

HELENA RODRIGUES FRAGOSO

**Reavaliação molecular de macroalgas verdes
monostromáticas (Ulvophyceae, Chlorophyta) com
ênfase em espécies brasileiras e antárticas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Infraestrutura e 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 em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2022

HELENA RODRIGUES FRAGOSO

**Reavaliação molecular de macroalgas verdes
monostromáticas (Ulvophyceae, Chlorophyta) com
ênfase em espécies brasileiras e antárticas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Infraestrutura e 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 em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mutue Toyota Fujii

COLABORADORA: Dra. Luanda Pereira Soares

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**
do Instituto de Pesquisas Ambientais/SIMA.

Fragoso, Helena Rodrigues

F811r Reavaliação molecular de macroalgas verdes monostromáticas
(Ulvophyceae, Chlorophyta) com ênfase em espécies brasileiras e antárticas
/ Helena Rodrigues Fragoso - - São Paulo, 2022.
65p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2022.
Bibliografia.

1. Filogenia. 2. DNA barcoding. 3. Taxonomia. I. Título.

CDU: 582.26

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dra. Mutue Toyota Fujii (Orientadora)

Profa. Dra. Priscila Barreto de Jesus (Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências
Naturais e Humanas)

Prof. Dr. Carlos Frederico Deluqui Gurgel (Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade,
NUPEM/UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Ambientais pela oportunidade de realização do Mestrado e os conhecimentos obtidos nas disciplinas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Mutue Toyota Fujii, por todo apoio, ensinamentos, paciência e carinho ao me guiar nesta jornada, sempre acreditando no meu potencial.

À minha colaboradora professora-amiga, Dra. Luanda Pereira Soares, pelos momentos de seriedade, de brincadeira, aprendizados e conselhos. Por me ensinar quantas vezes necessário as tarefas do laboratório de biologia molecular.

A Dra. Nair Yokoya, Dra. Sílvia Guimarães, Jonatas, César, Henrique e Val do Lab. de Cultivo de Algas “Marilza Cordeiro Marino” por toda a ajuda. Também ao Dr. Levi Machado e Letícia pela ajuda nas coletas.

Ao Dr. Tae Oh Cho, Dr. Sung Min Boo e Dra. Eun Hee Bae pelas amostras e sequências da Coreia do Sul e à Beatriz pelas amostras da Antártica.

A todos os alunos, professores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, por serem sempre prestativos e criarem um ambiente aconchegante e amigável.

Aos meus amigos, especialmente Suzi, Felipe, Vinícius, Iara e Aline pelas risadas e companheirismo.

Finalmente, à minha família, aos meus pais (René e Denise), ao meu irmão (Guilherme) e ao nossas pets (Laika e Millie) por todo amor e incentivo.

Muito Obrigada!

RESUMO

As macroalgas verdes monostromáticas são espécies foliáceas com apenas uma camada de células em espessura, pertencentes aos gêneros *Gayralia*, *Monostroma* e *Protomonostroma* (Ulotrichales), *Kornmannia* e *Ulvaria* (Ulvaes). No Brasil, as espécies de *Gayralia*/*Monostroma* são comuns em manguezais, estuários e, eventualmente, em ambiente marinho. No sudeste asiático, as macroalgas verdes monostromáticas são conhecidas como “parae”, “hitoegusa” e possuem elevado valor comercial por serem utilizadas na culinária tradicional e são cultivadas há séculos. Estudos recentