATYGG	Le Gall & Saunders 2010
	GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA	Saunders 2005
	coxIR1	ATACATATGATGHGCTCAA	Saunders 2005
<i>cox2-3</i>	cox2Fi	CATGGATTTATGCCTATTG	desenhado para este trabalho
	cox3R	GGATCTACWAGATGRAAWGGATGTC	Zucarello <i>et al.</i> 1999

Tabela 3: Etapas do ciclo de amplificação utilizadas na PCR.

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Referência
----- 35 ciclos -----						
<i>rbcL-3P</i>	94°C - 4'	94°C - 1'	42°C - 1'	72°C - 1' 30"	72°C - 10'	Lindstron & Fredericq 2003 (modificado)
<i>rbcL</i>	95°C - 4'	94°C - 1'	45°C - 1'	72°C - 1' 30"	72°C - 10'	
COI-5P	94°C - 5'	94°C - 30"	45°C - 1'	72°C - 2'	72°C - 7'	Cassano 2009 (modificado)
<i>cox1</i>	94°C - 10'	90°C - 30"	50°C - 30"	72°C - 2'	72°C - 10'	Geraldino <i>et al.</i> 2010
----- 45 ciclos -----						
<i>cox2-3</i>	94°C - 3'	94°C - 30"	55°C - 30"	72°C - 1'	72°C - 5'	Maggs <i>et al.</i> 2013

4.3.3 Eletroforese em gel e Purificação

Após a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão tris-borato-EDTA e corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, Califórnia),

utilizando um marcador de tamanho de DNA padrão (1 Kb DNA Ladder - Gibco BRL) para verificar os tamanhos dos fragmentos amplificados. As amostras foram submetidas a 60 volts e 100 amperes por 30 minutos.

Em seguida, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “GFX MicroSpin™” (GE Healthcare). Para obtenção de um melhor resultado e evitar a perda do material nesse processo foi preciso utilizar metade do volume dos reagentes propostos no protocolo e eluir o DNA em torno de 15-20 µl. Como alternativa, foi usado também o kit “ExoProStar 1-Step (Enzymatic PCR and Sequencing Clean-up, GE Healthcare)” para purificação das amostras, sendo que para obtenção de um volume final maior, utilizou-se o dobro do reagente e de produto da PCR estipulado pelo protocolo, ficando com um final de 14 µl. Em seguida, esses produtos foram quantificados através da visualização das bandas formada pela eletroforese em gel de agarose e sequenciados.

4.3.4 Reação de sequenciamento e Precipitação

A reação de sequenciamento dos marcadores moleculares a partir dos produtos de PCR purificados e quantificados foram feitos pela empresa “Macrogen advancing through genomics” (<http://dna.macrogen.com/eng/>), onde foram sequenciados em sequenciadores 3730XL (Applied Biosystems). Eventualmente, as reações de sequenciamento foram feitas utilizando o protocolo do kit “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). O produto foi precipitado em EDTA 125Mm, acetato de sódio 3M e etanol 100%, seguido da lavagem com etanol 70%. As amostras foram sequenciadas em sequenciadores 3130 ou 3500XL (Applied Biosystems) pela empresa “Genomic - Engenharia Molecular” (<http://genomic.com.br/>).

4.3.5 Alinhamento das sequências

As sequências consenso para cada marcador de amostra foram montadas usando o programa Geneious 10.1.3 ou BioEdit 7.2.5 a partir das sequências obtidas nas direções direta e reversa. Nucleotídeos divergentes ocorrendo na mesma posição foram verificados manualmente nos cromatogramas. As sequências consenso obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados (GenBank - GB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com o uso do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.* 1997).

Com as sequências consensos foram construídas matrizes para cada marcador utilizando o programa Geneious ou BioEdit. Essas matrizes foram utilizadas para as análises de agrupamento e rede de haplótipos.

4.3.6 Análise de agrupamento

A identificação preliminar dos espécimes foi feita com base em sequências de comparação, correndo análises de agrupamento com os marcadores *rbcL* para *Gelidium* e o *rbcL*-3P para *Pterocladella*. O *rbcL* e *rbcL*-3P foram escolhidos para identificação dos espécimes, porque eles têm se mostrado um gene com variação genética relevante para os estudos intergenéricos, intra e interespecíficos e diferenciação de espécies morfologicamente relacionadas, além da utilização desses marcadores em diversos trabalhos com representantes de Gelidiales (Freshwater & Rueness 1994, Freshwater *et al.* 1995, Sohrabipour *et al.* 2013, Boo *et al.* 2016). Nas análises foram incluídas sequências do holótipo ou da localidade tipo, quando existentes, e de espécies próximas obtidas do GB. Levando em conta que não há localidade tipo especificada no Mar Mediterrâneo, para *P. capillacea*, foi utilizada uma sequência da França como referência. As sequências obtidas do GB se encontram na tabela 4. A árvore de agrupamento foi gerada no MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) usando o algoritmo de Neighbor-joining (NJ), com 1000 réplicas de Bootstrap e modelo de substituição de Kimura dois parâmetros (Kimura 1980). Foram utilizadas duas sequências como grupo externo, *Gracilaria cearensis* (A.B. Joly & Pinheiro) A.B. Joly & Pinheiro (KT881566), pertencente à ordem Gracilariales e *Rhodymenia pseudopalmata* (J.V. Lamouroux) P.C. Silva (AY168656), pertencente à ordem Rhodymeniales.

4.3.7 Análise de diversidade da população

Rede de haplótipos foram inferidas para os marcadores *rbcL*-3P, COI-5P e *cox2*-3, em alguns casos o *cox1* e *rbcL* também foram analisados, com o algoritmo de Median-joining, implementada no Network 5.0 (Bandelt *et al.* 1999). Sequências das espécies estudadas foram importadas do GenBank (GB) quando viáveis e os respectivos números de acessos estão dispostos na tabela 4. ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) foi usado para calcular a diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π) (Nei 1987) e os testes de neutralidade de Tajima's D (Tajima 1989) e Fu's F_s (Fu 1997).

Tabela 4: Sequências obtidas do GenBank para comparação.

Espécie	Número de acesso		Local	Referência
	<i>rbcL</i>	<i>COI-5P</i>		
<i>Gelidium crinale</i> (Hare ex Turner) Gaillon	HM629823	-	Coréia	Kim <i>et al.</i> 2011
	KU958474	-	Itália	Não publicado
<i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor	U00106	-	Venezuela	Freshwater <i>et al.</i> 1994
	U00107	-	Flórida*	Freshwater <i>et al.</i> 1994
	AF305797	-	Costa Rica	Thomas & Freshwater 2001
	KT208101	KT207996	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	KT208102	KT207997	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT207993 a KT207995	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT207998 a KT208001	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	KT208105	KT208015	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208118	KT208030	Brasil*	Iha <i>et al.</i> 2016
	KX069248 a KX069259	-	Panamá	Iha <i>et al.</i> 2016
<i>Gelidium lineare</i> Iha & Freshwater	KX555619	KX574734	Brasil	Não publicado
	KX555620	KX574729	Brasil	Não publicado
	-	KT208037	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT208038	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KX573733	Brasil	Não publicado
	-	KX574727	Brasil	Não publicado
	-	KX574728	Brasil	Não publicado
	-	KX573730	Brasil	Não publicado
	-	KX574732	Brasil	Não publicado
	-	-	-	-
<i>Gelidium pluma</i> Bornet ex N.H. Loomis	AF522367	-	Havaí	Tronchin <i>et al.</i> 2003
<i>Gelidium sclerophyllum</i> W.R. Taylor	KC192651	-	Costa Rica	Grusz & Freshwater 2014
<i>Gelidium</i> sp.	KT208106	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208115	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208116	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208117	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208119	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KT208120	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2016
	KX555615	-	Brasil	Não publicado
<i>Pterocladia</i> <i>beachiae</i> Freshwater	AF305811	-	Costa Rica **	Tronchin & Freshwater 2001
	JN114113	-	Panamá	Não publicado
	KC209073	KC209094	Malásia	Sohrabipour <i>et al.</i> 2013
	KC209074	-	Malásia	Sohrabipour <i>et al.</i> 2013
	KC209075	KC209093	Malásia	Sohrabipour <i>et al.</i> 2013
	KC209076	KC209095	Malásia	Sohrabipour <i>et al.</i> 2013
	KT920277	KT920402	Malásia	Boo <i>et al.</i> 2016
	KT208125	-	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	KT208126	KT208060	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT208058	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT208059	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KT208061	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015

Espécie	Número de acesso		Local	Referência
	<i>rbcL</i>	COI-5P		
<i>Pterocladia beachiae</i> Freshwater	-	KT208062	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	-	KX574752 a KX574758	Brasil	Não publicado
	KX555622	KX574759	Brasil	Não publicado
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand	AB023841 a AB023850	-	Japão	Shimada <i>et al.</i> 2000a
	AB023852 a AB023858	-	Japão	Shimada <i>et al.</i> 2000a
	GU731207 e GU731208	-	Coreia	Boo <i>et al.</i> 2010
	GU731210 a GU731212	-	Coreia	Boo <i>et al.</i> 2010
	GU731216 a GU731219	-	Coreia	Boo <i>et al.</i> 2010
	HM629845	HM629885	Coreia	Kim & Boo 2010
	U07153	-	Nova Zelândia	Freshwater <i>et al.</i> 1994
	U24156	-	Nova Zelândia	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	AY352421	-	Austrália	Sohrabipour <i>et al.</i> 2013
	U01898	-	Austrália	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	GU731214	-	Mônaco	Boo <i>et al.</i> 2010
	GU731209	-	França	Boo <i>et al.</i> 2010
	GU731213	-	França*	Boo <i>et al.</i> 2010
	GU731215	-	França	Boo <i>et al.</i> 2010
	U01888	-	Itália	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	U01891	-	Irlanda	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	U01896	-	EUA - Califórnia	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	U01897	-	EUA - Havaí	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	U01889	-	Espanha	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	U01893	-	Venezuela	Freshwater <i>et al.</i> 1995
	-	KT208065	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	KT208128	KT208068	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	KT208129	KT208074	Brasil	Iha <i>et al.</i> 2015
	U01895	-	Brasil	Freshwater <i>et al.</i> 1995
<i>Gracilaria cearensis</i> (A.B.Joly & Pinheiro) A.B.Joly & Pinheiro	KT881566	-	Brasil	Soares <i>et al.</i> 2015
<i>Rhodomenia pseudopalmata</i> (J.V.Lamouroux) P.C.Silva	AY168656	-	EUA	Gurgel & Fredericq 2004

(*) sequência de espécime da localidade tipo; (**) sequência do holótipo.

5. Resultados e Discussão

Ao longo da costa brasileira, incluindo algumas regiões do Oceano Atlântico, um total de 294 amostras foram analisadas e inicialmente identificadas como *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea*. Após análises morfológicas e moleculares, elas resultaram em nove entidades distintas, quais sejam: *Gelidium floridanum*, *G. lineare* e cinco espécies ainda indefinidas (*Gelidium* sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4, sp. 5), *Pterocladia beachiae* e *P. capillacea*.

A distribuição geográfica e a quantidade de amostras que corresponderam às espécies identificadas encontram-se listadas na tabela 5. A quantidade de indivíduos coletados por local de amostragem, o número de espécimes que foi sequenciado e os respectivos marcadores moleculares estão listados na tabela 1.

Tabela 5: Distribuição geográfica e a quantidade de amostras analisadas das espécies de *Gelidium* e *Pterocladella*.

País	Brasil									Venezuela		Cuba		Portugal		Itália	Total	
Espécie/Local	PI	CE	RN	PB	PE	AL	BA	ES	RJ	SP	SC	NE	MI	CH	CF	AC	GN	
<i>G. floridanum</i>	-	-	-	-	-	-	-	7	2	13	1	1	-	-	-	-	-	24
<i>G. lineare</i>	1	32	4	2	3	9	28	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85
<i>Gelidium</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
<i>Gelidium</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Gelidium</i> sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Gelidium</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
<i>Gelidium</i> sp. 5	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. beachiae</i>	-	10	2	2	4	1	16	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	41
<i>P. capillacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	37	19	50	14	-	1	-	-	1	1	123
Total	1	42	6	4	7	10	49	64	21	63	15	1	1	6	2	1	1	294

(-) ausência de espécimes coletados. PI - Piauí; CE - Ceará; RN - Rio Grande do Norte; PB - Paraíba; PE - Pernambuco; AL - Alagoas; BA - Bahia; ES - Espírito Santo; RJ - Rio de Janeiro; SP - São Paulo; SC - Santa Catarina; NE - Nueva Esparta; MI - Miranda; CH - Ciudad de la Habana; CF - Cienfuegos; AC - Açores; GN - Genova.

5.1 Delimitação morfológica e molecular das espécies de *Gelidium* e *Pterocladella*

Espécies de *Gelidium*

A delimitação preliminar dos espécimes de *Gelidium* foi feita com base em agrupamento das sequências do marcador *rbcL* por Neighbor-joining (NJ). Essa árvore foi gerada com um alinhamento múltiplo com 50 sequências, sendo 33 obtidas no presente estudo e 17 sequências disponíveis no GenBank (GB) (Tabela 4), totalizando 1301 pares de bases (pb), excluindo-se os primers da PCR. O resultado mostra sete grupos bem distintos, cada um representando uma espécie diferente (Figura 2). A divergência interespecífica encontrada, entre todas as sequências utilizadas na montagem da árvore, foi de 0,2-13,3%. Levando-se em conta apenas as amostras obtidas neste estudo, a divergência foi de 0,7-12,9% (Tabela 6), sendo a menor entre *Gelidium* sp. 4 e *Gelidium* sp. 5 (0,7%) e a maior entre *Gelidium floridanum* e *Gelidium* sp. 3 (12,9%). A quantidade de indivíduos coletados por local de amostragem, o número de espécimes que foi sequenciado e os respectivos marcadores moleculares estão listados na tabela 1.

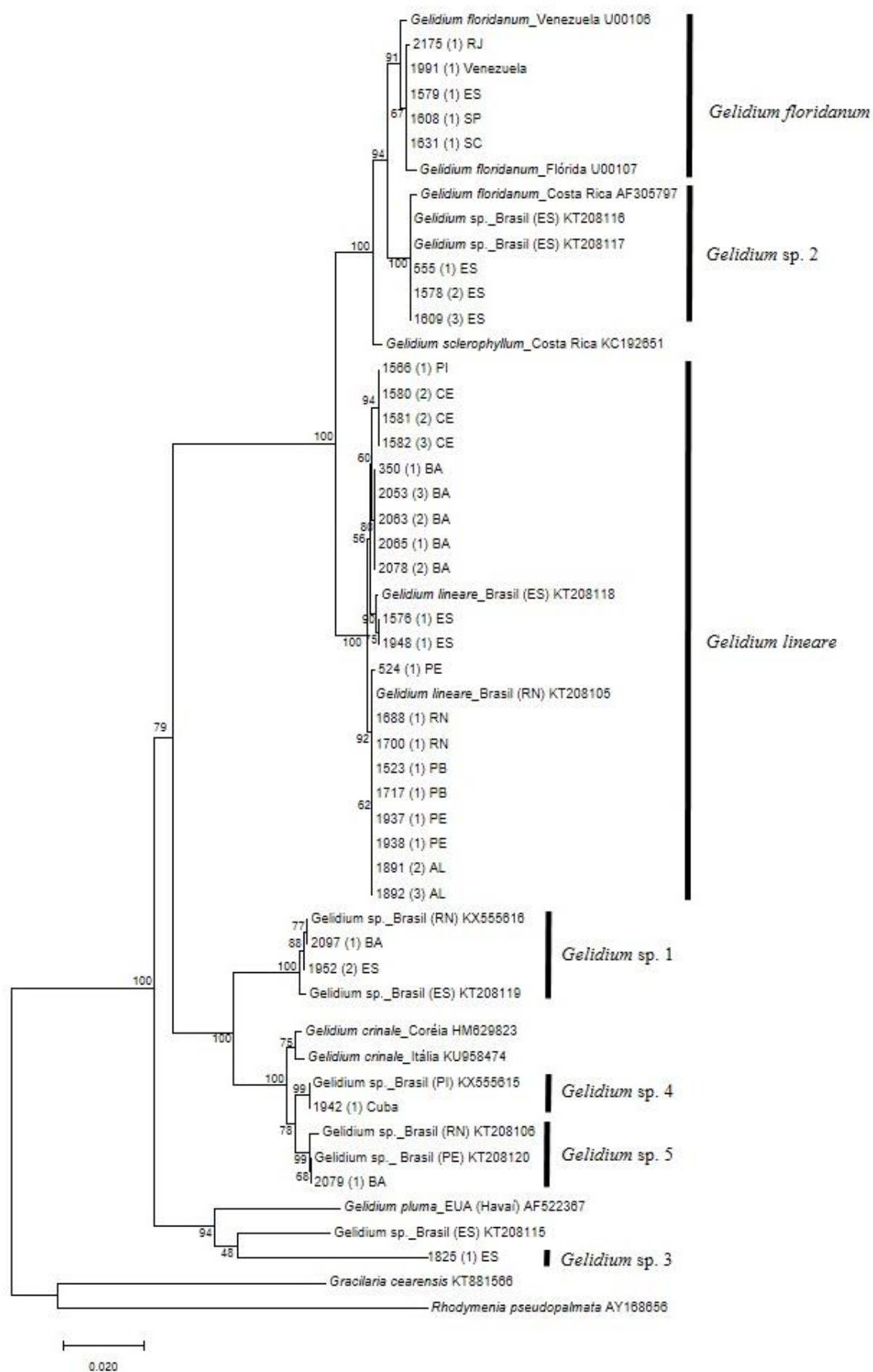


Figura 2: Árvore de agrupamento por NJ com o marcador *rbcL* para *Gelidium*. Números entre parênteses referem-se à quantidade de sequências analisadas. Números nos ramos indicam valores de bootstrap.

Tabela 6: Valores de divergência interespecífica para o marcador *rbcL* em espécies de *Gelidium*. Número de nucleotídeos divergentes está indicado na porção superior aos traços (-) e porcentagem (%) de divergência na porção inferior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>G. floridanum</i>	-	35-39	113-115	11-13	167	117-118	115-117
2. <i>G. lineare</i>	2,7-3,0	-	106-109	35-37	160-162	102-107	104-107
3. <i>Gelidium</i> sp. 1	8,7-8,9	8,2-8,4	-	117-118	137-139	46-48	45-46
4. <i>Gelidium</i> sp. 2	0,9-1,0	2,7-2,9	9,0 - 9,1	-	170	122	120
5. <i>Gelidium</i> sp. 3	12,9	12,3-12,5	10,6-10,7	13,1	-	127	127
6. <i>Gelidium</i> sp. 4	9,0-9,1	7,9-8,3	3,6-3,7	9,4	9,8	-	9
7. <i>Gelidium</i> sp. 5	8,9-9,0	8,0-8,3	3,5-3,6	9,3	9,8	0,7	-

As amostras de *Gelidium floridanum* da Venezuela, Espírito Santo, Rio de Janeiro e de São Paulo agruparam-se com *G. floridanum*, da Flórida, USA, localidade-tipo da espécie, divergindo em apenas 0,2-0,3%, confirmando a identidade específica dessas amostras. Por outro lado, uma amostra da Costa Rica identificada como *G. floridanum* (AF305797, Thomas & Freshwater 2001) não se agrupou com *G. floridanum* da localidade tipo, porém formou um clado intimamente relacionado com *Gelidium* sp. 2, do Espírito Santo, com divergência de 0,2%. *Gelidium* sp. 2 não apresentou nenhuma divergência com as amostras referidas como *Gelidium* sp. 10 por Iha (2014), mostrando que se tratam de uma mesma entidade taxonômica. Os grupos *Gelidium floridanum* e *Gelidium* sp. 2 são divergentes em 0,9-1,3%.

Gelidium sclerophyllum W.R. Taylor, da Costa Rica, mostrou-se também proximamente relacionado com o grupo *Gelidium* sp. 2, porém divergindo entre si em 0,9-1,3%, e com o grupo de *G. floridanum*, em 1,1-1,3%. Entretanto, é possível perceber que os valores de divergência inter e intraespecífica se sobrepõem para esses táxons com o marcador *rbcL*. Segundo Boo *et al.* (2014), valores de divergência entre 1-2% são suficientes para diferenciar espécies próximas de *Gelidium*, embora Freshwater *et al.* (2010) afirmem que valores de 1-2% entre espécimes podem ou não pertencer a uma mesma espécie em representantes de Gelidiales. Assim, no presente estudo consideramos que *G. floridanum* e *Gelidium* sp. 2 representam espécies distintas. Porém, é importante ressaltar que análises com marcadores mais variáveis para essas espécies devem ser realizadas a fim de confirmar a distinção dos táxons com maior segurança.

Todas as amostras de *Gelidium lineare* agruparam-se com a sequência da localidade tipo (Espírito Santo) mostrando pertencerem à uma mesma entidade taxonômica, com divergência intraespecífica de 0,1-0,5%.

No presente estudo, *Gelidium* sp. 1, *Gelidium* sp. 4 e *Gelidium* sp. 5 formaram clados independentes e relacionados a *G. crinale*, que possui ampla distribuição no Brasil.

Gelidium sp. 1, de ocorrência no Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo, apresentou divergência intraespecífica de 0,1-0,3%, e agrupou com os espécimes referidos como *Gelidium* sp. 2 nos trabalhos de Iha *et al.* (2015) e Jamas (2015), encontrados no Espírito Santo e Rio Grande do Norte, respectivamente. Este grupo apresentou alta divergência genética (3,3-3,4%) em relação a *G. crinale*, confirmando que são espécies distintas. Portanto, concluiu-se que *Gelidium* sp. 1 pertence a um único táxon, com elevado potencial como candidata à espécie nova. Segundo Iha (2014) e Jamas (2015) *Gelidium* sp. 1 (como *Gelidium* sp. 2) é de ocorrência rara e ainda pouco conhecida, corroborando com o presente estudo, visto que poucos exemplares do táxon só foram encontrados nos estados do Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo (Figura 2).

Gelidium sp. 4 e *Gelidium* sp. 5 formam grupos irmãos divergentes entre si em 0,7% e se mostraram relacionados a *G. crinale*, divergindo em 0,8-0,9% e 1,0%, respectivamente. O grupo formado por *Gelidium* sp. 4 inclui espécimes de Cuba e do Piauí, proposto como *Gelidium* sp. 1 por Jamas (2015), enquanto que *Gelidium* sp. 5 contém espécimes da Bahia e do Rio Grande do Norte e Pernambuco denominado *Gelidium* sp. 1 por Iha *et al.* (2015). Estes dois grupos correspondem a *Gelidium calidum* Jamas, Iha & M.T. Fujii, uma espécie nova recentemente proposta por Jamas *et al.* (2017). Entretanto, no presente estudo consideramos ambas como espécies distintas, visto que, apesar de Freshwater *et al.* (2010) sugerirem que divergências menores que 1% para *rbcL* corresponde à uma mesma espécie em Gelidiales, para *Gelidium* já foi relatado espécies-irmãs com baixa diversidade interespecífica. Shimada *et al.* (2000b) encontraram em *G. linoides* Kützinger versus *G. tenuifolium* Shimada, Horiguchi & Masuda e entre *G. koshikianum* Shimada, Horiguchi & Masuda versus *G. allanii* V.J.Chapman divergências de apenas 0,3 e 0,4%, respectivamente. Boo *et al.* (2014) também consideraram *G. isabelae* W.R. Taylor distinta de *G. microdenticum*, com divergência entre elas de 0,6%. Desta forma, para este trabalho foi considerado que *Gelidium* sp. 4 e *Gelidium* sp. 5 são táxons distintos, embora análises com outros marcadores sejam necessários para confirmar o limite de distinção desses táxons.

Gelidium sp. 3 foi encontrada apenas uma vez, no Espírito Santo. Esta espécie mostrou-se não relacionada a nenhuma espécie de *Gelidium* conhecida até o momento. As espécies que mais se aproximaram foram *Gelidium* sp. 11 do Espírito Santo proposta por Iha *et al.* (2015) e *G. pluma* Bornet ex N.H. Loomis, do Havaí (Tronchin & Freshwater 2003) porém a divergência entre essas espécies são de 7% e 9,4%, respectivamente, claramente

mostrando que são espécies distintas. Portanto, devido à alta divergência encontrada, *Gelidium* sp. 3 é uma forte candidata à espécie nova para a ciência.

Espécies de *Pterocladella*

A delimitação dos espécimes de *Pterocladella* foi feita com base em uma árvore de agrupamento (NJ), com o marcador *rbcL*-3P. A árvore foi gerada com um alinhamento múltiplo com 96 sequências, sendo somente duas sequências obtidas do GB (Tabela 4), num total de 517 pb (448 pb do gene 3' *rbcL* e 69 pb do espaçador *rbcL*-S), excluindo-se os primers.

A árvore de NJ resultou em dois grupos bem distintos, sendo que cada grupo representa uma espécie diferente (Figura 3). A divergência interespecífica encontrada foi de 9,9%. As espécies *Pterocladella beachiae* e *P. capillacea* não apresentaram diversidade intraespecífica.

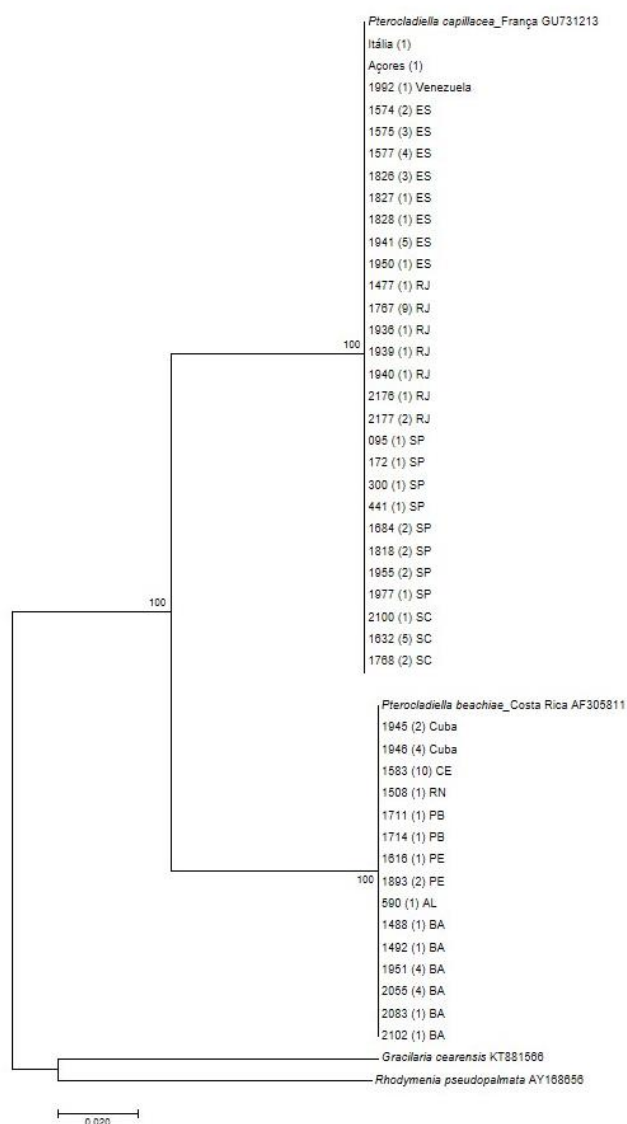


Figura 3. Árvore de agrupamento por NJ para o marcador *rbcL*-3P para *Pterocladella*. Números entre parênteses refere-se a quantidade de sequências analisadas. Números nos ramos indicam valor de bootstrap.

As amostras de *Pterocladia beachiae* do presente estudo agruparam perfeitamente com a sequência da Costa Rica (localidade tipo), confirmando a identificação específica e a sua distribuição no nordeste do Brasil e para Cuba, região caraíbia.

Todas as amostras de *Pterocladia capillacea* analisadas no presente estudo também agruparam perfeitamente com a sequência da França (considerada como referência da localidade tipo), sem nenhuma diversidade intraespecífica, confirmando, assim, a identificação da espécie para Itália, Açores, Cuba, Venezuela e sudeste e sul do Brasil.

O estado do Espírito Santo é considerado uma zona de transição entre a regiões ficogeográficas tropical (do Ceará à Bahia) e a subtropical (do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul), propostas por Horta *et al.* 2001. Essa região foi a que apresentou maior diversidade de espécies, correspondendo a seis espécies das nove encontradas neste estudo: *G. floridanum*, *G. lineare*, *Gelidium* sp. 1, *Gelidium* sp. 2, *Gelidium* sp. 3 e *P. capillacea*. Esse fato deve estar relacionado a ocorrência de ampla diversidade de ambientes, desde formações recifais, costões rochosos, substrato com algas calcárias e rodólitos e algumas porções de manguezal. Esta é uma região que sofre influência da corrente de Bengala, formada por águas frias vindas do Atlântico Sul, contribuindo para a ocorrência também de algas típicas da região subtropical (Horta *et al.* 2001, Miloslavich *et al.* 2016). Além disso, a plataforma continental do sudeste brasileiro apresenta condições temperadas devido a influência da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (Yoneshigue-Valentine *et al.* 1995).

5.2 Aspectos morfológicos

No presente trabalho foram identificadas sete espécies de *Gelidium* e duas espécies de *Pterocladia*, com as descrições abaixo:

Gelidium floridanum W.R. Taylor, Papers of the Michigan Academy of Sciences, Arts and Letters 28: 153, 1943.

Holótipo: Herbário do Jardim Botânico de Nova York (NYBG)

Localidade tipo: Indian River, Flórida.

Figura 4

Planta ereta, cartilaginosa, vermelho vinácea, 3-6,5 cm de altura, isolados ou formando tufo densos, fixos ao substrato por apressórios do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides

originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos, cilíndricos nas porções basais e comprimidas mais acima, com ápice obtuso com uma única célula apical entre lobos. Ramificação pinada, alterna ou irregular, com ramos de até 3ª ordem apresentando a base constrita. Ramos secundários seguem o mesmo padrão de ramificação do eixo principal. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 5-8 camadas de células medulares, levemente alongadas, 12,5-20 µm de diâmetro e 2-4 camadas de células corticais arredondadas, 5-7,5 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 250 µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com até 6 camadas de células arredondadas, 12-24 µm de diâmetro e 2-3 camadas de células corticais arredondadas, 5 µm de diâmetro. No eixo principal, rizines localizadas na região medular e no estolão, no córtex interno. Soros de tetrasporângios ovóides a alongados dispostos nas porções apicais dos ramos secundários. Em corte transversal, extremidades arredondadas, inférteis e com rizines. Tetrasporângios cruciados, com 26 µm de largura e 30 µm de comprimento. Espécimes femininos e masculinos não foram encontrados.

Material examinado

Brasil: Espírito Santo: Serra, Praia de Carapebus (20°14'21"S/40°12'45"O), 26-III-2013, tetraspóricas (SP 428770, IBT 1579), col. C.H. Kano & L.P. Machado. Rio de Janeiro: Arraial do Cabo, Praia Grande, Ponta da Cabeça (22°58'35"S/42°02'05"O), 11-XI-2015, tetraspóricas (SP 469569, IBT 2176), col. B.B. Souza. São Paulo: Guarujá, Praia do Éden (23°59'14"S/46°11'08"O), 17-IX-2016, tetraspóricas (SP 469721, IBT 2184), col. B.B. Souza; Itanhaém, Praia de Cibratel (24°13'31"S/46°51'7"O), 28-V-2013, inférteis (SP 428760, IBT 1608), col. M. Jamas. Santa Catarina, Florianópolis, Praia da Joaquina (27°37'44"S/48°26'55"O), 16-XI-2013, inférteis (SP 428877, IBT 1631), col. D. Milstein & L.P. Machado. Venezuela: Nueva Esparta: Isla de Margarita, Bahía de Manzanillo, 3-V-2015, tetraspóricas (SP 468853, IBT 1991), col. A. Velásquez & M. Duque.

Comentários

As características morfológicas analisadas foram idênticas às descrições apresentadas em Iha (2014) e Jamas (2015) e ao tipo (Taylor 1943).

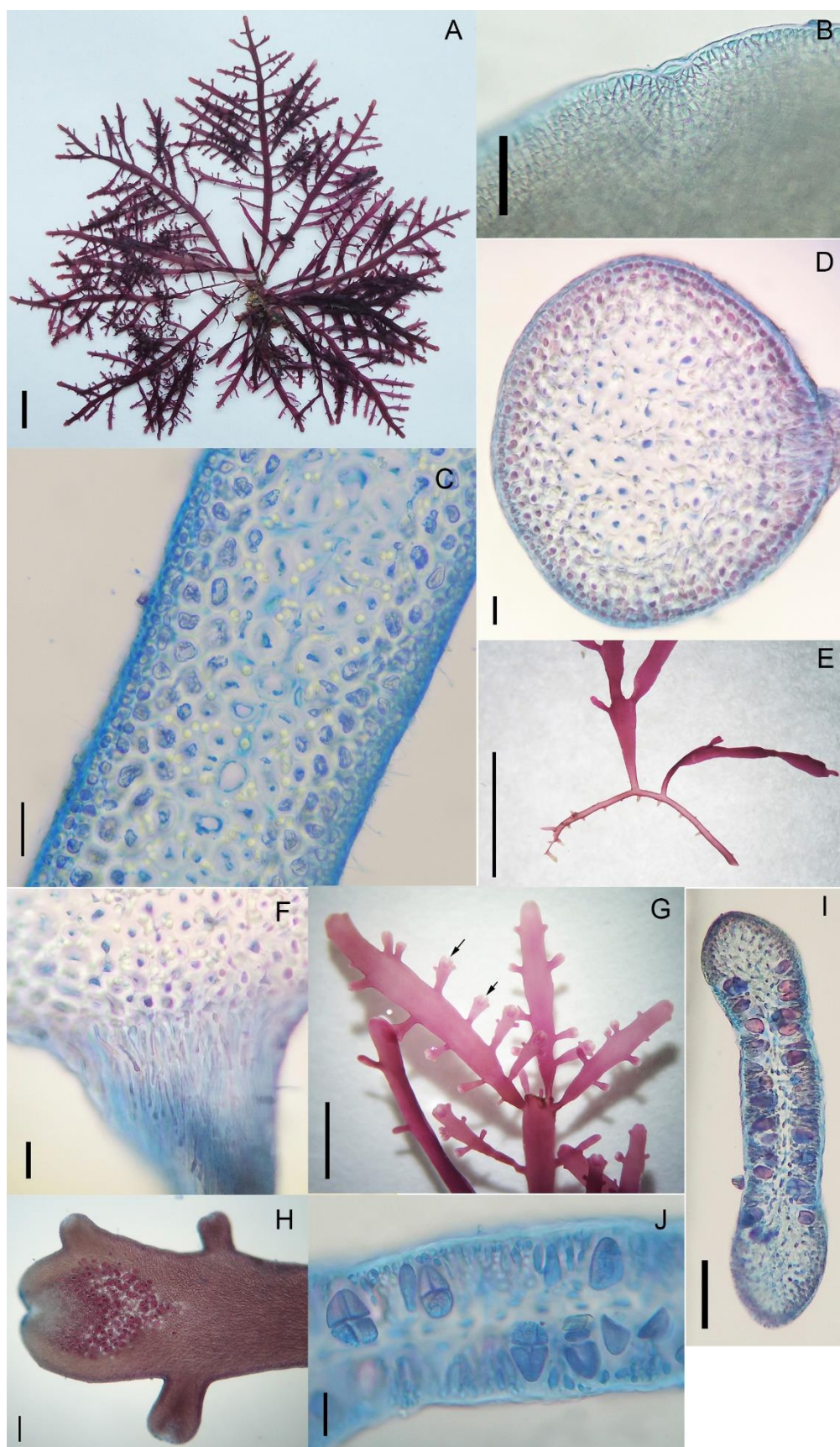


Figura 4: *Gelidium floridanum*. (A) Hábito geral (0,5cm). (B) Célula apical (25µm). (C) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (D) Corte transversal do estolão (25µm). (E) Apressório (0,5cm). (F) Corte longitudinal do apressório (25µm). (G) Planta tetraspórica (setas indicam os soros de tetrasporângios) (0,5cm). (H) Soro de tetrasporângio (0,5cm). (I) Corte transversal do soro de tetrasporângio (250µm). (J) Detalhe do corte de tetrasporângios, mostrando os tetrasporângios cruciados (25µm).

Gelidium lineare Iha & Freshwater, Phycologia 55(5): 555-563, 2016

Holótipo: Herbário do Instituto de Biociências - USP (SPF 57727)

Localidade tipo: Praia dos Castelhanos, Anchieta, Espírito Santo, Brasil

Figuras 5 e 6

Planta ereta, cartilaginosa, vermelho vináceo escuro, 2-12 cm de altura, isolados ou formando tufos densos, fixos ao substrato por apressório do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos achatados com ápice agudo com presença de uma única célula apical saliente ou obtuso com a célula apical entre lobos. Ramificação pinada, alterna ou irregular, com ramos de até 3º ordem. Ramos secundários seguem o mesmo padrão do eixo principal. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 5-6 camadas de células medulares, arredondadas, 13-25 µm de diâmetro e 3-4 camadas de células corticais arredondadas, 6-7,5 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 500 µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com 3-4 camadas de células arredondadas, 15 µm de diâmetro e 2-3 camadas de células corticais, arredondadas, 7,5-10 µm de diâmetro. Rizines abundantes no córtex interno em todo talo e no estolão. Soros de tetrasporângios globoides ou ovóides dispostos nos ápices dos ramos secundários. Em corte transversal, extremidades arredondadas, inférteis e com rizines. Tetrasporângios tetraédricos ou cruciados, com 25 µm de largura e 38 µm de comprimento. Cistocarpo globoide subterminal disposto no ápice dos ramos secundários. Bilocular, dois ostíolos e pericarpo revestido por 3 camadas de células corticais. Soros de espermatângios arredondado dispostos nos ápices dos últimos ramos, variando de um a múltiplos soros por ramo, 50 µm de diâmetro. Espermácios formados por divisão transversalmente entre as células corticais e abundantes rizines na medula.

Material examinado

Brasil: Ceará: São Gonçalo do Amarante, Praia da Taíba (3°30'14"S/38°54'28"O), 28-VI-2013, femininas e tetraspóricas (SP 428759, IBT 1582), col. C.H. Kano & L. Soares; Caucaia, Praia do Pacheco (3°40'58"S/38°39'4"O), 28-VI-2013, tetraspóricas (SP 428757, IBT 1580), col. C.H. Kano & L. Soares. Pernambuco: Recife, Ilha de Itamaracá, (07°44'53"S/34°49'50"O), 21-III-2015, inférteis (SP 469567, IBT 1937), col. M.T. Fujii; Recife, Praia Boa Viagem (08°14'34"S/34°55'68"O), 11-III-2009, inférteis (SP 468910, IBT 524), col. M.T. Fujii; Alagoas: São Miguel dos Milagres, Barra do Boqueirão (9°07'20"S/35°16'16"O), 22-XI-2014, masculinas (SP 469094, IBT 1892), col. M.T. Fujii et

al. Bahia: Ilha de Tinharé, Praia Ponta Ponã (13°27'14"S/38°53'17"O), 30-VII-2015, tetraspóricas (SP 468911, IBT 2053), col. M.T. Fujii & B.B. Souza; Ilha de Boipeba, Praia da Barra (13°34'37"S/38°55'0"O), 1-VIII-2015, tetraspóricas (SP 468918, IBT 2078), masculinas (SP 468919, IBT 2082), col. M.T. Fujii & B.B. Souza; Ilha de Boipeba, Praia Moreré (13°35'37"S/38°53'37"O), 31-VII-2015, femininas e tetraspóricas (SP 468915, IBT 2063; SP 468917, IBT 2065), col. M.T. Fujii & B.B. Souza. Espírito Santo: Fundão, Enseada das Garças (20°01'52"S/40°09'42"O), 21-VI-2013, tetraspóricas (SP 468888, IBT 1576), col. C.H. Kano & L.P. Machado; Serra, Praia de Carapebus (20°14'21"S/40°12'45"O), 23-VI-2013, tetraspóricas (SP 468889, IBT 1948), col. C.H. Kano & L.P. Machado.

Comentários

Gelidium lineare Iha & Freshwater (como *Gelidium coarctatum* Kützinger) foi considerada uma espécie endêmica do Brasil, comum na costa tropical (Ugadim 1985, 1988). Porém, análises de DNA aliadas às características morfológicas do holótipo de *G. coarctatum* realizadas por Iha *et al.* (2016) mostraram que a espécie é sinônimo heterotípico de *Gelidium capense* (Gmelin) P.C. Silva da África do Sul, e que o epíteto *G. coarctatum* foi aplicado erroneamente à espécie de águas tropicais, posteriormente proposta como espécie nova denominada *G. lineare*. Atualmente ela é reconhecida por estar distribuída no Atlântico ocidental tropical, com registros para o Brasil e Panamá, tendo o Espírito Santo como localidade tipo (Iha *et al.* 2016). No Brasil, *G. lineare* (como *G. coarctatum*) foi descrita ocorrendo amplamente no nordeste brasileiro até o sul do estado do Espírito Santo (Ugadim 1987, Nunes 2005, Jamas 2015).

As características morfológicas dos espécimes analisados foram idênticas às descrições do material tipo.

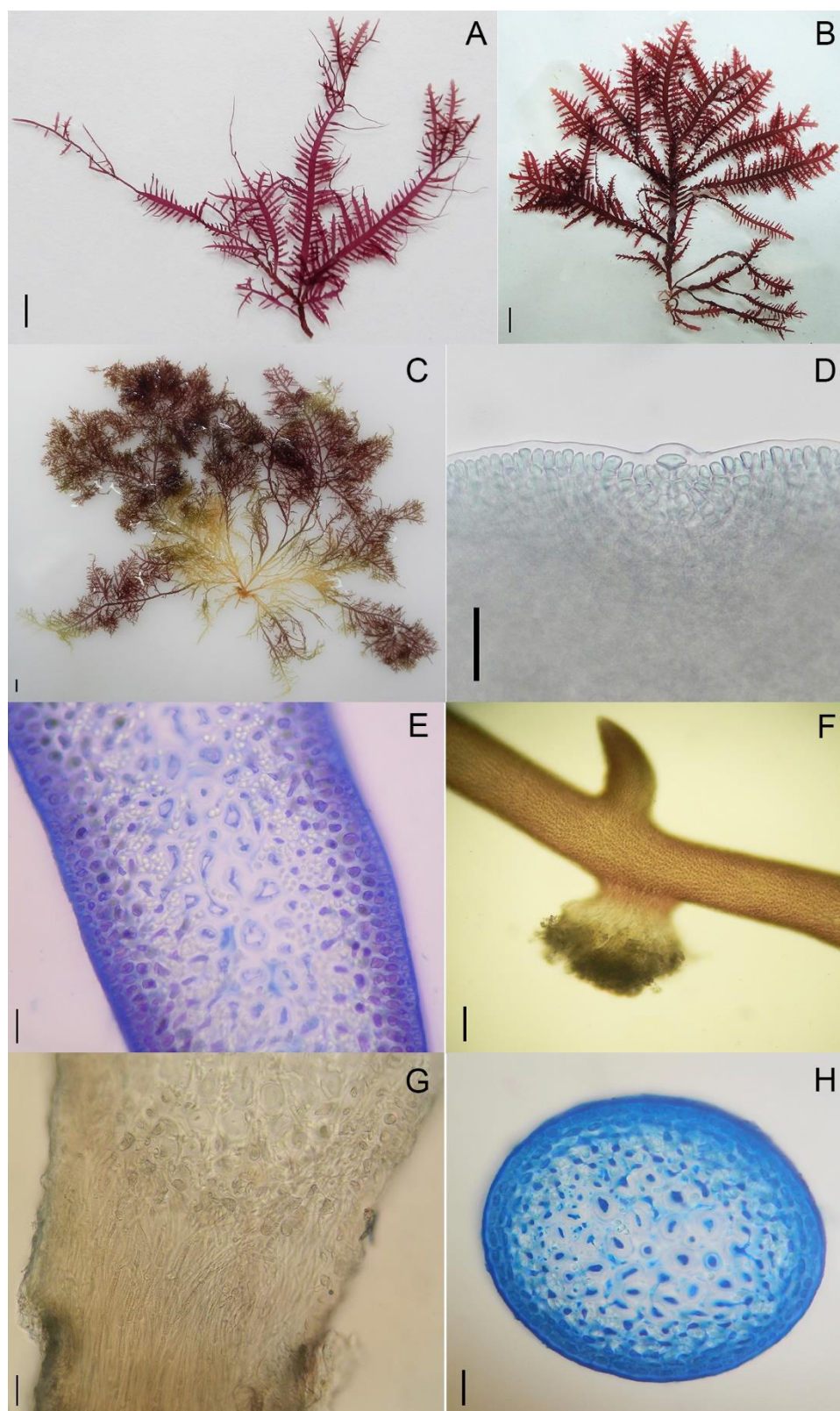


Figura 5: *Gelidium lineare*. (A, B, C) Hábito geral de PE, AL e ES (0,5cm). (D) Célula apical (25µm). (E) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (F) Apressório (100µm). (G) Corte longitudinal do apressório (25µm). (H) Corte transversal do estolão (25µm).

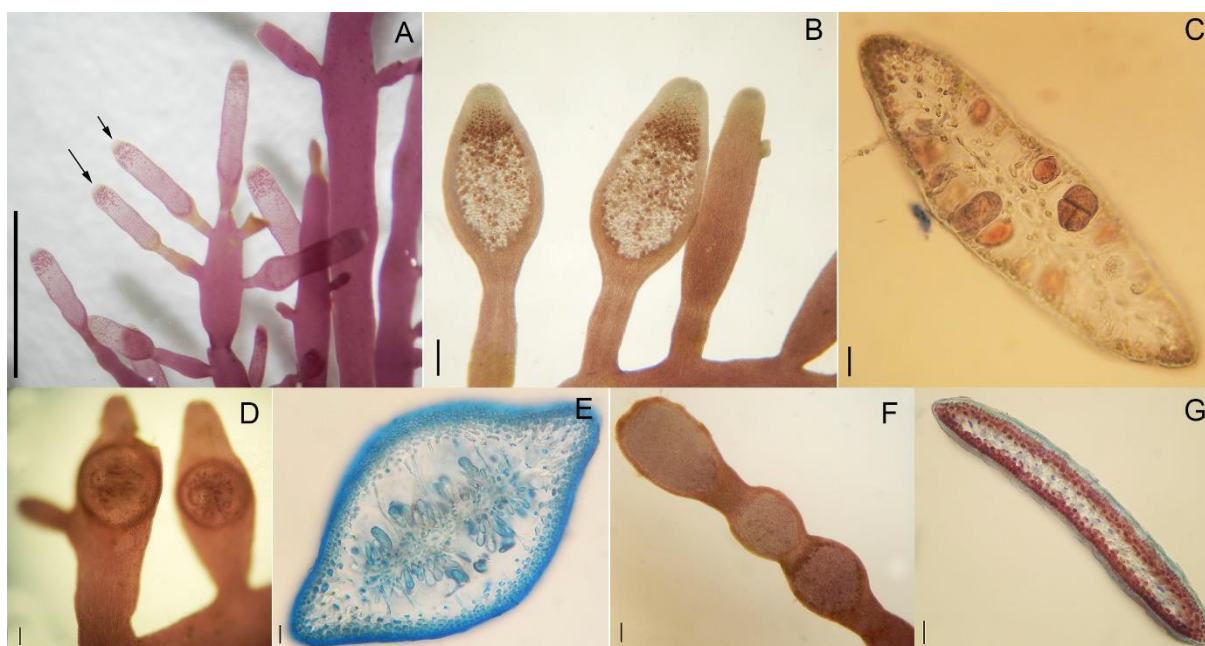


Figura 6: *Gelidium lineare*. (A) Planta tetraspórica (setas indicando os tetrasporângios) (0,2cm). (B) Detalhe do sore de tetrasporângios (250µm). (C) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25µm). (D) Detalhe do ramo com cistocarpo (100µm). (E) Corte transversal do cistocarpo (25µm). (F) Detalhe do ramo com soros de espermatângios (100µm). (G) Corte transversal do espermatângio (25µm).

Gelidium sp. 1

Figura 7

Planta ereta, cartilaginosa, vermelho claro, 1-5 cm de altura, isolados ou pequenos tufos, fixos ao substrato por apressórios do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos achatados com ápices obtuso com presença de célula apical levemente entre lobos. Ramificação irregular de até 2ª ordem. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 4-5 camadas de células medulares frouxas e alongadas, 7,5 µm de largura e 10 µm de comprimento e 2 camadas de células corticais arredondadas, 6 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 300µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com 4-5 camadas de células arredondadas, 12,5-16 µm de diâmetro e 2-3 camadas de células corticais, elípticas transversalmente, 2,5-5 µm de diâmetro. Rizines abundantes entre as medulas no talo e estolão. Soro de tetrasporângios alongados dispostos nas porções apicais dos últimos ramos. Em corte transversal, extremidades afilado-arredondadas, inférteis e com rizines. Tetrasporângios cruciados com 15-25 µm de largura e 38-42 µm de comprimento. Não foram encontrados espécimes femininos e masculinos.

Material examinado

Brasil: Espírito Santo: Serra, Praia de Carapebus (20°14'21"S/40°12'45"O), 23-VI-2013, tetraspóricas (SP 468890, IBT 1952), col. C.H. Kano & L.P. Machado. Bahia: Camaçari, Praia de Jauá (12°49'25"S/38°13'11"O), 03-VIII-2015, tetraspóricas (SP, IBT 2097), col. M.T. Fujii & B.B. Souza.

Comentários

As características morfológicas dos espécimes analisados foram idênticas à descrição de *Gelidium* sp. 2 feita por Jamas (2015). Mas difere da descrição de *Gelidium* sp. 2 de Iha (2014), pela presença de ramos filiformes, ápice agudo com célula proeminente, poucas rizines no estolão e talo com células medulares organizadas. A comparação das estruturas reprodutivas não pôde ser realizada, pois em ambos os trabalhos não foi encontrado exemplares férteis.

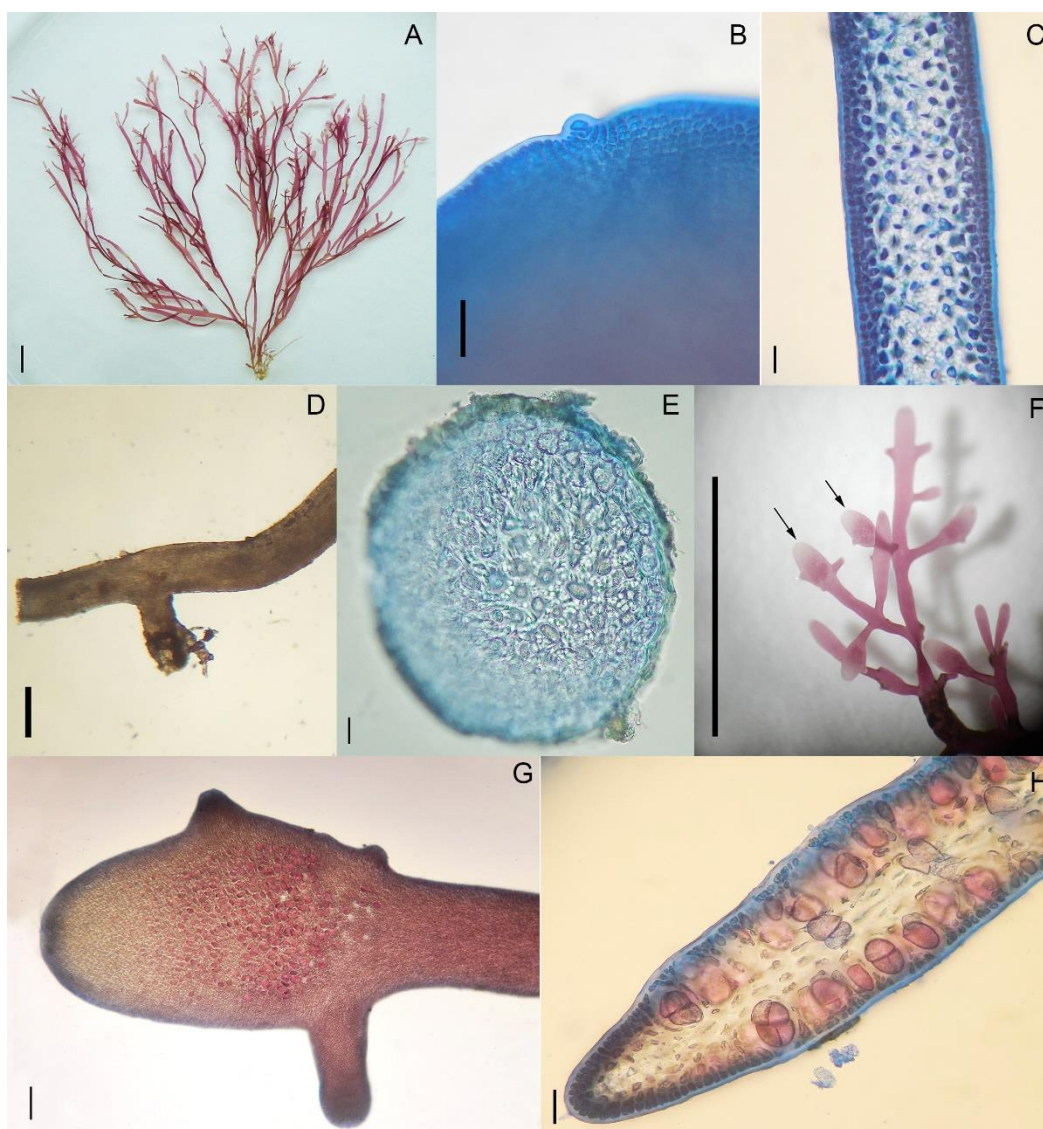


Figura 7: *Gelidium* sp. 1. (A) Hábito geral (0,5cm). (B) Célula apical (25µm). (C) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (D) Apressório (100µm). (E) Corte transversal do estolão (25µm). (F). Planta tetraspórica (setas indicam os soros de tetrasporângios) (0,5cm). (G) Soro de tetrasporângio (100µm). (H) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25µm).

Gelidium* sp. 2*Figuras 8**

Planta ereta, vermelho claro, 3 cm de altura, talos em pequenos tufo ou isolados, fixos ao substrato por apressório do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos achatados com ápices obtusos com uma única célula apical proeminente e levemente entre dois lobos. Ramificação alterna ou irregular, com ramos de até 2ª ordem. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 3 camadas de células medulares arredondadas com organização central, 7-13 µm de diâmetro e 3-4 camadas de células corticais arredondadas, 5 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 250 µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com 4-5 camadas de células medulares arredondadas, 7,5-10 µm de diâmetro e 2-3 camadas de células corticais arredondadas, 2,5-5 µm de diâmetro. Rizines distribuídas de forma abundante em toda região medular do talo e mais concentrada no córtex interno do estolão. Soros de tetrasporângios alongados dispostos nos ápices dos últimos ramos. Em corte transversal, extremidades arredondadas, inférteis e com rizines. Tetrasporângios tetraédricos, com 25µm de largura e 39µm de comprimento. Cistocarpos sub ou terminais esféricos dispostos no ápice dos ramos secundários. Biloculares com pericarpo de 3-5 camadas de células e ostíolo nos dois lados. Não foram encontrados espécimes masculinos.

Material examinado

Brasil: Espírito Santo: Serra, Praia de Capuba (20°6'29"S/40°10'19"O), 21-VI-2013, femininas (SP 469177, IBT 1578), col. C.H. Kano & L.P. Machado; Anchieta, Praia dos Castelhanos (20°48'50"S/40°37'55"O), 22-VI-2013, femininas (SP 428772, IBT 1609), col. C.H. Kano & L.P. Machado; 9-IX-2014, femininas (SP 469012, IBT 1824), col. M.T. Fujii.

Comentários

As características morfológicas dos espécimes analisados foram idênticas às descrições de *Gelidium* sp. 10 apresentadas em Iha (2014). Apesar das espécies-irmãs, *G. floridanum*-*Gelidium* sp. 2, serem bem próximas molecularmente, elas apresentam sutis diferenças morfológicas vegetativas, que podem ajudar na sua distinção, como mostrado na tabela 7.

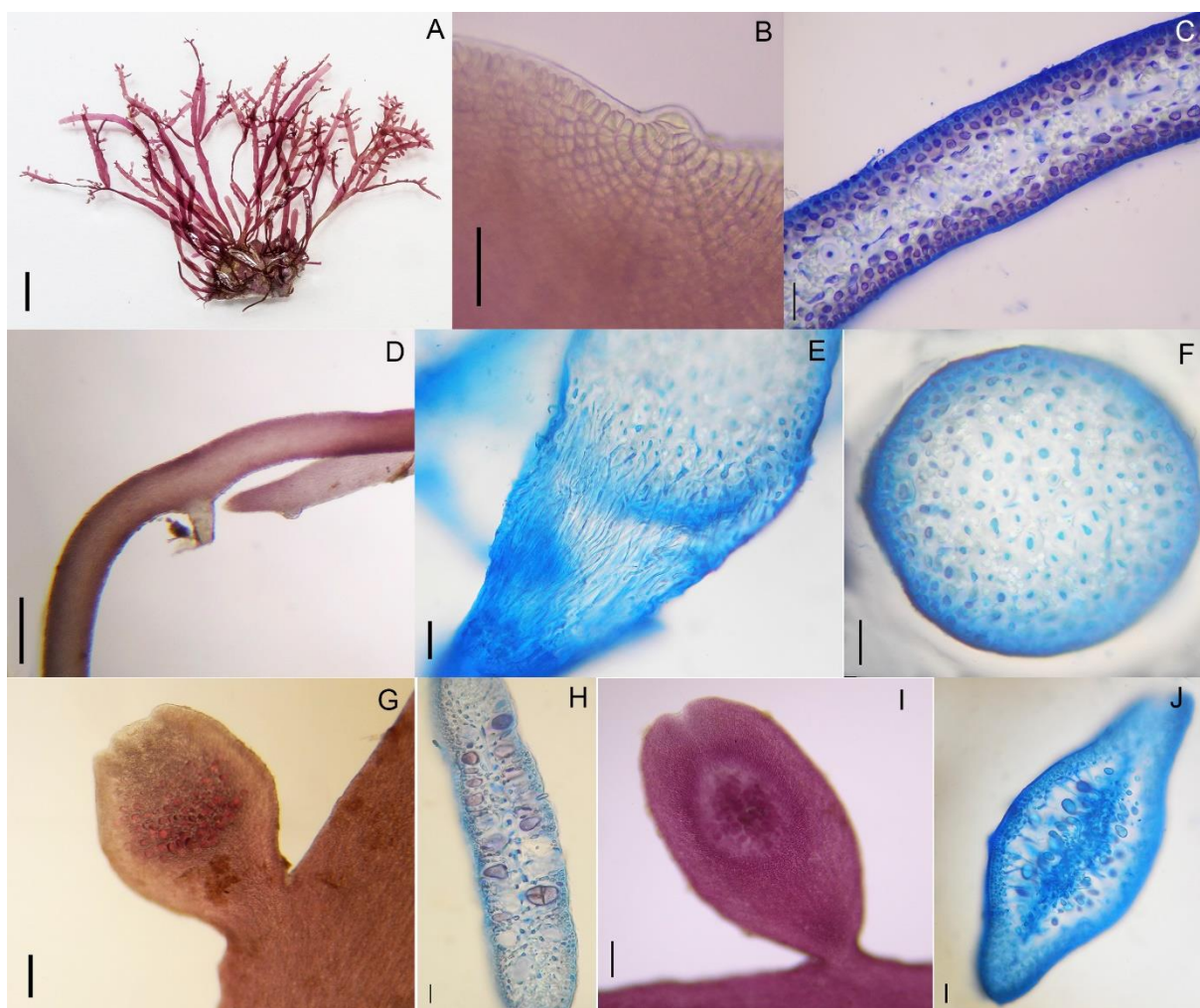


Figura 8: *Gelidium* sp. 2. (A) Hábito geral (0,5cm). (B) Célula apical (25µm). (C) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (D) Apressório (250µm). (E) Corte longitudinal do apressório (25µm). (F) Corte transversal do estolão (25µm). (G) Soro de tetrasporângio (100µm). (H) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25µm). (I) Cistocarpo (100µm). (J) Corte transversal do cistocarpo (25µm).

Tabela 7: Diferenças morfológicas vegetativas entre *G. floridanum* e *Gelidium* sp. 2.

Caraterísticas/Espécies	<i>G. floridanum</i>	<i>Gelidium</i> sp. 2
Corte transversal do talo		
Medula	5-8 camadas de células alongadas	3 camadas de células arredondadas
Córtex	2-4	3-4
Organização central	não	sim
Corte transversal do estolão		
Medula	6 camadas	4-5 camadas
Distribuição de rizines	Quantidade razoável distribuídos entre as regiões medulares	Raros na medula interna e bem concentrados na porção externa

Gelidium* sp. 3*Figura 9**

Planta ereta, consistente, vermelho vináceo, 1cm de altura, crescimento de forma rastejante sobre o substrato, fixos por apressórios do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos achatados com ápices agudos com célula apical saliente. Ramificação irregular de até 2ª ordem. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 3-4 camadas de células medulares, arredondadas com organização central, 7,5 µm de diâmetro e 2 camadas de células corticais, arredondadas, 2,5-3 µm de diâmetro. Estolão pouco comprimido, 214 µm de altura e 315 µm de comprimento. Em corte transversal do estolão, região medular com 3 camadas de células medulares, arredondadas com organização central, 16,5 µm de diâmetro e 3-5 camadas de células corticais, arredondadas, 3-5 µm de diâmetro. Rizines abundantes na região medular de todo talo e ausentes no estolão. Não foram encontrados espécimes tetrasporófitos, femininos e masculinos.

Material examinado

Brasil: Espírito Santo: Anchieta, Praia de Parati (20°48'21"S/40°36'01"O), 08-IX-2014, inférteis (SP 469562, IBT 1825), col. M.T. Fujii.

Comentários

A falta de estruturas reprodutivas não permitiram um estudo morfológico mais detalhado.

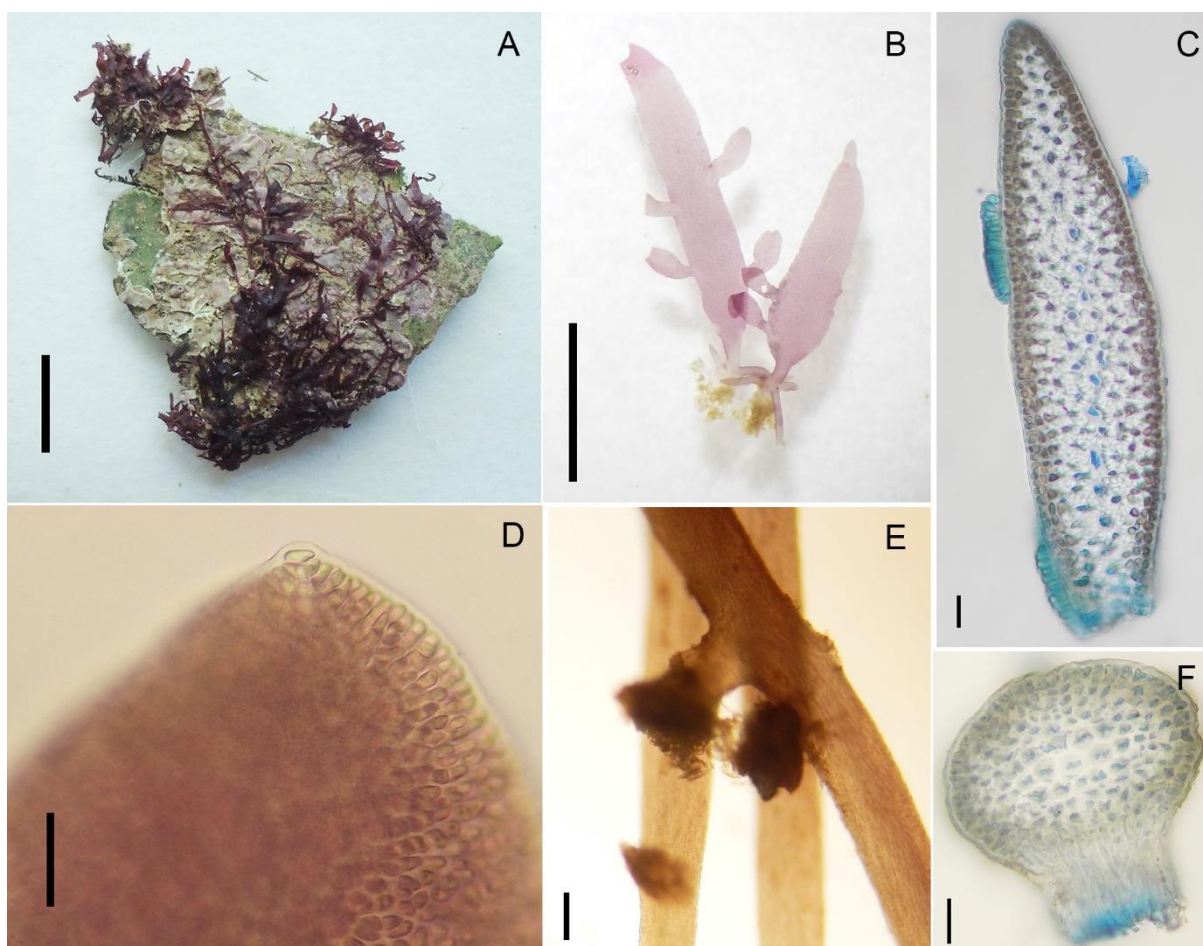


Figura 9: *Gelidium* sp. 3. (A) Planta sobre outra alga (0,5cm). (B) Hábito geral (0,2cm). (C) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (D) Célula apical (25µm). (E) Apressório (100µm). (F) Corte transversal do estolão e longitudinal do apressório (25µm).

Gelidium sp. 4

Figura 10

Planta ereta, vermelha escura, 1-2 cm de altura, talos isolados, fixos ao substrato por apressórios do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Eixos eretos achatados com ápices agudos com uma única célula apical proeminente. Ramificação irregular, com ramos de até 2ª ordem. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 3 camadas de células medulares, arredondadas, 13-20 µm de diâmetro e 2-3 camadas de células corticais, alongadas, 5 µm de largura e 7,5 µm de comprimento. Estolão compresso, 300 µm de altura e 400 µm de comprimento. Em corte transversal do estolão, região medular com 7-9 camadas de células alongadas, com organização central, 9 µm de largura e 14 µm de comprimento e 2 camadas de células corticais, arredondadas, 7,5 µm de diâmetro. Rizines distribuídas na região medular de todo talo e raros ou ausentes no estolão. Soros de tetrasporângios ovóides dispostos nos ápices dos últimos ramos. Em corte transversal, extremidades arredondadas, inférteis e presença de

poucas rizines. Tetrasporângios cruciados, esféricos, com 16 μm de diâmetro. Espécimes femininos e masculinos não foram encontrados.

Material examinado

Cuba: Cienfuegos, La Milpa, Bahia de Cienfuegos (22°04'N/80°27'O), II-2015, tetraspóricas (SP 468893, IBT 1942 e IBT 1944), col. A. Moreira.

Comentários

Foram encontrados apenas dois espécimes desse táxon. As características morfológicas encontradas são idênticas a descrição de *Gelidium* sp. 1 feita por Jamas (2015).

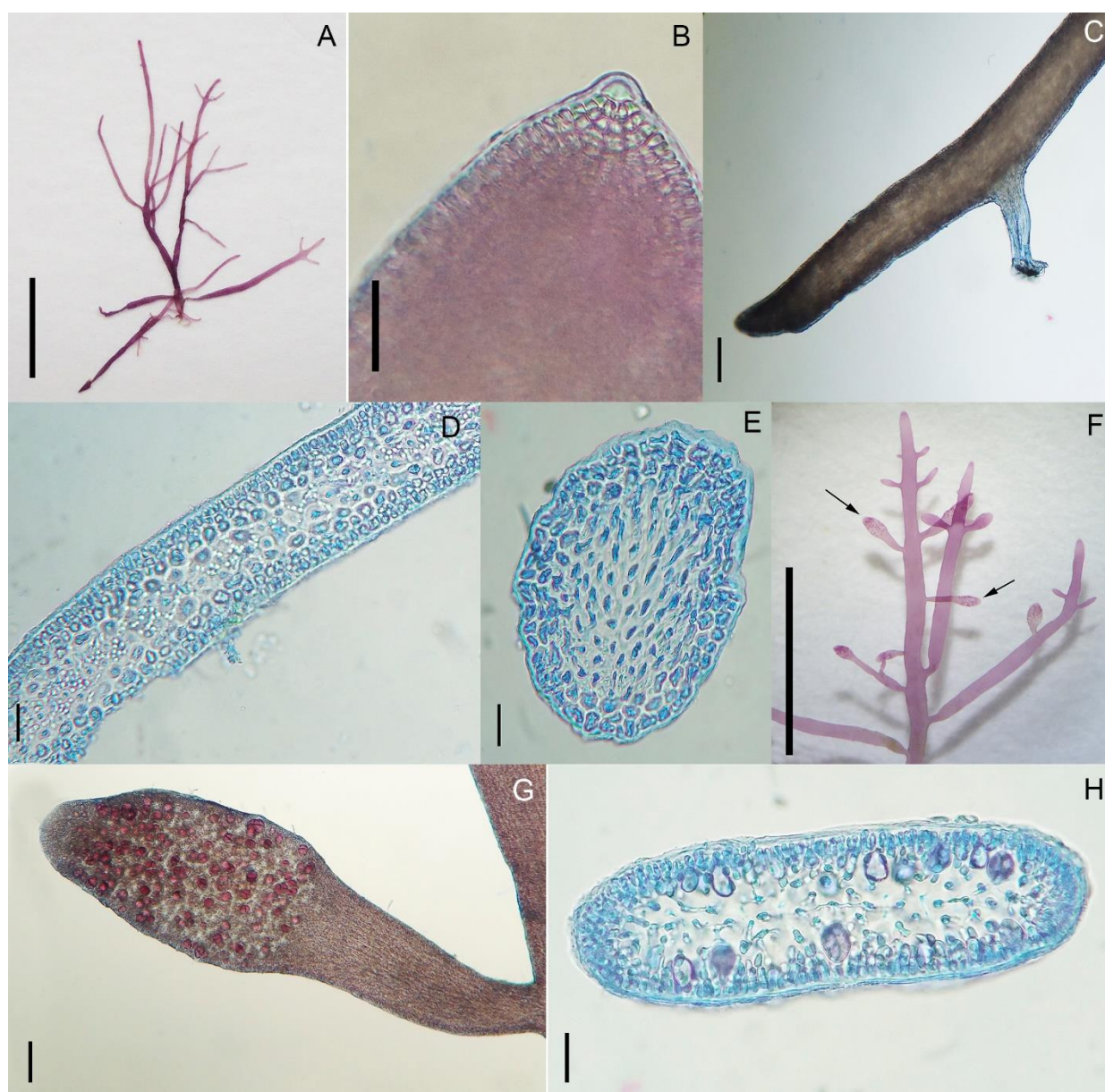


Figura 10: *Gelidium* sp. 4. (A) Hábito geral (0,5cm). (B) Célula apical (25 μm). (C) Apressório (100 μm). (D) Corte transversal da região mediana do talo (25 μm). (E) Corte transversal do estolão (25 μm). (F) Planta tetraspórica (setas indicam os soros de tetrasporângios) (0,5cm). (G) Soro de tetrasporângio (100 μm). (H) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25 μm).

Gelidium* sp. 5*Figura 11**

Planta ereta, vermelho escuro, 2,5-4,5 cm de altura, talos isolados ou em densos tufo, fixos ao substrato por apressório do tipo *brush-like*. Eixos eretos e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Talo comprimido na base e com porções apicais achatadas, com ápices agudos com uma única célula apical saliente ao talo. Ramificação alterna ou irregular, com ramos de até 2ª ordem. Corte transversal da região basal do talo principal formado por 3-4 camadas de células medulares, arredondadas com organização central, 10-12,5 µm de diâmetro e 3-4 camadas de células corticais, circulares, 5-7,5 µm de diâmetro. Corte transversal da região achatada do eixo principal formada por 2-3 camadas de células medulares, arredondadas, 10-14 µm de diâmetro e 3 camadas de células corticais, circulares, 5 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 280 µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com 3-4 camadas de células arredondadas, 10 µm de diâmetro e 3-4 camadas de células corticais, arredondadas, 10 µm de diâmetro. No talo basal, rizinas concentradas no córtex interno, na porção mais apical e estolão estão abundantes em toda medula. Soros de tetrasporângios ovoides dispostos nas porções apicais dos últimos ramos, podendo ser único ou múltiplo no mesmo ramo. Em corte transversal, extremidades arredondadas, férteis e com poucas rizinas. Tetrasporângios tetraédrico, 25µm de largura e 39µm de comprimento. Não foram encontrados espécimes femininos e masculinos.

Material examinado

Brasil: Bahia, Ilha de Boipeba, Praia da Barra (13°34'37"S/38°55'0"O), 1-VIII-2015, tetraspóricas (SP 469568, IBT 2079), cols. M.T. Fujii & B.B. Souza.

Comentários

Gelidium sp. 5 possuem características morfológicas semelhantes ao *Gelidium* sp. 1 proposto por Iha (2014). A espécie *Gelidium* sp. 4, no estudo molecular formou um grupo irmão com *Gelidium* sp. 5, porém elas apresentam fortes diferenças morfológicas, como apresentado na tabela 8. Neste caso, o estudo morfológico serviu como um sólido suporte para ajudar e confirmar a separação das espécies-irmãs pela análise molecular.

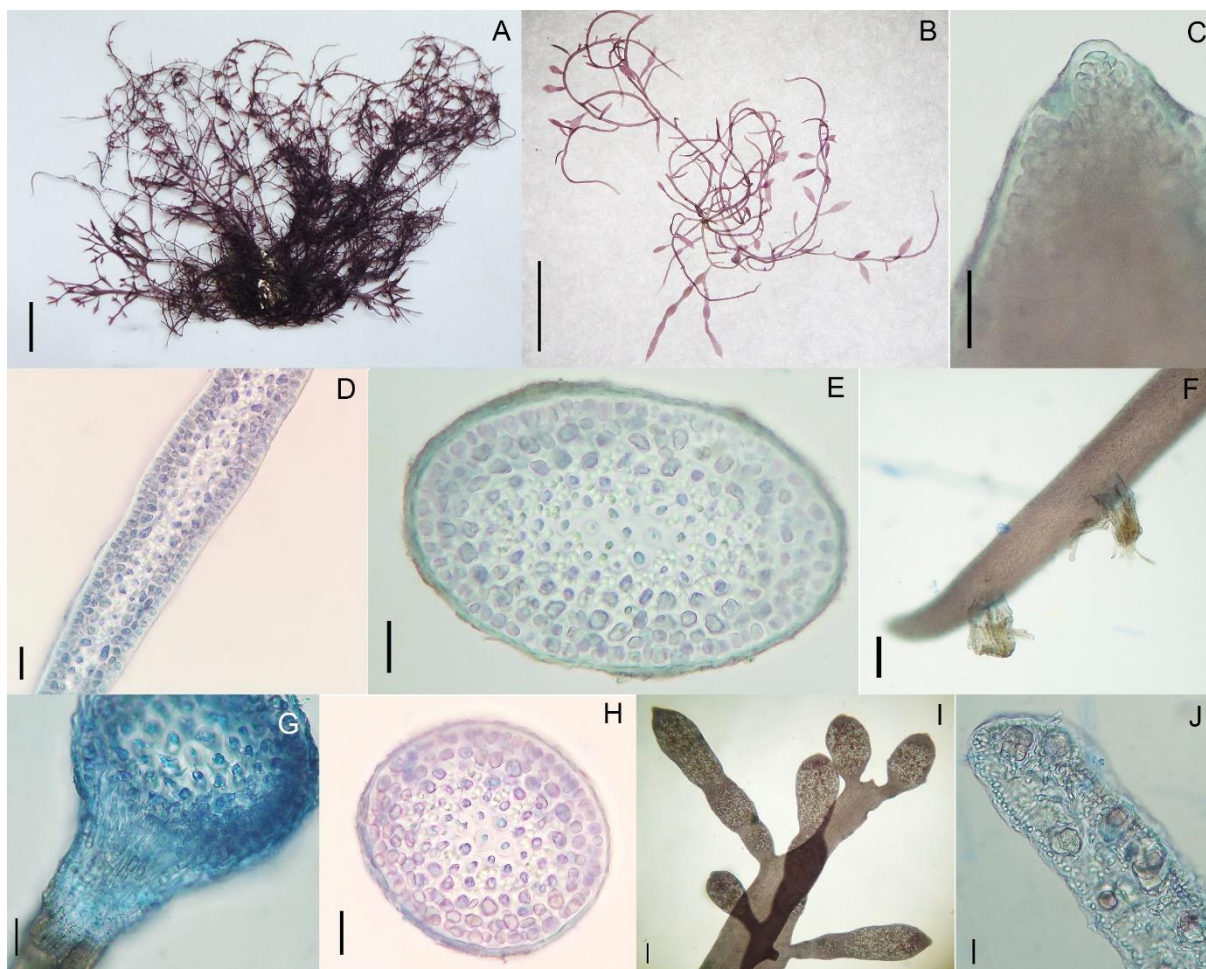


Figura 11: *Gelidium* sp. 5. (A) Hábito geral (0,5cm). (B) Detalhe do talo (0,5cm). (C) Célula apical (25µm). (D) Corte transversal da região apical do talo (25µm). (E) Corte transversal da região basal do talo (25µm). (F) Apressório (100µm). (G) Corte longitudinal do apressório (25µm). (H) Corte transversal do estolão (25µm). (I) Soro de tetrasporângio (250µm). (J) Corte transversal do tetrasporângio (25µm).

Tabela 8: Diferenças morfológicas entre *Gelidium* sp. 4 e *Gelidium* sp. 5.

Caraterísticas/Espécies		<i>Gelidium</i> sp. 4	<i>Gelidium</i> sp. 5
Tamanho		1-2cm de altura	2,5-4,5cm de altura
Forma do talo		todo compresso	base cilíndrica e ápice compresso
Corte transversal	Medula	3 camadas arredondadas e desorganizadas	basal: 3-4 camadas arredondadas organizadas; apical: 2-3 camadas arredondadas desorganizadas
	Córtex	2-3 camadas elípticas	basal: 3-4 camadas arredondadas; apical: 3 camadas arredondadas
	Rizines	presente na medula	Basal e apical presente na medula
	Estolão	compresso	cilíndrico
Corte transversal	Medula	7-9 camadas alongadas e organizadas	3-4 camadas arredondadas
	Córtex	2 camadas arredondadas	3-4 camadas arredondadas
	Rizines	raros ou ausentes	presentes na medula
Tetrasporângio		margem infértil	margem fértil

Pterocladella beachiae Freshwater, Phycologia 40: 340-350, 2001

Holótipo: Herbário da Universidade de Michigan, EUA (MICH).

Localidade tipo: Cahuita, Limon, Costa Rica.

Figura 12

Planta ereta, vermelho vinácea a esverdeada, 1,4-5,5 cm de altura, formando pequenos tufos ou talos isolados, fixos ao substrato por apressório do tipo *peg-like*. Eixos eretos achatados e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Ápice obtuso com uma única célula apical proeminente levemente entre lobos ou não. Ramificação pinada, alterna ou irregular e ramos de até 2ª ordem. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 3-4 camadas de células medulares alongadas, 38 µm de comprimento e 14 µm de largura e 2-3 camadas de células corticais arredondadas, 7,5 µm de diâmetro. Estolões compressos, 360 µm de altura e 400 µm de comprimento. Em corte transversal do talo, região medular com 7 camadas de células arredondadas, 10-14 µm de diâmetro e 2 camadas de células corticais arredondadas, 5-7,5 µm de diâmetro. Rizines espalhadas entre a região medular em todo talo e ausentes ou raros na medula do estolão. Soro de tetrasporângios desenvolvidos nas porções distais dos últimos ramos. Em corte transversal, extremidades arredondada-afiladas, inférteis e com presença de rizines. Tetrásporos tetraédricos ou cruciados, com 25µm de largura e 26µm de comprimento. Espécimes femininos e masculinos não foram encontrados.

Material examinado

Brasil: Pernambuco: Recife, Praia da Boa Viagem (08°14'34"S/34°55'68"O) 18-III-2015, tetraspóricas (SP 469180, IBT 1893), col. M.T. Fujii. Bahia: Mata de São João, Praia do Forte (12°57'0"S/38°00'00"O), 7-V-2015, tetraspóricas (SP 468852, IBT 1951), col. N. Yokoya; Ilha de Tinharé, Praia Ponta Ponã (13°27'14"S/38°53'17"O), 30-VII-2015, tetraspóricas (SP 468913, IBT 2055), col. M.T. Fujii & B.B. Souza; Ilha de Boipeba, Praia da Barra (13°34'37"S/ 38°55'0"O), 1-VIII-2015, tetraspóricas (SP 468920, IBT 2083), col. M.T. Fujii & B.B. Souza. Cuba: Ciudad de La Habana: Playa (23°06'N/ 82°28'O), II-2015, tetraspóricas (SP 468896, IBT 1945 e IBT1946), col. P. González.

Comentários

Pteroclatiella beachiae é uma espécie ainda pouco estudada, tendo como localidade tipo a Costa Rica (Thomas & Freshwater 2001) e citação de ocorrência somente para o Panamá (Freshwater *et al.* 2010), Brasil (Iha *et al.* 2015) e Malásia (Sohrabipour *et al.* 2013). A descoberta dessa espécie levou à formação de um complexo de espécies crípticas com *Pteroclatiella caerulencens* (Kützing) Santelices & Hommersand e *Pteroclatiella australafricanensis* (Freshwater *et al.* 2010), formando um grupo-irmão com *P. capillacea*. A ocorrência de *P. beachiae* e *P. australafricanensis* para o Brasil levantou a hipótese de que a citação de *P. caerulencens* para essa região pode ter sido confundida com as outras espécies do complexo (Iha *et al.* 2015).

As características morfológicas dos espécimes analisados foram idênticas às descrições do material tipo e de Iha (2014). Porém as amostras apresentaram as extremidades do tetrasporângios inférteis, enquanto que as da Malásia possuem extremidades férteis (Sohrabipour *et al.* 2013). Os estudos moleculares e morfológicos deste trabalho revelaram e confirmaram a primeira ocorrência dessa espécie para a região de Cuba.

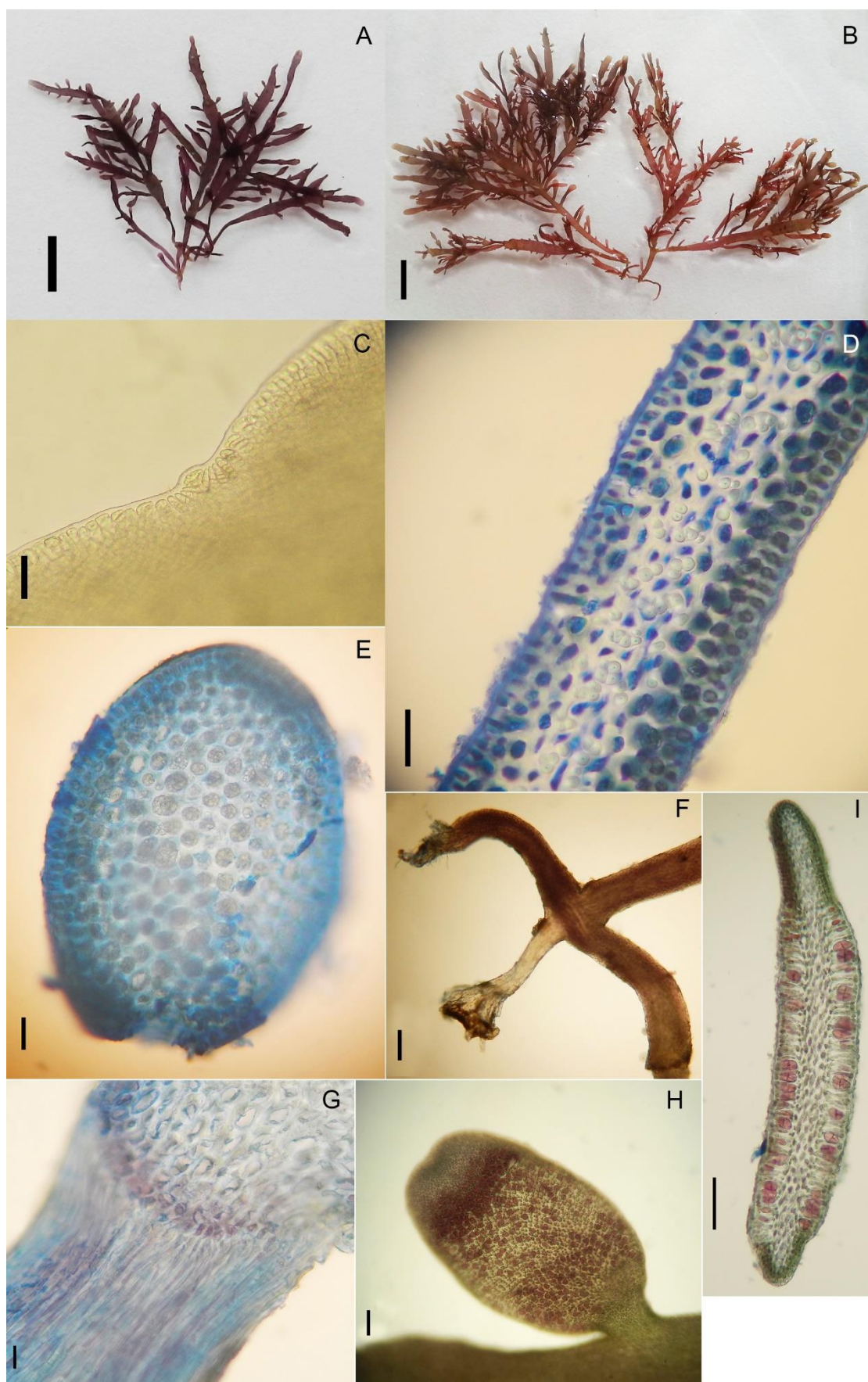


Figura 12: *Pterocladia beachiae*. (A e B) Hábito geral de Cuba e Brasil, respectivamente (0,5cm). (C) Célula apical (25µm). (D) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (E) Corte transversal do estolão (25µm). (F) Apressório (100µm). (G) Corte transversal do apressório (25µm). (H) Soro de tetrasporângio (100µm). (I) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25µm).

Pterocladiaella capillacea (Gmelin) Santelices & Hommersand, Phycologia 36: 114-119, 1997

Basinômio: *Fucus capillaceus* S.G. Gmelin, Hist. Fuc. p. 147, 1768

Lectótipo: Ilustração original, na ausência do material tipo. (Gmelin, 1768, pl. 15, fig.1)

Localidade tipo: Mar Mediterrâneo (Gmelin, 1768:146)

Figuras 13 e 14

Planta ereta, vermelha vináceo escuro, 3,5 a 13 cm de altura, formando tufo densos ou talos isolados, fixos ao substrato por apressório do tipo *peg-like*. Eixos eretos achatados e rizoides originam-se das porções estoloníferas. Ápice obtuso com uma única célula apical proeminente levemente entre lobos. Ramificação pinada, alterna ou irregular, com ramos de até 3ª ordem. Ramos secundários seguem o mesmo padrão do eixo principal. Em corte transversal da região mediana do talo, eixo principal formado por 7-12 camadas de células medulares alongadas, 24 µm de comprimento e 14 µm de largura e 2-3 camadas de células corticais arredondadas, 5 µm de diâmetro. Estolão cilíndrico, 400 µm de diâmetro. Em corte transversal do estolão, região medular com 7-12 camadas de células arredondadas, 12-17 µm de diâmetro e 2 camadas de células corticais elípticas radialmente, 5 µm de comprimento e 2 µm de largura. Rizines espalhadas entre a região medular em todo talo e ausentes ou raras na medula do estolão. Soros de tetrasporângios dispostos nas porções apicais dos últimos ramos. Em corte transversal, extremidades arredondadas, inférteis e com rizines. Tetrasporângios tetraédricos, com 35 µm de comprimento e 25 µm de largura. Soros de espermatângios alongados desenvolvidos nos ápices dos ramos. Espermácios formados por divisão transversalmente entre as células corticais e rizines abundantes na medula. Espécimes femininos não foram encontrados.

Material examinado

Brasil: Espírito Santo: Serra, Manguinhos (20°11'20"S/40°11'24"W), 26-III-2013, femininas (SP 428767, IBT 1575), col. C. H. Kano & L. P. Machado. Rio de Janeiro: Arraial do Cabo, Prainha (22°57'22"S/42°01'36"O), 14-V-2014, tetraspóricas (SP 428771, IBT 1767), col. M.T. Fujii; Arraial do Cabo, Prainha (22°57'46"S/42°01'32"O), 6-III-2015, tetraspóricas (SP 469178, IBT 1939), col. V. Cassano; Arraial do Cabo, Praia Grande, Ponta da Cabeça (22°58'35"S/42°02'05"O), 11-XI-2015, masculino (SP 469571, IBT 2176), col. B.B. Souza; Cabo Frio, Ilha do Vigia (22°52'30"S/41°57'13"O), 7-III-2015, tetraspóricas (SP 469179, IBT 1940), col. V. Cassano; Búzios, Praia Rasa (22°44'01"S/41°57'27"O), 13-XI-2015, tetraspóricas (SP 469561, IBT 2177), col. M.T. Fujii. São Paulo: Ubatuba, Ilha Vitória

(23°25'39"S/45°3'48"O), 19-V-2008, tetraspóricas (SP 469563, IBT 172), col. M.T. Fujii; Ilha do Cardoso, Praia Cambriu (25°09'22"S/47°54'58"O), 30-VI-2010, masculina (SP 469564, IBT 441), col. M.T. Fujii. Portugal: Açores: Ilha de São Miguel, infértil (SP 469574). Itália: Genova: 1990, infértil, col. V. Cassano.

Comentários

As características morfológicas dos espécimes analisados foram idênticas às descrições apresentadas por Boo *et al.* (2010) e Iha (2014).

Das amostras obtidas neste trabalho de *P. capillacea*, apesar de não ter sido encontrada diversidade intraespecífica significativa, foi possível notar a alta plasticidade fenotípica que essa espécie apresenta de acordo com as diferentes regiões em que foram coletadas, como é possível perceber na figura 13. A alta variação morfológica em uma espécie cosmopolita também foi encontrada em *Gelidium crinale* (Kim & Boo 2012). Essa característica, corrobora com Boo *et al.* (2010) que sugerem que *P. capillacea* pode apresentar significativa variação morfológica no padrão do talo decorrentes das diferentes influências oceanográficas.

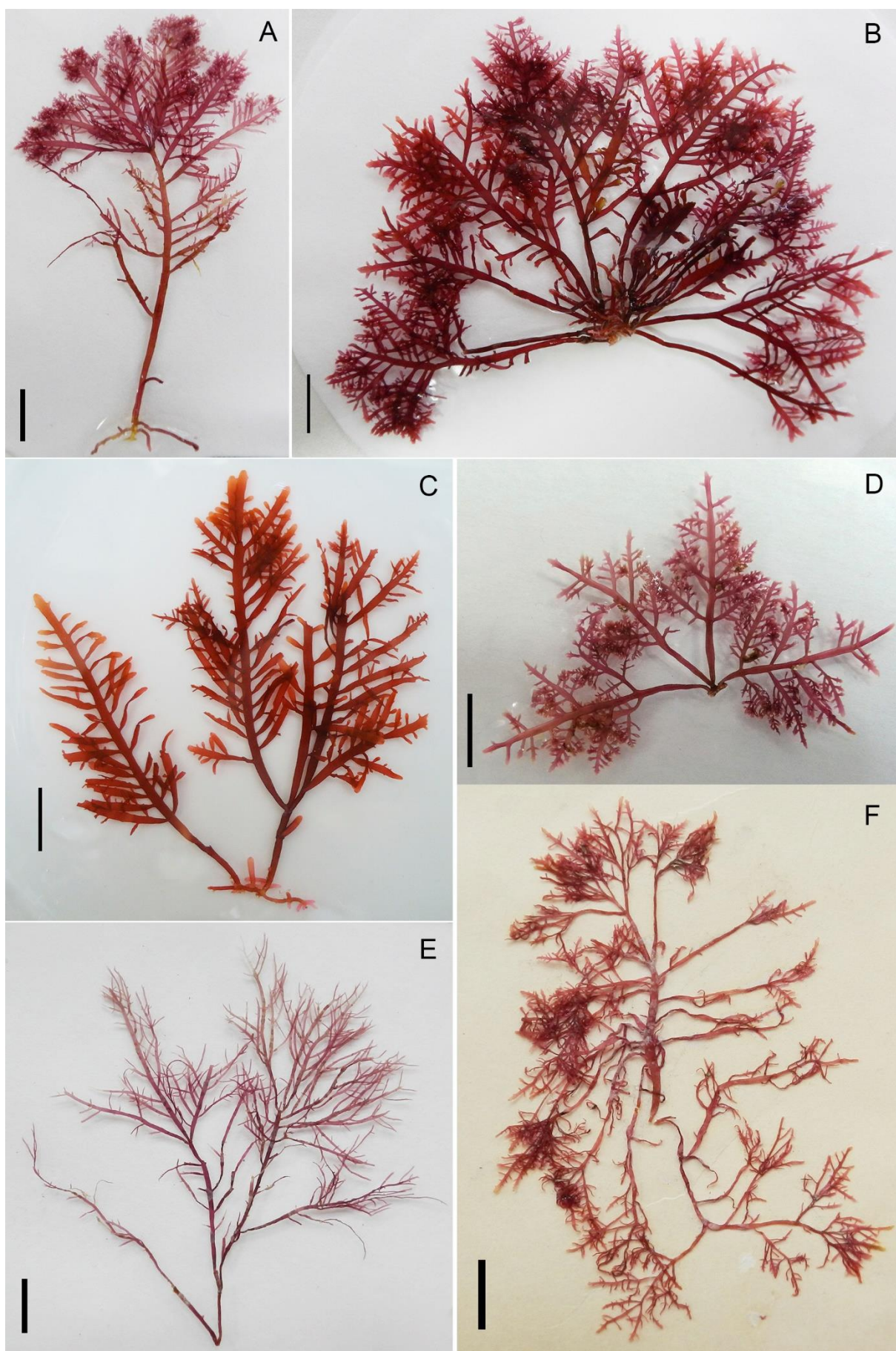


Figura 13: *Pterocladia capillacea*. (A - F) Hábito geral, respectivamente, de SP, RJ, RJ, SC, Açores e Itália (1cm).

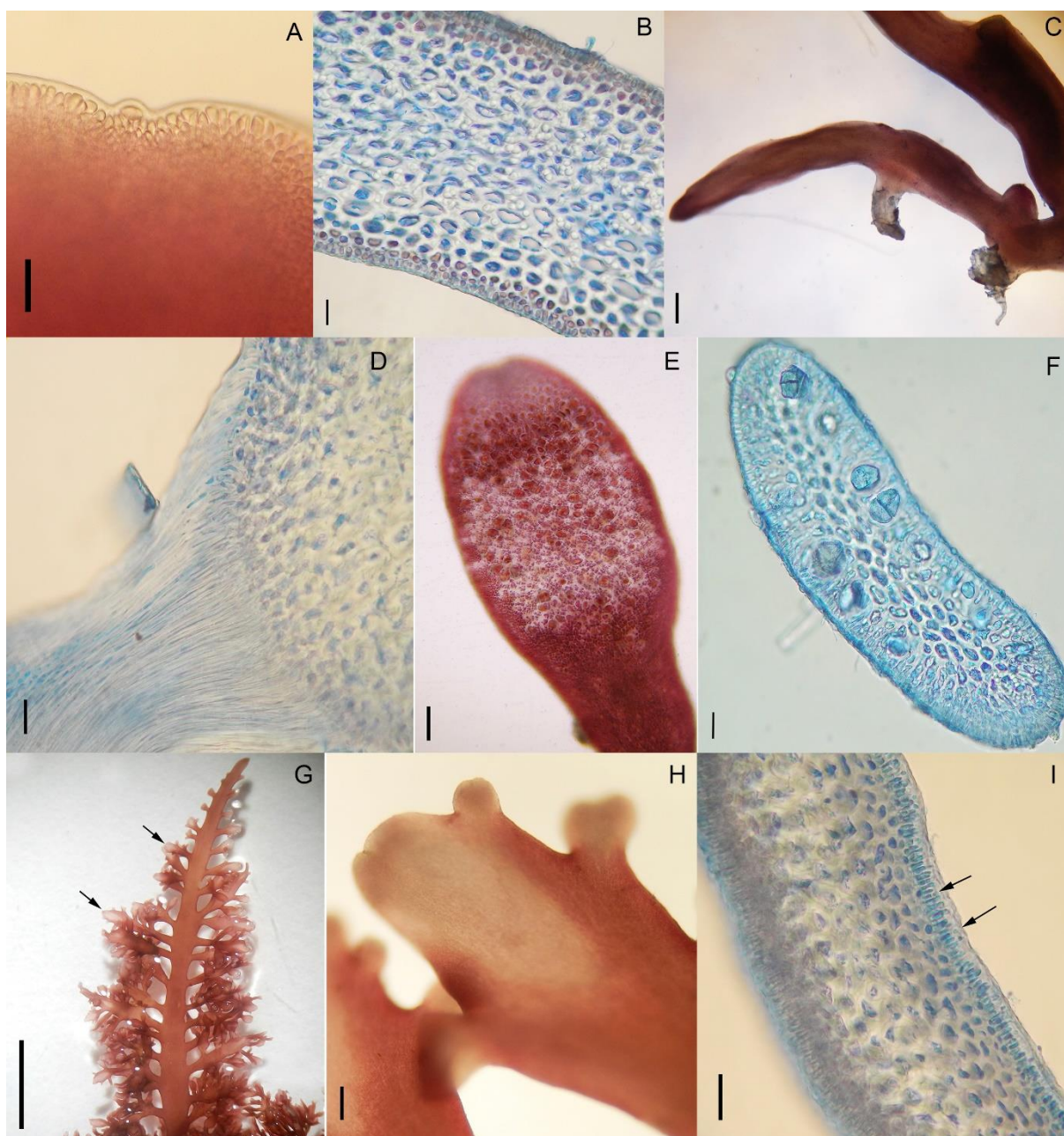


Figura 14: *Pterocladia capillacea*. (A) Célula apical (25µm). (B) Corte transversal da região mediana do talo (25µm). (C) Apressório (250µm). (D) Corte transversal do apressório (25µm). (E) Soro de tetrasporângio (100µm). (F) Corte transversal do soro de tetrasporângio (25µm). (G) Planta com espermatângios (setas) (0,5cm). (H) Detalhe do ramo com soros de espermatângios (100µm). (I) Corte transversal do espermatângio (setas indicando os espermcios) (25µm).

5.3 Estudo da diversidade de haplótipos e distribuição geográfica

O conjunto de dados para análise populacional de cada espécie foi separado por marcador e se encontra na tabela 9.

Tabela 9: Quantidade e tamanho das sequências analisadas por marcador de cada espécie.

Marcador	<i>rbcL</i> -3P		COI-5P		<i>cox2</i> -3		<i>cox1</i>		<i>rbcL</i>	
Espécie	N	pb	N	pb	N	pb	N	pb	N	pb
<i>G. floridanum</i>	31	448 do gene + 89 do espaçador	30	561	17	261	10	1411	8	1302
<i>G. lineare</i>	68	448 do gene + 88 do espaçador	55	561	41	261- 263	30	1411	22	1302
<i>P. beachiae</i>	51	448 do gene + 88 do espaçador	56	536	26	261	4	1295	14	1351
<i>P. capillacea</i>	100	448 do gene + 88 do espaçador	88	494	27	261	30	1295	61	1350

(N) número de sequências; (pb) número de pares de bases.

Gelidium floridanum: para o marcador *rbcL*-3P, com 9 sítios polimórficos, essa espécie apresentou divergência intraespecífica de 0,2-1,1%, resultando em quatro haplótipos (Hrf) (Figura 15A). Na análise com o *rbcL*-3P não foi inserida a sequência referente à espécie da Costa Rica. O COI-5P, com apenas um sítio polimórfico, resultou em dois haplótipos (Hcf) (Figura 15B) divergentes em 0,2%. Por fim, o marcador *cox2*-3, com um sítio polimórfico, apresentou dois haplótipos (Hof) (Figura 15C) divergentes em 0,4%. Devido à baixa quantidade de sequências obtidas com o *cox1* e *rbcL* para diferentes localidades, esses marcadores não foram utilizados para as análises.

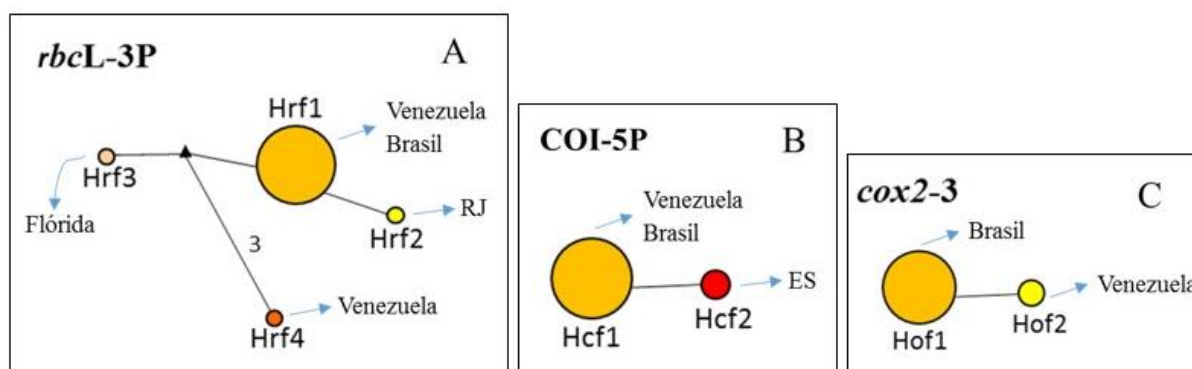


Figura 15: Redes de haplótipos de *Gelidium floridanum* para o marcador *rbcL*-3P (A), COI-5P (B) e *cox2*-3 (C). Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional a quantidade de sequências; divergências maiores que 1bp estão representados por números na linha preta.

Ao analisar o *rbcL*-3P foi possível notar que a Venezuela e o Brasil compartilham um haplótipo em comum (Hrf1) e essas duas regiões apresentaram mais um haplótipo cada. Entretanto, a variação genética foi menor no Brasil (0,2%) do que na Venezuela (0,9%). Assim é possível sugerir que a separação dos haplótipos é mais recente no Brasil. Porém a

baixa quantidade de sequências obtidas dessa espécie nessas regiões, sendo Venezuela com 2 amostras e Brasil com 22, não permite conclusões claras a respeito do seu padrão filogeográfico.

Dentre os indivíduos coletados para este trabalho, os três marcadores tiveram um haplótipo comum (Hrf1, Hcf1 e Hof1) englobando praticamente todas as amostras e mais um haplótipo divergente (Hrf2, Hcf2 e Hof2). Entretanto, os haplótipos divergentes não tiveram congruência em relação a localidade de ocorrência, pois para o *rbcL*-3P, COI-5P e *cox2-3* eles foram, respectivamente, no Rio de Janeiro, no Espírito Santo e na Venezuela. A partir disso, segundo Avise 2000, é possível sugerir que provavelmente as possíveis barreiras biogeográficas presentes no sudeste e sul brasileiro não são persistentes para impedir o fluxo gênico dessa espécie ou que se trata de uma recente introdução no país devido a baixa divergência encontrada.

No banco de dados, para *G. floridanum* existem poucas sequências referentes a outras regiões além do Brasil, compreendendo somente a Flórida e Venezuela para o marcador *rbcL*. E não há sequências para outros marcadores, o que impede de realizar análises mais amplas para entender como essa espécie está distribuída e qual foi sua direção de dispersão. Levando em consideração as regiões ficogeográficas propostas por Horta *et al.* (2001), *G. floridanum* ocorreu na zona de transição e na região subtropical.

***Gelidium lineare*:** a rede de haplótipo com o marcador *rbcL*-3P mostrou sete grupos (Hr1 a Hr7) (Figuras 16A e 16B), com sete sítios polimórficos. Para o COI-5P houve formação de 15 grupos (Hc1 a Hc15) (Figuras 16A e 16C), com 18 sítios polimórficos. Enquanto que o espaçador *cox2-3* resultou em oito grupos (Hco1 a Hco8) (Figuras 16A e 16D), com 14 sítios polimórficos. Por fim, o *cox1* apresentou 15 grupos (Hx1 a Hx15) (Figura 16A e 16E), com 47 sítios polimórficos. Os valores de diversidade haplotípica (H) e nucleotídica (π), Tajima's D e Fu's F_s dentro desse grupo para todos os marcadores estão inseridos na tabela 10.

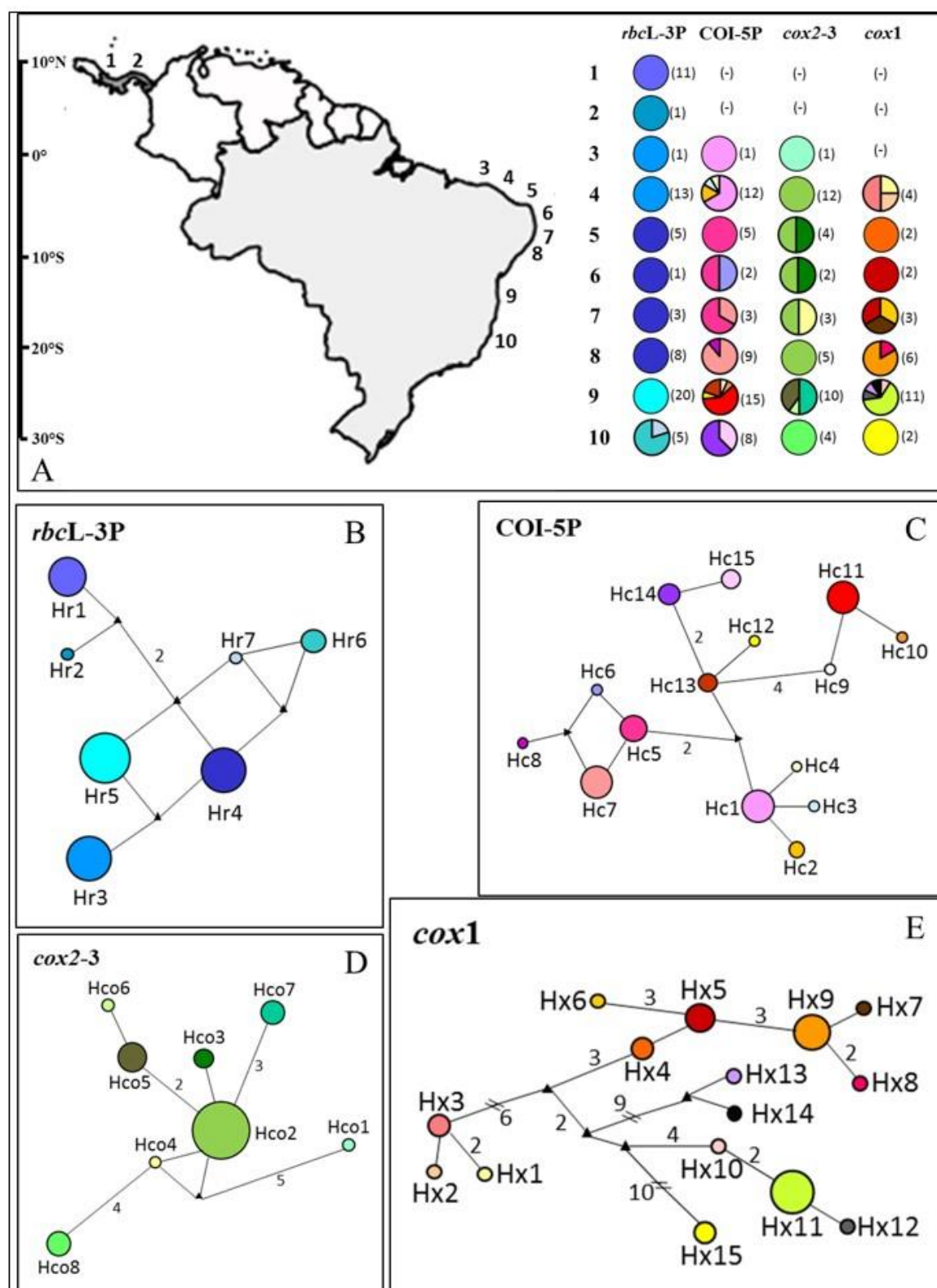


Figura 16: Relações filogeográficas e distribuição de *G. lineare*. Distribuição geográfica dos haplótipos por região (A). Redes de haplótipos para o marcador *rbcL*-3P (B), *COI*-5P (C), *cox2*-3 (D) e *cox1* (E). Nas redes, cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional a quantidade de seqüências; divergências maiores que 1bp estão representados por números na linha preta. No mapa, os números entre parênteses se referem a quantidade de indivíduos sequenciados. Números no mapa são referentes aos locais de amostragem, sendo Panamá (1 e 2) e Brasil (PI - 3, CE - 4, RN - 5, PB - 6, PE - 7, AL - 8, BA - 9 e ES - 10). (\\) na linha indicam divergência maior que 4 pares de bases.

Tabela 10: Valores de diversidade haplotípica (H) e nucleotídica (π), Tajima's D e Fu's F_s para *G. lineare*.

Testes/ Marcadores	H	π	Tajima's D		Fu's F_s	
			D	p	F_s	p
<i>rbcL-3P</i>	0,7902 +/- 0,0194	0,0047 +/- 0,0029	1,0946	0,8730	0,9363	0,7070
<i>COI-5P</i>	0,8970 +/- 0,0172	0,0077 +/- 0,0043	0,1475	0,6210	-1,6447	0,3090
<i>cox2-3</i>	0,6646 +/- 0,0752	0,0082 +/- 0,0052	-1,2670	0,0760	-0,0364	0,5300
<i>cox1</i>	0,9149 +/- 0,0321	0,0081 +/- 0,0042	-0,0941	0,5280	0,4139	0,6130

Para todos os marcadores, os cálculos de diversidade foram realizados considerando todos os haplótipos encontrados como uma única população. Em todos os marcadores, a diversidade nucleotídica (π) encontrada foi alta (>0,5%) assim como a diversidade haplotípica (H) (>0,5). Alta H e alta π , segundo Grand & Bowen (1998), possivelmente reflete uma espécie que manteve o tamanho de suas populações grandes e estáveis, devido a uma longa história evolutiva ou realização de contato secundário entre as linhagens. Esse efeito também foi verificado em *Gelidium elegans* (Kim *et al.* 2012).

Para o COI-5P e o *cox1*, os valores de H foram os maiores e estão dentro dos valores encontrados para espécies de Gelidiales, como em *G. crinale* (Kim & Boo 2012), *G. elegans* (Kim *et al.* 2012) e *Capreolia implexa* Guiry & Womersley (Boo *et al.* 2014b). *G. lineare* teve diversidade haplotípica para o *cox1* maior do que a encontrada em *G. crinale* distribuída ao redor do mundo (Kim & Boo 2012).

Os valores de Tajima's D e Fu's F_s , para todos os marcadores, não foram significativos, assim como relatado para populações das espécies de *Bostrychia intricata* (Bory) Montagne (Muangmai *et al.* 2015), *Pyropia acanthophora* (E.C. Oliveira & Coll) M.C. Oliveira, D. Milstein & E.C. Oliveira (Dumilag & Aguinaldo 2017) e *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell (Hu *et al.* 2016). Valores não significativos (entre -1 e 1) para esses dois testes não são capazes de determinar se uma espécie apresenta ou não uma recente expansão populacional.

Com análise de todos os marcadores moleculares, *Gelidium lineare* mostrou ser uma espécie que apresenta uma estrutura genética correlacionada com o contexto geográfico. Os marcadores COI-5P e *cox1* foram os que tiveram maior quantidade de haplótipos encontrados. O *cox2-3*, apesar de ter uma sequência curta (261pb) apresentou uma quantidade de sítios polimórficos (14 sítios) similar ao COI-5P (19), que é uma sequência maior (561pb). Além disso, o *cox2-3* foi o único marcador que teve um haplótipo em comum do Ceará até Alagoas.

O ponto mais ao norte onde *G. lineare* foi identificada é o Panamá, e as sequências disponíveis no GB para essa região estão presentes somente para o marcador *rbcL*. Mesmo assim, foi possível verificar que Panamá apresentou dois haplótipos distintos dos encontrados

no Brasil, sugerindo que não há fluxo gênico. Provavelmente a distância geográfica entre o Panamá e o Brasil possa estar atuando como uma barreira impedindo a troca gênica entre os indivíduos dessas regiões. Visto que, segundo Iha *et al.* (2016), *G. lineare* não se trata de uma introdução recente no Panamá, mas sim de uma espécie que pode ter sido confundida morfológicamente com *G. corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux ou *G. latifolium* Bornet ex Hauck. Portanto, a distribuição dessa espécie pode estar sendo subjetiva.

No Ceará, as praias de Taíba, Pacheco e Dois Coqueiros, para o COI-5P e *cox1*, possuem um haplótipo em comum (Hc1 e Hx3), além de cada praia apresentar mais de um único haplótipo (Hc2-Hc3-Hc4 e Hx1-Hx2, respectivamente). Portanto, haplótipos divergentes ocupando a mesma área geográfica [(simpátricas), segundo Avise (2000)], ocorre quando populações isoladas no passado fazem contato novamente.

Algum fator ambiental ou físico provavelmente esteja atuando como uma barreira entre o Ceará e Rio Grande do Norte, pois, com exceção do *cox2-3*, os demais marcadores não tiveram haplótipos em comum entre Piauí-Ceará e do Rio Grande do Norte-demaís regiões sentido sul.

Do Rio Grande do Norte até Alagoas foi a área em que houve o maior compartilhamento de haplótipos, com exceção para o *cox1*. Nessa região, a amostragem não foi tão ampla para cada estado quando comparada com os demais locais estudados. Um maior esforço de coleta nessa área é importante para compreender e conhecer melhor quais são os limites desses haplótipos compartilhados e dos presentes somente em determinado estado.

Aproximadamente na latitude 10°S (entre Alagoas e Sergipe), a Corrente Sul Equatorial se bifurca formando a Corrente do Norte do Brasil (sentido leste-oeste) e a Corrente do Brasil (sentido nordeste-sul) (Silveira *et al.* 2000). O Rio São Francisco desagua entre o limite dos estados de Alagoas com o Sergipe. No estado do Sergipe, as praias são compostas por rochas, pedregulhos e areia fina, além de apresentar uma costa litorânea recortada por estuários e manguezais, resultando em pouca diversidade de macroalgas (Miloslavich *et al.* 2016). O conjunto desses três fatores provavelmente esteja agindo fortemente como barreiras biogeográficas para a espécie *Gelidium lineare*, visto que para os marcadores analisados nenhum haplótipo encontrado que ocorreu até Alagoas está presente na Bahia e Espírito Santo e vice-versa. Mostrando que possivelmente essas populações não realizam fluxo gênico, porém maior amostragem nas áreas de Alagoas, Sergipe e no norte da Bahia se faz necessário para se confirmar essa hipótese.

O estado da Bahia corresponde à porção mais extensa do litoral brasileiro e, segundo Nunes (2005) apresenta acidentes geográficos, riqueza e diversidade de substratos, que resultam na grande diversificação da flora marinha. Essa região foi bem amostrada, porém

com *gaps* para o litoral norte e sul. Apesar disso, foi a que mostrou maior número de haplótipos distintos para *G. lineare*. E assim como no Ceará, haplótipos simpátricos foram encontrados nas praias de Ponta Ponã e Moreré, ambas no município de Cairu.

O ponto de coleta mais sul da Bahia foi em Moreré e o ponto mais ao norte do Espírito Santo foi Enseada das Garças, com distância entre os dois pontos de 768 km. Esse intervalo de área é recortado pela foz do Rio Jequitinhonha (Bahia) e do Rio Doce (Espírito Santo) e faltam substratos disponíveis para o crescimento das algas, comprovadas durante a visita realizada à costa dourada, próxima à foz do Rio Doce. Portanto, provavelmente esses dois rios estão atuando como barreiras físicas para as populações de *Gelidium*, visto que elas apresentaram haplótipos distintos e únicos para todos os marcadores entre esses estados. Entretanto, é válido ressaltar que há necessidade de analisar mais amostras dessas áreas para se conhecer com exatidão quais são os limites dos haplótipos presentes entre a Bahia e o Espírito Santo.

Espírito Santo possui a região litorânea central caracterizada por formações graníticas e a costa sul por substrato rochoso com falésias de arenito (Miloslavich *et al.* 2016). As amostras provenientes da Enseada das Garças e da praia de Carapebús, ambas pertencentes ao litoral central, apresentaram diversidade intraespecífica com a sequência das amostras da Praia dos Castelhanos (localidade tipo) localizada no litoral sul do Estado, para os marcadores analisados *rbcL*-3P e *COI*-5P (já que para o *cox2*-3 e *cox1* não se tem sequência da localidade tipo). Este resultado pode estar relacionada à diferença de substratos das praias do litoral central em relação ao tipo encontrado no litoral sul.

Gelidium lineare teve distribuição no Panamá e no Brasil, desde o Piauí até o sul do Espírito Santo. O estado do Rio de Janeiro, próximo à região de Cabo Frio, sofre forte influência do fenômeno de ressurgência, baixando muito a temperatura da água e aumentando os nutrientes disponíveis na superfície (Brasileiro *et al.* 2009). Segundo Oliveira Filho (1977) e Yoneshigue-Valentin & Valentin (1992), esse fenômeno atua como uma forte barreira biogeográfica para os organismos marinhos, limitando os limites de distribuição de alguns táxons. Dessa forma, esse fator provavelmente esteja impedindo essa espécie de se expandir para além do Espírito Santo. Para concluir, levando em consideração as divisões ficogeográficas propostas por Horta *et al.* (2001), *Gelidium lineare* só ocorreu na região tropical e na zona de transição, o que caracteriza essa espécie de ter mais afinidades para águas mais quentes.

***Pterocladia beachiae*:** para o marcador *rbcL*-3P, com 30 sítios polimórficos, essa espécie apresentou divergência intraespecífica de 0,3-0,5%, resultando em três haplótipos (Hrb)

(Figura 17A). O COI-5P, com 20 sítios polimórficos, resultou em oito haplótipos (Hcb) (Figura 17B) divergentes em 0,2-2,9%. É possível agrupar os haplótipos encontrados em COI-5P em dois grandes grupos, um formado com indivíduos da América ocidental e outro da Malásia, que diferenciam entre 2,3-2,9%. A divergência inter-haplótipos da América ocidental foi de 0,2-0,4% e da Malásia de 0,2-0,9%. Por fim, o marcador *cox2-3*, com quatro sítios polimórficos, apresentou quatro haplótipos (Hob) (Figura 17C) com uma diversidade intraespecífica de 0,4-0,8%. Devido à baixa quantidade de sequências obtidas com o *cox1* e *rbcL*, esses marcadores não foram utilizados para a análise.

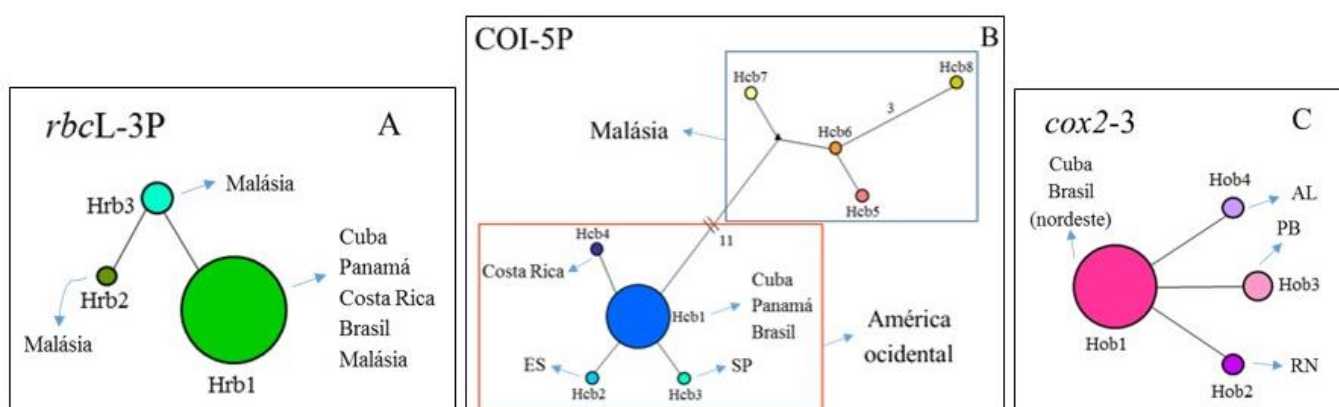


Figura 17: Rede de haplótipos de *Pterocliadia beachiae* para o marcador *rbcL*-3P (A), COI-5P (B) e *cox2-3* (C). Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional a quantidade de sequências; divergências maiores que 1bp estão representados por números na linha preta. (\\) na linha indica divergência maior que 3 pares de bases.

Para o *rbcL*-3P, a diversidade intraespecífica de *P. beachiae* foi capaz de separar o haplótipo mais comum (Hrb1), distribuído em todas localidades analisadas, de outros dois que também ocorrem na Malásia. Entretanto, o COI-5P mostrou ser mais útil e específico para a separação dos haplótipos de acordo com o contexto geográfico, visto que foi possível determinar para essa espécie dois grupos bem distintos separados por uma alta diversidade intraespecífica (2,3-2,9%), sendo um ocorrendo na América (Atlântico ocidental) e outro somente na Malásia (Indo-Pacífica). Segundo o trabalho de Sohrabipour *et al.* (2013), a análise morfológica do material da Malásia se mostrou muito similar ao material tipo, além disso apesar da divergência significativa com o *cox1*, o *rbcL* mostrou serem conspecífica. E para o *cox1* já foi relatado divergência intraespecífica de até 2,74% para *Gelidium crinale* (Kim & Boo 2012).

O Atlântico ocidental e a Malásia são geograficamente muito distantes. Esse fator pode estar atuando como uma barreira biogeográfica persistente impedindo o fluxo gênico entre esses grupos. Dessa maneira, segundo Avise (2000), a formação de barreiras persistentes causam alta diversidade genética como consequência de populações separadas por um longo período de tempo. E segundo alguns trabalhos (McIvor *et al.* 2001, Yow *et al.* 2011), a

origem de uma espécie provavelmente é no local onde existe o mais alto nível de variação genética. Com isso, é possível sugerir que *P. beachiae* tem como a Malásia seu ponto de origem e dispersão, e que o Atlântico ocidental foi colonizado por indivíduos provindos da Malásia anterior ao Istmo do Panamá, como também sugerido para *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan de Saint-Léon por Andreakis *et al.* 2007. Porém isso só poderá ser confirmado com uma ampla abordagem de amostras e localidades examinadas.

Em relação as amostras do nordeste brasileiro, o *cox2-3* apresentou uma diversidade maior, com quatro haplótipos, do que o COI-5P, que foi idêntico para todas amostras dessa região. Contudo, de modo geral, a baixa quantidade de sequências e a falta de sequências das localidades do sudeste brasileiro, Costa Rica, Panamá e Malásia para esse marcador, não permitem uma análise mais completa. Levando em consideração as regiões ficogeográficas propostas por Horta *et al.* (2001), *P. beachiae* ocorreu em todas as regiões.

***Pterocladia capillacea*:** apresentou oito haplótipos para o *rbcL*-3P (Hrc), com 26 sítios polimórficos, divergindo de 0,2-1,9% (Figura 18A). Estão distribuídos da seguinte maneira: Hrc1 ocorrendo na Venezuela, ES, RJ, SP, SC, França, Mônaco, Açores, Itália, Coreia e Japão; Hrc2 na Austrália; Hrc3 no Japão; Hrc4 na Venezuela, Espanha e Itália; Hrc5 na Nova Zelândia; Hrc6 no Havaí; Hrc7 na Califórnia e Hrc8 na Irlanda e Austrália. Foi analisado o marcador *rbcL*, pois verificou-se que ao comparar as mesmas sequências com o *rbcL*-3P, este estava suprimindo a divergência intraespecífica para essa espécie. Portanto, o *rbcL* mostrou 13 haplótipos (Hlc) (Figura 18B), com 83 sítios polimórficos, divergindo de 0,1-1,6% e distribuídos conforme a figura 18C. Para o COI-5P, com 12 sítios polimórficos, a diversidade intraespecífica encontrada foi de 0,2-1,6% entre os sete haplótipos (Hcc) encontrados (Figura 18D). Os haplótipos presentes na costa brasileira divergem entre si em 0,2%. Por fim, o marcador *cox2-3*, com três sítios polimórficos, resultou em apenas dois haplótipos (Hoc) com divergência de 1,1% (Figura 18E). Devido à baixa quantidade de sequências obtidas com o *cox1* para localidades diferentes, esse marcador não foi utilizado para a análise.

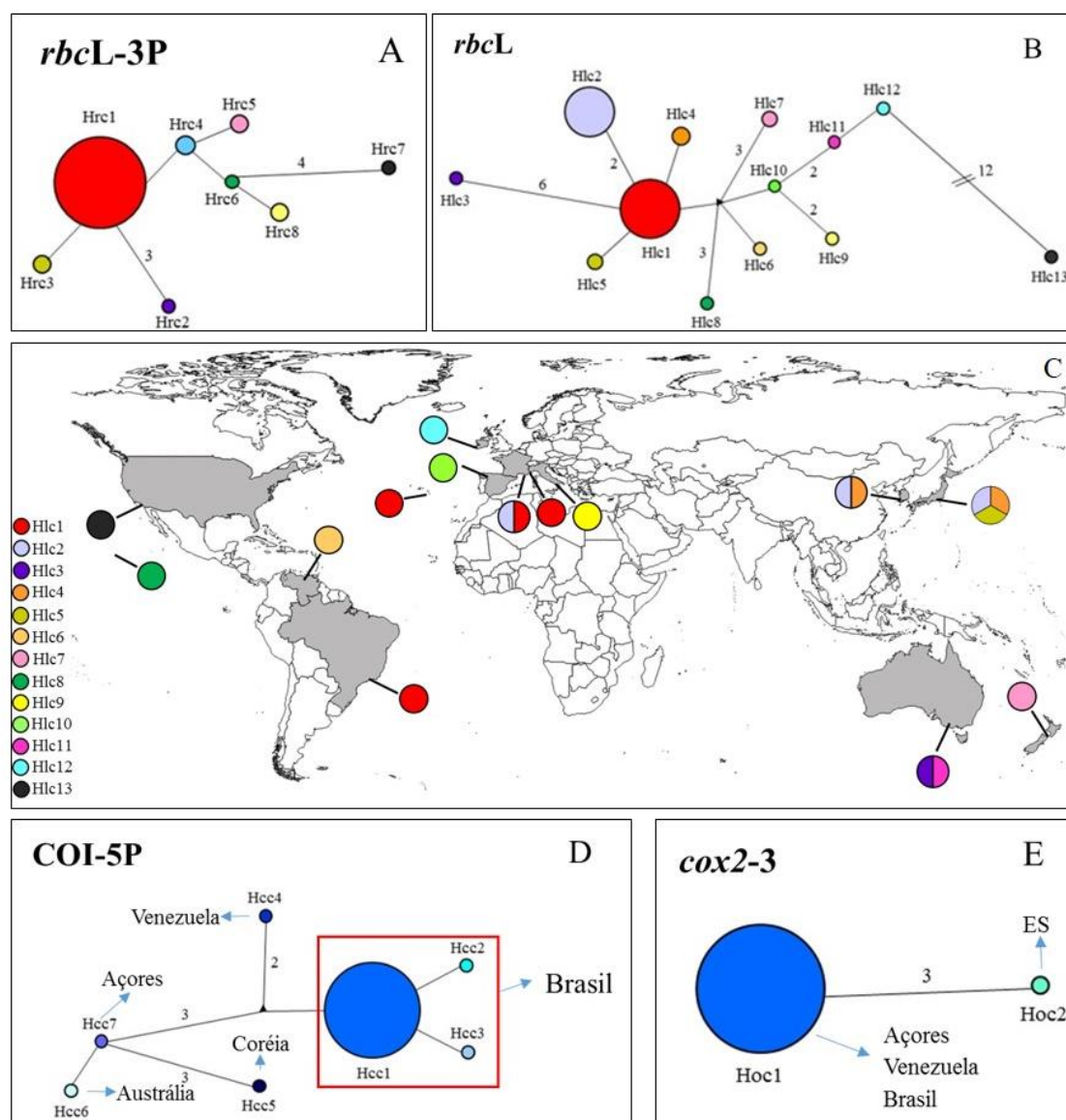


Figura 18: Rede de haplótipos de *Pterocliadiella capillacea* para o marcador *rbcL*-3P (A), *rbcL* (B), COI-5P (D) e *cox2*-3 (E). Mapa da distribuição dos haplótipos com o marcador *rbcL* (C). Nas redes, cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional a quantidade de sequências; divergências maiores que 1bp estão representados por números na linha preta. (\\) na linha indicam divergência maior que 6 pares de bases.

A hipótese testada de que *Pterocliadiella capillacea* seja uma espécie de distribuição cosmopolita foi feita molecularmente por Freshwater *et al.* (1995). Com o uso do *rbcL*, a análise de alguns lugares dos oceanos Atlântico e Pacífico mostraram uma variação genética de 0,2-1,3%. Além disso, os autores sugeriram que a ausência de estrutura genética correlacionada com o contexto geográfico induz ser uma espécie de recente dispersão em todo o mundo. Boo *et al.* (2010) encontraram 12 haplótipos com o *rbcL* ao analisarem espécimes da Coréia e França, juntamente com algumas sequências de outras localidades disponíveis no GenBank (GB). Em ambos os trabalhos, os autores afirmaram que apesar do marcador *rbcL* ser eficaz para separar as populações, ele não é suficiente para explicar a origem de dispersão e variação genética para essa espécie.

Neste trabalho foi verificado que o marcador *rbcL*-3P estava suprimindo as informações quando comparado com o *rbcL*. Das amostras coletadas para este trabalho, o *rbcL* não apresentou diversidade intraespecífica. Com todas as sequências utilizadas na análise, o Japão foi a região com maior variação genética. O Hlc2 é o único haplótipo presente no Pacífico que também ocorre no Mar Mediterrâneo. O Hlc1 é o haplótipo mais comum nesta espécie, porém com ocorrência apenas no Atlântico. As regiões mais amplamente amostradas até então são o Brasil, Coréia e Japão, totalizando 46 sequências. Para uma melhor compreensão da distribuição, limites e relação dos haplótipos encontrados e entendimento das barreiras que atuam sobre *P. capillacea* se faz necessário realizar uma análise com maior amostragem por local de ocorrência dessa espécie, como sugerido por Boo *et al.* (2010).

As amostras de *P. capillacea* do presente trabalho analisadas com o COI-5P foram mais divergentes do que para o *rbcL*. Entretanto, existem apenas duas sequências disponíveis no GB para esse marcador, referentes à da Coréia do Sul e da Austrália, o que dificulta uma análise mais ampla. Mesmo assim, essas duas sequências além das amostras obtidas da Venezuela, Brasil e Açores apresentaram estrutura genética, sendo o Brasil a única região que apresentou variação gênica. Como sugerido por Freshwater *et al.* (1995) e Boo *et al.* (2010), estudos com marcadores mais variáveis como, por exemplo, o marcador *cox1*, provavelmente serão mais eficazes para se conhecer a real diversidade genética e dispersão dessa espécie.

Para as amostras do Brasil, o *rbcL*-3P e o *rbcL* completo mostraram ser conservados, não apresentando variação genética. Enquanto que os marcadores COI-5P e *cox2-3* (mesmo este tendo analisadas poucas sequências) foram variáveis, porém apresentaram baixíssima diversidade. A partir disso, o fator de variação genética ausente ou bem baixa, com base nos padrões filogeográficos propostos por Avise (2000), significa que as prováveis barreiras biogeográficas presentes no sudeste e sul brasileiro não são persistentes e capazes de impedir o fluxo gênico entre essas populações ou os haplótipos encontrados podem ter sido separados recentemente. Dessa maneira, esse fator pode indicar que a distribuição de *P. capillacea* para o Brasil seja devido a uma recente introdução, assim como já verificado para *Gelidium johnstonii* Setchell & N.L. Garder na Coréia e Japão (Boo *et al.* 2014) e em *Asparagopsis armata* Harvey (Andreakis *et al.* 2007).

A distribuição de *Pterocliadiella capillacea* para o Brasil ocorreu somente nas regiões Sudeste e Sul, corroborando os trabalhos de Ugadim (1988), Jamas (2015) e Iha *et al.* (2015) nos quais sugeriram que essa espécie não ocorre no nordeste do país e a que ocorre abundantemente nessa região deve ser identificada com *Gelidium lineare*. Levando em consideração as divisões ficogeográficas propostas por Horta *et al.* (2001), *P. capillacea* só ocorre na zona de transição e na região subtropical.

6. Considerações Finais

- Em conclusão, as espécies inicialmente identificadas como *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea*, objeto do presente estudo, revelaram ser mais diversas, resultando em nove táxons, sete pertencentes a *Gelidium* (*G. floridanum*, *G. lineare*, *Gelidium* sp. 1, *Gelidium* sp. 2, *Gelidium* sp. 3, *Gelidium* sp. 4 e *Gelidium* sp. 5) e dois a *Pterocladia* (*P. beachiae* e *P. capillacea*), confirmando a hipótese de que no Brasil há mais de uma entidade taxonômica sendo identificada como *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea*.
- A distribuição de *Gelidium floridanum* e *Pterocladia capillacea* é disjunta, ocorrendo em ambos os hemisférios, porém estão ausentes no nordeste brasileiro. Ambas as espécies apresentaram baixa diversidade intraespecífica no Brasil indicando uma possível recente introdução.
- Durante as coletas realizadas no litoral brasileiro, foi difícil identificar *Gelidium floridanum in situ* e, na maioria das vezes, a espécie foi pré-identificada como *Pterocladia capillacea*. Isso resultou na baixa quantidade de indivíduos coletados.
- A distribuição cosmopolita de *Pterocladia capillacea* sugere que se trata de uma espécie com elevada variação genética. Porém, a falta de sequências de outras regiões em que ela já foi citada impede estudos mais amplos e o real conhecimento sobre a sua origem e dispersão. Além disso, tendo as amostras do Brasil como base, foi possível perceber que os marcadores COI-5P e *cox2-3*, mesmo com baixa divergência encontrada, mostraram ser mais variáveis que o *rbcL*. Portanto, sequências com marcadores mais sensíveis e variáveis, provavelmente resultarão em um melhor entendimento sobre a distribuição desta espécie.
- No Brasil, *Gelidium lineare* teve distribuição somente no nordeste e no Espírito Santo. Esta espécie ocorre em ambientes similares a de *G. floridanum* e *P. capillacea* no sudeste e sul e pode ser equivalente a estas espécies para o nordeste.
- *Gelidium lineare* foi a espécie que apresentou maior variação intraespecífica de acordo com os haplótipos encontrados, confirmando a hipótese deste trabalho de que as barreiras biogeográficas consideradas neste trabalho presentes no nordeste e Espírito Santo atuam sobre seus indivíduos impedindo o fluxo gênico entre algumas populações.

- *Pterocliadiella beachiae* teve distribuição em toda a costa brasileira com baixa diversidade intraespecífica. Os estudos moleculares e morfológicos identificaram pela primeira vez a ocorrência desta espécie para Cuba.
- Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os marcadores moleculares utilizados nas análises filogeográficas foram satisfatórios para as espécies estudadas. Grande parte das sequências de *G. floridanum*, *G. lineare*, *P. beachiae* e *P. capillacea* disponíveis no banco de dados é com o *rbcL*, inviabilizando as análises com os outros marcadores.
- Os marcadores *rbcL*-3P e *rbcL* foram facilmente amplificados, porém para este último se fez necessário a amplificação fragmentada em duas ou três partes. Para o COI-5P inicialmente foram testados dois conjuntos de primers, porém o que melhor amplificou e teve sequenciamento de boa qualidade para todas as espécies foi com os primers GWSFn e cox1R1. O *cox1* também foi facilmente amplificado. A baixa quantidade de sequências com *cox2-3* foi devido à enorme dificuldade encontrada em amplificar e purificar essa região para as espécies estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Andreakis, N., Procaccini, G. & Kooistra, W.H.C.F. 2004. *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. *Eur J Phycol* 39: 273-283.
- Andreakis N., Procaccini G., Maggs C. & Kooistra, W.H.C.F. 2007. Phylogeography of the invasive seaweed *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) reveals cryptic diversity. *Mol Ecol* 16: 2285–2299.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avice, J.C. & Hamrick, J.L. 1996. *Conservation Genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, New York.

- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Awabdi, D.R., Siciliano, S. & Di Benedetto, A.P.M.** 2013. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Cheloniamydas* (L. 1758), na costa leste do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Biotemas* 16: 197-200.
- Bailey, J.C. & Freshwater, D.W.** 1997. Molecular systematics of the Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid *rbcL* and nuclear SSU gene sequences. *Eur J Phycol* 32: 343-352.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A.** 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1): 37-48.
- Beheregaray L. B.** 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17: 3754-3774.
- Bermingham, E. & Moritz, C.** 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol* 7: 367 - 369.
- Boo, S.M., Kim, S.Y., Hong, I.S. & Hwang, I.K.** 2010. Reexamination of the genus *Pterocladia* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in Korea based on morphology and *rbcL* sequences. *Algae* 25(1): 1-9.
- Boo, G.H., Mansilla, A., Nelson, W., Bellgrove, A. & Boo, S.M.** 2014b. Genetic connectivity between trans-oceanic populations of *Capreolia implexa* (Gelidiales, Rhodophyta) in cool temperature Waters of Australasia and Chile. *Aquat Bot* 119: 73-79.
- Boo, G.H., Kim, K.M., Nelson, W.A., Riosmena-Rodríguez, R., Yoon, K.J. & Boo, S.M.** 2014a. Taxonomy and distribution of selected species of the agarophyte genus *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 26: 1243-1251.
- Boo, G.H., Le Gall, L., Miller, K.A., Freshwater, D.W., Wernberg, T., Terada, R., Yoon, K.J & Boo, S.M.** 2016. A novel phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on five genes including the nuclear *CesA*, with descriptions of *Orthogonacladia* gen. nov. and Orthogonacladiaceae fam. nov. *Mol Phylogenet Evol* 101: 359-372.
- Brasileiro, P.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Bahia, R.G., Reis, R.P. & Filho, G.M.A.** 2009. Algas marinhas bentônicas da região de cabo Frio e arredores: síntese do conhecimento. *Rodriguésia* 60(1): 39-66.
- Cassano, V.** 2009. Taxonomia e filogenia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta), com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica.

- Couceiro, L., Maneiro, I., Ruiz, J.M. & Barreiro, R.** 2011. Multiscale genetic structure of an endangered seaweed *Ahnfeltiopsis pusilla* (Rhodophyta): implications for its conservation. *J Phycol* 47: 259-268.
- Creed M., Fujii M.T., Barreto M.B.B., Guimarães S.M.P.B., Cassano V., Pereira S.M.B., Oliveira-Carvalho M.F. & Khader S.** 2010. Rhodophyceae. In: Forzza R.C. (org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1ª. Ed. Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson Estúdio, 1: 416-436.
- Critchley A.T.** 1997. Seaweed resources. In: Seaweed cultivation and marine ranching. (M. Ohno & A.T. Critchley, eds.). 2ª ed. JICA, Japan. p. 1-6.
- Diniz-Filho, J.A.F., Telles, M.P.C., Bonatto, S.L., Eizirik, E., Freitas, T.R.O., Marco Jr, P., Santos, F.R., Sole-Cava, A. & Soares, T.N.** 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *J Biogeogr* 35: 753-763.
- Dixon, P.S.** 1958. The structure and development of the thallus in the British species of *Gelidium* and *Pterocladia*. *Ann. Bot. (n.s)* 22: 353-368.
- Dumilag, R.V. & Aguinaldo, Z.Z.A.** 2017. Genetic differentiation and distribution of *Pyropia acanthophora* (Bangiales, Rhodophyta) in the Philippines. *Eur J Phycol* 52: 104-115.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.
- Fan, K.C.** 1961. Morphological studies of the Gelidiales. University of California Press.
- Fernandes, S. & Guimarães, S.M.P.B.** 1998. Estudos taxonômicos de Gelidiales (Rhodophyta) do Estado do Espírito Santo, Brasil. In An do IV Congr Latino-Americano, II Reun Ibero-Americana e VII Reun Bras Ficologia, Vol. II, p. 181-201. Caxambu, MG.
- Ferreira, M.M. & Pinheiro, F.C.** 1966. Primeira contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas do nordeste brasileiro. *Arq Est Bio Mar Uni Fed Ceará, Fortaleza*, 6: 59-66.
- Freshwater, D.W. & Bailey, J.** 1998. A multigene phylogeny of the Gelidiales including nuclear large subunit rRNA sequence data. *J Appl Phycol* 10: 229-236.
- Freshwater, D.W., Fredericq, S. & Hommersand, M.H.** 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid *rbcL* nucleotide sequences. *J Phycol* 31: 616-632.
- Freshwater D.W. & Rueness J.** 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-194.

- Freshwater D.W., Tudor K., O'Shaughnessy K. & Wysor B.** 2010. DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: comparison of COI with *rbcL* and verification of the "barcoding gap". *Cryptogamie, Algologie* 31: 435-449.
- Friedlander, M.** 2008. Advances in cultivation of Gelidiales. *J Appl Phycol* 20 (5): 1-6.
- Fu, Y.X.** 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gavio, B & Fredericq, S.** 2002. *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *Eur J Phycol* 37: 349-359.
- Geraldino, P.J.L., Yang, E.C. & Boo, S.M.** 2006. Morphology and Molecular Phylogeny of *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea. *Algae* 21(4): 417-423.
- Geraldino, P.J.L., Riosmena-Rodriguez, R., Liao, L.M. & Boo, S.M.** 2010. Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta), with a description of *H. caespitosa* sp. nov. *J Phycol* 46: 336-345.
- Gmelin, S.G.** 1768. Historia fucorum. Ex typographa Academiae scientiarum. Petropoli, p. 1-6.
- Grand, W.S. & Bowen, B.W.** 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89: 415-426.
- Grusz, A.L. & Freshwater, D.W.** 2014. Studies of Costa Rican Gelidiales (Florideophyceae). II. Two Pacific Taxa Including *Gelidium microglossum*, n. sp. *Pac Sci* 68(1): 97-110.
- Guimarães, S.M.P.B.** 2006. A revised checklist of benthic marine Rhodophyta from the State of Espírito Santo, Brazil. *Bol do Inst Botânica* 17: 143-194.
- Guimarães, S.M.P.B.** 2014. *Gelidium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jard. Botânico do Rio de Janeiro
- Guiry, M.** 1990. Sporangia and spores. (K. Cole and R.A. Sheath, eds) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 348-376.
- Guiry M.D. & Guiry G.M.** 2017. *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 5 Março 2017.
- Guiry, M.D. & Womersley, H.B.S.** 1993. *Capreolia implexa* gen. et sp. Nov. (Gelidiales, Rodophyta) in Australia and New Zealand; an intertidal mat-forming alga with unusual life history. *Phycologia* 32: 266-277.

- Gurgel, C.F.D. & Fredericq, S.** 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *J. Phycol* 40: 138-159.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D.** 2009. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phyl Evol* 54: 291-301.
- Hommersand, M.H. & Fredericq, S.** 1988. Na investigation of cystocarp development in *Gelidium peridifolium* with a revised description of the Gelidiales (Rhodophyta). *Phycologia* 27: 254-272.
- Horta, P.A., Amancio, E., Coimbra, C.S. & Oliveira, E.C.** 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.
- Hu, Z.M., Duan, D.L. & Lopez-Bautista, J.** 2015. Seaweed Phylogeography from 1994 to 2014: An Overview. *Seaweed Phylogeography: Adaptation and Evolution of Seaweeds under Environmental Change. Springer*, 3-22.
- Hu, Z.M., Li, J.J., Sun, Z.M., Gao, X., Yao, J.T., Choi, H.G., Endo, H. & Duan, D.L.** 2016. Hidden diversity and phylogeographic history provide conservation insights for the edible seaweed *Sargassum fusiforme* in the Northwest Pacific. *Evol Appl* 1-13.
- Iha, C.** 2014. Diversidade de Gelidiales (Rhodophyta) baseada em marcadores moleculares e estudos morfoanatômicos para a região Sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 211 p.
- Iha, C., Milstein, D., Guimarães, S.M.P.B., Freshwater, D.W. & Oliveira, M.C.** 2015. DNA barcoding reveals high diversity in the Gelidiales of the Brazilian southeast coast. *Bot Mar* 58(4): 295-305.
- Iha, C., O'Shaughnessy, K.A., Guimarães, S.M.P.B., Oliveira, M.C. & Freshwater, D.W.** 2016. Taxonomic reappraisal of *Gelidium coarctatum* (Gelidiales, Rhodophyta) and *Gelidium lineare* sp. nov. from the tropical western Atlantic. *Phycologia* 55(5): 555-563.
- Jamas, M.** 2015. Diversidade de Gelidiales (Rhodophyta) no Brasil, com ênfase na região nordeste, com base em estudos morfológicos e DNA barcodes. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica.
- Jamas, M., Iha, C., Oliveira, M.C., Guimarães, S.M.P.B. & Fujii, M.T.** 2017. Morphological and molecular studies on Gelidiaceae and Gelidiellaceae (Gelidiales, Rhodophyta) from Brazil with description of the new species *Gelidium calidum*. *Phytotaxa* 314.

- Joly, A.B.** 1965. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. Bol da Fac Filos Ciências e Let Univ São Paulo, série Botânica, 21: 21-294.
- Kim, K.M. & Boo, S.M.** 2012. Phylogenetic relationships and distribution of *Gelidium crinale* and *G. pusillum* (Gelidiales, Rhodophyta) using *cox1* and *rbcL* sequences. *Algae* 27: 83-94.
- Kim K. M., Hoarau G.G., Boo S.M.** 2012. Genetic structure and distribution of *Gelidium elegans* (Gelidiales, Rhodophyta) in Korea based on mitochondrial *cox1* sequence data. *Aquat Bot* 98: 27-33.
- Kim, K. M., Hwang, I. K., Park, J. K. & Boo, S. M.** 2011. A new agarophyte species, *Gelidium eucorneum* sp. nov. (Gelidiales, Rhodophyta), based on molecular and morphological Data. *J Phycol* 47: 904-910.
- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Le Gall, L. & Saunders, G.W.** 2010. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J Phycol* 46: 374-389.
- Lewinsohn, T.M. & Prado, P.I.** 2005. Quantas espécies há no Brasil? Belo Horizonte: *Megadiversidade* 1: 36-42.
- Liao, W. R., Lin, J.Y., Shieh, W.Y., Jeng, W.L. & Huang, R.** 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J Ind Microbiol Biot* 30: 433-439.
- Lin, S.M., Fredericq, S. & Hommersand M.H.** 2001. Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on large subunit rDNA and *rbcL* sequences, including the Phycodryoideae subfam. nov. *J Phycol* 37: 881-899.
- Lindstrom, S.C. & Fredericq, S.** 2003. *rbcL* gene sequences reveal relationships among north-east Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) and a new species, *P. aestivalis*. *Phycol Res* 51: 211 - 224.
- Maggs, C.A., Le Gall, L., Mineur, F., Provan, J. & Saunders, G.W.** 2013. *Fredericqia deveauniensis*, gen. et sp. nov. (Phyllophoraceae, Rhodophyta), a new cryptogenic species. *Cryptogam, Algal* 34(3): 273-296.
- Martins, F.M. & Domingues, M.V.** 2011. Filogeografia. Revista da Biologia, vol. Esp. Biogeografia: 26-30.
- McHugh D.J.** 1991. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia*, 221: 19-29.

- McIvor, L., Maggs, C.A., Provan, J. & Stanhope, M.J.** 2001. *rbcL* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Mol Ecol* 10: 911-919.
- Millar, A.J.K. & Freshwater, D.W.** 2005. Morphology and molecular phylogeny of the marine algal order Gelidiales (Rhodophyta) from New South Wales, including Lord Howe and Norfolk Islands. *Aust Syst Bot* 18: 215-263.
- Miloslavich, P., Cruz-Motta, J.J., Hernández, A. Herrera, C., Klein, E., et al.** 2016. Benthic assemblages in South American intertidal rocky shores: biodiversity, services, and threats. *Marine Benthos* 83-137.
- Milstein, D., Oliveira, M.C., Martins, F.M. & Matioli, S.R.** 2008. Group I introns and associated homing endonuclease genes reveals a clinal structure for *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Bangiales, Rhodophyta) along the Eastern coast of South America. *BMC Evol Biol* 8: 308.
- Montecinos, A., Broitman, B.R., Faugeron, S., Haye, S.F., 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. *BMC Evol Biol* 12: 1-17.
- Muangmai, N., Fraser, C.I. & Zuccarello, G.C.** 2015. Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *J Phycol* 51(3): 574-585.
- Nei, M.** 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nunes, J.M.C.** 2005. Rodófitas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. p. 410.
- Oliveira Filho, E. C.** 1977. Algas Marinhas Bentônicas do Brasil. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 407.
- Patwary, M.U., Sensen, C.W., Ron, M.M. & van der Meer, J.P.** 1998. Nucleotide sequences of small subunit and internal transcribed spacer regions of nuclear rRNA genes support the autonomy of some genera of the Gelidiales (Rhodophyta). *J Phycol* 305: 299-305.
- Payo, D.A., Leliaert, F., Verbruggen, H., D'hondt, S., Calumpong, H.P. & De Clerck, O.** 2012. Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemismo in the marine red alga *Portieria* in Philippines. *Proc R Soc B* 280: 1-8.
- Perrone, C., Felicini, G. P. & Bottalico, A.** 2006. The prostrate system of the Gelidiales: diagnostic and taxonomic importance. *Bot Mar* 49: 23-33.

- Pinheiro-Vieira, F. & Ferreira, M.M.** 1968. Segunda Contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas do nordeste brasileiro. *Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará*, Fortaleza, 8(1): 75-82.
- Pueschel, C. & Cole, K.** 1982. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. *Am J Bot*, 69: 703-720.
- Santelices, B.** 1990. New and old problems in the taxonomy of the Gelidiales (Rhodophyta). In Thirteen Int Seaweed Symp SE - 18, *Developments in Hydrobiology*, 125-135. Edited by S. Lindstrom & P. Garielson. Springer Netherlands.
- Santelices, B. & Hommersand, M.H.** 1997. *Pterocliadiella*, a new genus in the Gelidiaceae (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 36: 114-119.
- Saunders, G.W.** 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1879-1888.
- Scariot, L.A.** 2010. Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Schneider C.W. & Wynne M.J.** 2007. A synoptic review of the classification of red algal genera a half century after Kylin's "Die Gattungen der Rhodophyceen". *Bot Mar*, 50: 197-249.
- Seo, Y.B., Lee, Y.W., Lee, C.H. & You, H.C.** 2010. Red algae and their use in papermaking. *Bioresource Technol* 101: 2549-2553.
- Sherwood A.R.** 2008. Phylogeography of *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the Hawaiian Islands: two mtDNA markers support three separate introductions. *Phycologia* 47: 79-88.
- Shimada, S. & Masuda, M.** 2000. New records of *Gelidiella pannosa*, *Pterocliadiella caerulescens* and *Pterocliadiella caloglossoides* (Rhodophyta, Gelidiales) from Japan. *Phycol Res* 48: 95-102.
- Shimada, S., Horiguchi, T. & Masuda, M.** 2000a. Confirmation of the status of three *Pterocladia* species (Gelidiales, Rhodophyta) described by K. Okamura. *Phycologia* 39(1): 10-18.
- Shimada, S., Horiguchi, T. & Masuda, M.** 2000b. Two new species of *Gelidium* (Rhodophyta, Gelidiales), *Gelidium tenuifolium* and *Gelidium koshikianum*, from Japan. *Phycological Res* 48: 37-46.
- Silva, L.M.C.M., Lima, V., Holanda, M.L., Pinheiro, P.G., Rodrigues, J.A.G., Lima, M.E.P. & Benevides, N.M.B.** 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities

- of lectin from marine red alga *Pterocladiaella capillacea*. *Biol Pharm Bull* 33(5): 830-835.
- Silveira, I.C.A., Schmidt, A.C.K., Campos, E.J.D., Godoi, S.S & Ikeda, Y.** 2000. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. *Rev bras oceanogr* 48(2): 171-183.
- Soares, L.P., Gurgel, C.F.D & Fujii, M.T.** 2015. Taxonomic reassessment of *Gracilaria cearenses* (Rhodophyta, Gracilariales), a poorly defined yet common flattened species based on morphological and molecular analysis including topotype collections. *Phytotaxa* 201(4): 241-255.
- Sohrabipour, J.; Lim, P.; Maggs, C.A. & Phang, S.M.** 2013. Two new species and two new records of *Pterocladiaella* (Gelidiales) from Malaysia based on analyses of *rbcL* and *coxI* gene sequences. *Phycologia* 52: 517-537.
- Tajima, F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Taylor, W.** 1943. Marine algae from Haiti collected by H. H. Bartlett in 1941. *Michigan Acad Sci.*
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A & Kumar, S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Thomas, D.T. & Freshwater, D.W.** 2001. Studies of Costa Rican Gelidiales (Rhodophyta): four Caribbean taxa including *Pterocladiaella beachii* sp. nov. *Phycologia* 40: 340-350.
- Thonchin, E.M. & Freshwater, D.W.** 2007. Four Gelidiales (Rhodophyta) new to Southern Africa, *Aphanta pachyrrhiza* gen. et sp. nov., *Gelidium profundum* sp. nov., *Pterocladiaella caerulescens* and *P. psammophila* sp. nov. *Phycologia* 46: 325-348.
- Thonchin, E.M., Freshwater, D.W. & Bolton, J.J.** 2003. A re-evaluation of the genera *Beckerella* and *Ptilophora* (Gelidiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *Phycologia* 42(1): 80-89.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C.** 2013a. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Ecol* 22: 1193-1213.
- Turchetto-Zolet, A.C., Segatto, A.L.A., Turchetto, C., Palma-Silva, C. & Freitas, L.B.** 2013b. Guia Prático para estudos Filogeográficos. 106 pp.
- Ugadim, Y.** 1974. Algas Marinhas Bentônicas do Litoral Sul do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná, III-Divisão Rhodophyta (1): Goniotrichales, Bangiales, Nemalionales e Gelidiales. *Bol. Botânica, Univer. S. Paulo* 2: 93-137.

- Ugadim Y.** 1985. Estudos taxonômicos de *Gelidium* e *Pterocladia* (Gelidiales-Rhodophyta) do Brasil. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 218 p.
- Ugadim Y.** 1987. Distribuição das espécies de *Gelidium* e *Pterocladia* (Gelidiaceae - Rhodophyta) no litoral brasileiro. *Nerítica* 2: 65-74.
- Ugadim Y.** 1988. Estudo comparado de *Gelidium coarctatum* Kützinger e *Pterocladia capillaceae* (Gmelin) Bornet et Thuret (Rhodophyta - Gelidiaceae) no litoral Brasileiro. *Gayana, Bot* 45: 203-223.
- van Oppen, M.J.H., Draisma, S.G.A., Olsen, J.L. & Stam, W.T.** 1995. Multiple trans-Arctic passages in the red alga *Phycodrys rubens*: evidence from nuclear rDNA ITS sequences. *Mar Biol* 123: 179-188.
- van Oppen, M.J.H., Diekmann, O.E., Wiencke, C., Stam, W.T. & Olsen, J.L.** 1994. Tracking dispersal routes: phylogeography of the Arctic-Antarctic disjunct seaweed *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta). *J Phycol* 30 (4): 67-80.
- Vis, M.L., Hodge, J.C. & Necchi Jr, O.** 2008. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. *J Phycol* 44: 882-888.
- Yoneshigue-Valentin, Y. & Valentin, J. L.** 1992. Macroalgae of the Cabo Frio. Upwelling region, Brazil: ordination of communities. In: Seeliger, U. (ed.). Coastal plant communities of Latin America. Academic Press, San Diego 31-50.
- Yoneshigue-Valentin, Y., Mitchell, G.J.P. & Gurgel, C.F.D.** 1995. Quelques observations préliminaires sur les macroalgues de la plate-forme continentale du sud-est brésilien. *Acta bot Gallica* 142(2): 161-165.
- Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C.** 1992. Temperature responses of economically importante red algae and their potential for mariculture in Brazilian Waters. *J Appl Phycol* 4: 339-345.
- Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C.** 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *Jpn J Phycol* 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.
- Zuccarello G.C. & West, J. A.** 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41: 49-60.

- Zuccarello G.C., Sandercock, B. & West, J.A.** 2002. Diversity within red algal species: a variation in world-wide samples of *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae) and *Murrayella pericladus* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies. *Eur J Phycol* 37: 403-417.
- Zuccarello G.C., Burger, G., West, J.A. & King, R.J.** 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Mol Ecol* 8: 1443-1447.
- Zuccarello G.C., Critchley A.T., Smith J.E., Sieber V. & Bleicher-Lhonneur G.** 2006. Systematics and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 18: 643-651.

Anexo

Anexo A. Listagem detalhada das amostras coletadas neste trabalho.

Espécie	Código	Voucher	País e Estado	Praia, município, data e coletor	Coordenada
<i>Gelidium floridanum</i>	IBT1579	SP428770	Brasil, ES	Praia de Carapebus, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°14'21"S/40°12'45"W
<i>G. floridanum</i>	IBT1608	SP428760	Brasil, SP	Praia de Cibratel, Itanhaém, 28.V.2013, M. Jamas	24°13'31"S/46°51'7"W
<i>G. floridanum</i>	IBT1631	SP428877	Brasil, SC	Praia da Joaquina, Florianópolis, 16.XI.2013, D. Milstein & L.P. Machado	27°37'44"S/48°26'55"W
<i>G. floridanum</i>	IBT1991	SP468853	Venezuela, Nueva Esparta	Bahia de Manzanillo, Isla Margarita, 03.V.2015, A. Velásquez & M. Duque	-
<i>G. floridanum</i>	IBT2175	SP469569	Brasil, RJ	Praia Grande (Ponta da Cabeça), Arraial do Cabo, 11.XI.2015, B.B. Souza	22°58'35"S/42°02'05"W
<i>G. floridanum</i>	IBT2184	SP469721	Brasil, SP	Praia do Éden. Guarujá, 17.IX.2016, B.B. Souza	23°59'14"S/46°11'08"W
<i>G. floridanum</i>	IBT2185	SP469722	Brasil, SP	Praia do Lázaro, Ubatuba, 14.X.2016, B.B. Souza	23°30'03"S/45°08'34"W
<i>Gelidium lineare</i>	IBT0350	SP429049	Brasil, BA	Praia da Penha, Itaparica, 29.IV.2010, M. Jamas	12°53'26"S/38°40'56"W
<i>G. lineare</i>	IBT0524	SP468910	Brasil, PE	Praia da Boa Viagem, Recife, 11.III.2009, M.T. Fujii	08°14'34"S/34°55'68"W
<i>G. lineare</i>	IBT1523	SP429048	Brasil, PB	Barra do Mamanguape, Rio Tinto, 11.III.2013, M.T. Fujii	06°47'02"S/34°55'13"W
<i>G. lineare</i>	IBT1566	SP469085	Brasil, PI	Praia do Coqueiro, Luís Correia, 25.VI.2013, M.T. Fujii & D. Milstein	2°54'26"S/41°35'8"W
<i>G. lineare</i>	IBT1576	SP468888	Brasil, ES	Enseada das Garças, Fundão, 21.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°01'52"S/40°09'42"W
<i>G. lineare</i>	IBT1580	SP428757	Brasil, CE	Praia do Pacheco, Caucaia, 28.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Soares	3°40'59"S/38°39'4"W
<i>G. lineare</i>	IBT1581	SP428758	Brasil, CE	Praia Dois Coqueiros, Caucaia, 25.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Soares	3°41'23"S/38°37'9"W
<i>G. lineare</i>	IBT1582	SP428759	Brasil, CE	Praia da Taíba, São Gonçalo do Amarante, 28.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Soares	3°30'14"S/38°54'28"W
<i>G. lineare</i>	IBT1688	SP469089	Brasil, RN	Praia do Cardeiro, São Miguel do Gostoso, 29.III.2014, M.T. Fujii & A. Leite	6°10'20"S/34°55'52"W
<i>G. lineare</i>	IBT1700	SP429047	Brasil, RN	Praia Rio do Fogo, Rio do Fogo, 30.III.2014, M.T. Fujii & A. Leite	5°11'57"S/35°27'40"W
<i>G. lineare</i>	IBT1717	SP429045	Brasil, PB	Praia de Carapibus, Conde, 01.IV.2014, M.T. Fujii & A. Leite	6°10'63"S/34°48'10"W
<i>G. lineare</i>	IBT1891	SP469095	Brasil, AL	Porto da Rua, São Miguel dos Milagres, 21.XI.2014, M.T. Fujii <i>et al.</i>	9°14'31"S/35°20'45"W
<i>G. lineare</i>	IBT1892	SP469094	Brasil, AL	Barra do Boqueirão, São Miguel dos Milagres, 22.XI.2014, M.T. Fujii <i>et al.</i>	9°07'20"S/35°16'16"W

Espécie	Código	Voucher	País e Estado	Praia, município, data e coletor	Coordenada
<i>G. lineare</i>	IBT1937	SP469567	Brasil, PE	Itamaracá, Recife, 21.III.2015, M.T. Fujii	07°44'53"S/34°49'50"W
<i>G. lineare</i>	IBT1938	SP469181	Brasil, PE	Praia do Paiva, Cabo de São Agostinho, 20.III.2015, M.T. Fujii	08°15'37"S/34°56'42"W
<i>G. lineare</i>	IBT1948	SP468889	Brasil, ES	Praia de Carapebus, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°14'21"S/40°12'45"W
<i>G. lineare</i>	IBT2053	SP468911	Brasil, BA	Praia Ponta Ponã, Cairu (Ilha de Tinharé), 30.VII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°27'14"S/38°53'17"W
<i>G. lineare</i>	IBT2063	SP468915	Brasil, BA	Praia Moreré (infralitoral), Cairu (Ilha de Tinharé), 31.VII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°35'37"S/38°53'37"W
<i>G. lineare</i>	IBT2065	SP468917	Brasil, BA	Praia Moreré, Cairu (Ilha de Tinharé), 30.VII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°35'37"S/38°53'37"W
<i>G. lineare</i>	IBT2078	SP468918	Brasil, BA	Praia da Barra, Cairu (Ilha de Tinharé), 01.VIII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°34'37"S/38°55'00"W
<i>Gelidium</i> sp. 1	IBT1952	SP468890	Brasil, ES	Praia de Carapebus, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°14'21"S/40°12'45"W
<i>Gelidium</i> sp. 1	IBT2097	SP469566	Brasil, BA	Praia de Jauá, Camaçari, 03.VIII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	12°49'25"S/38°13'11"W
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1578	SP469177	Brasil, ES	Praia de Capuba, Serra, 21.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°6'29"S/40°10'19"W
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1609	SP428772	Brasil, ES	Ponta dos Castelhanos, Anchieta, 22.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°48'50"S/40°37'55"W
<i>Gelidium</i> sp. 2	IBT1824	SP469012	Brasil, ES	Ponta dos Castelhanos, Anchieta, 09.IX.2014, M.T. Fujii	20°48'50"S/40°37'55"W
<i>Gelidium</i> sp. 3	IBT1825	SP469562	Brasil, ES	Praia de Parati, Anchieta, 08.IX.2014, M.T. Fujii	20°48'21"S/40°36'01"W
<i>Gelidium</i> sp. 4	IBT1942	SP468893	Cuba, Cienfuegos	La Milpa, Bahia de Cienfuegos, II.2015, A. Moreira	22°04'N/80°27'W
<i>Gelidium</i> sp. 4	IBT1944	SP468893	Cuba, Cienfuegos	La Milpa, Bahia de Cienfuegos, II.2015, A. Moreira	22°04'N/80°27'W
<i>Gelidium</i> sp. 5	IBT2079	SP469568	Brasil, BA	Praia da Barra, Cairu (Ilha de Boipeba), 01.VIII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°34'37"S/38°55'00"W
<i>Pterocliadiella beachiae</i>	IBT0351	SP469096	Brasil, BA	Praia da Penha, Itaparica, 29.IV.2010, S.M.P.B. Guimarães & N.S. Yokoya	12°54'18"S/38°37'59"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1488	SP469128	Brasil, BA	Praia de Vilas do Atlântico, Vila do Atlântico, 12.VII.2010, J.M. Nunes	12°47'00"S/38°11'09"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1492	SP469103	Brasil, BA	Praia de Stella Maris, Salvador, 13.XII.2011, J.M. Nunes	12°47'00"S/38°11'09"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1508	SP469119	Brasil, RN	Praia do Meio, Natal, 17.X.2012, S.M.P.B. Guimarães	5°46'13"S/35°11'40"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1583	SP428765	Brasil, CE	Praia Dois Coqueiros, Caucaia, 25.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Soares	3°41'23"S/38°37'9"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1616	SP469123	Brasil, PE	Praia de Porto de Galinhas, Ipojuca, 02.IX.2013,	8°30'26"S/34°59'59"W

Espécie	Código	Voucher	País e Estado	Praia, município, data e coletor	Coordenada
				S.M.P.B. Guimarães	
<i>P. beachiae</i>	IBT1620	SP469122	Brasil, PE	Praia de Muro Alto, Ipojuca, 19.IX.2013, M.T. Fujii	8°25'47"S/34°58'41"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1622	SP469124	Brasil, PE	Praia Tamandaré, Tamandaré, 18.IX.2013, M.T. Fujii	8°45'37"S/35°5'57"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1692	SP469117	Brasil, RN	Praia do Cardeiro, São Miguel do Gostoso, 29.III.2014, M. Jamas <i>et al.</i>	5°6'59"S/35°37'3"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1711	SP469120	Brasil, PB	Baía da Traição, Baía da Traição, 31.III.2014, M. Jamas <i>et al.</i>	6°41'15"S/34°55'51"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1714	SP469120	Brasil, PB	Baía da Traição, Baía da Traição, 31.III.2014, M. Jamas <i>et al.</i>	6°41'15"S/34°55'51"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1893	SP469180	Brasil, PE	Praia de Boa Viagem, Recife, 18.III.2015, M.T. Fujii	08°14'34"S/34°55'68"W
<i>P. beachiae</i>	IBT1945	SP468896	Cuba, Ciudad de la Habana	Playa, II.2015, P. González	23°06'N/82°28'W
<i>P. beachiae</i>	IBT1946	SP468896	Cuba, Ciudad de la Habana	Playa, II.2015, P. González	23°06'N/82°28'W
<i>P. beachiae</i>	IBT1951	SP468852	Brasil, BA	Praia do Forte, Mata de São João, 07.IV.2015, N.S. Yokoya	12°57'0"S/38°00'00"W
<i>P. beachiae</i>	IBT2055	SP468913	Brasil, BA	Praia Ponta Ponã, Cairu (Ilha de Tinharé), 30.VII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°27'14"S/38°53'17"W
<i>P. beachiae</i>	IBT2083	SP468920	Brasil, BA	Praia da Barra, Cairu (Ilha de Boipeba), 01.VIII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	13°34'37"S/38°55'00"W
<i>P. beachiae</i>	IBT2101	SP469570	Brasil, BA	Praia de Jauá, Camaçari, 03.VIII.2015, M.T. Fujii & B.B. Souza	12°49'25"S/38°13'11"W
<i>Pterocliadiella capillacea</i>	-	SP469574	Portugal, Açores	Ilha de São Miguel	-
<i>P. capillacea</i>	IBT0095	SP428695	Brasil, SP	Praia Brava, Ubatuba, 16.VI.2007, M.T. Fujii	23°31'13"S / 45°09'58"W
<i>P. capillacea</i>	IBT0172	SP469563	Brasil, SP	Ilha Vitória, Ubatuba, 19.V.2008, M.T. Fujii	23°25'39" S/45°3'48"W
<i>P. capillacea</i>	IBT0300	SP468905	Brasil, SP	Praia de Picinguaba, Ubatuba, 17.III.2010, M.T. Fujii	3°14'47"S/39°14'07"W
<i>P. capillacea</i>	IBT0441	SP469564	Brasil, SP	Praia de Cambriu, Ilha do Cardoso, 30.VI.2010, M.T. Fujii	25°09'22"S/47°54'58"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1477	SP468903	Brasil, RJ	Praia da Lagoinha, Búzios, 06.V.2012, M.T. Fujii	22°44'39"S/41°52'56"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1574	SP428766	Brasil, ES	Praia de Parati, Anchieta, 22.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°48'21"S/40°36'01"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1575	SP428767	Brasil, ES	Praia de Manguinhos, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°11' 20"S/40°11'24"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1577	SP428769	Brasil, ES	Praia de Carapebus, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°14'21"S/40°12'45"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1632	SP429065	Brasil, SC	Praia do Santinho, Florianópolis, 19.XI.2013, D. Milstein	27°27'42"S/48°22'34"W

Espécie	Código	Voucher	País e Estado	Praia, município, data e coletor & L.P. Machado	Coordenada
<i>P. capillacea</i>	IBT1684	SP401492	Brasil, SP	Praia Domingas Dias, Ubatuba, 17.I.2014, D. Milstein & L.P. Machado	23°29'45"S/45°02'29"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1767	SP428771	Brasil, RJ	Prainha, Arraial do Cabo, 14.V.2014, M.T. Fujii	22°57'22"S/42°01'36"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1768	SP401494	Brasil, SC	Praia da Joaquina, Florianópolis, 16.XI.2013, D. Milstein & L.P. Machado	27°37'44"S/48°26'55"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1818	SP469572	Brasil, SP	Ponta da Fortaleza, Ubatuba, 12.VIII.2014, M.T. Fujii	23°32'03"S / 45°09'35"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1826	SP469573	Brasil, ES	Praia da Cruz, Maratáizes, 10.X.2014, M.T. Fujii	21°01'56"S/40°48'44"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1827	SP469013	Brasil, ES	Ponta dos Castelhanos, Anchieta, 09.X.2014, M.T. Fujii	20°50'04"S/40°37'21"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1828	SP469013	Brasil, ES	Ponta dos Castelhanos, Anchieta, 09.X.2014, M.T. Fujii	20°48'50"S/40°37'55"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1936	SP468904	Brasil, RJ	Praia da Lagoinha, Búzios, 05.V.2012, M.T. Fujii	22°44'39"S/41°52'56"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1939	SP469178	Brasil, RJ	Prainha, Arraial do Cabo, 06.III.2015, V. Cassano	22°57'46"S/42°01'32"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1940	SP469179	Brasil, RJ	Ilha do Vigia, Cabo Frio, 07.III.2015, V. Cassano	22°52'30"S/41°57'13"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1941	SP428768	Brasil, ES	Enseada das Garças, Fundão, 21.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°01'52"S/40°09'42"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1950	SP468891	Brasil, ES	Praia de Carapebus, Serra, 23.VI.2013, C.H. Kano & L.P. Machado	20°14'21"S/40°12'45"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1955	SP469565	Brasil, SP	Praia Brava, Ubatuba, 22.VI.2016, B.B. Souza	23°31'20"S/45°09'58"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1977	SP469719	Brasil, SP	Praia do Lázaro, Ubatuba, 14.X.2016, B.B. Souza	23°30'03"S/45°08'34"W
<i>P. capillacea</i>	IBT1992	SP468855	Venezuela, Miranda	Corales, 20.V.2015, C. Pereira & V. Hernandez	-
<i>P. capillacea</i>	IBT2100	SP469718	Brasil, SP	Praia do Éden, Guarujá, 17.IX.2016, B.B. Souza	23°59'14"S/46°11'08"W
<i>P. capillacea</i>	IBT2102	SP469575	Brasil, SP	Praia da Lagoinha, Ubatuba, 15.X.2016, B.B. Souza	23°31'21"S/45°11'26"W
<i>P. capillacea</i>	IBT2176	SP469571	Brasil, RJ	Praia Grande (Ponta da Cabeça), Arraial do Cabo, 11.XI.2015, B.B. Souza	22°58'35"S/42°02'05"W
<i>P. capillacea</i>	IBT2177	SP469561	Brasil, RJ	Praia Rasa, Búzios, 13.XI.2015, M.T. Fujii	22°44'01"S/41°57'27"W
<i>P. capillacea</i>	-	-	Itália, Genova	1990, V. Cassano	-

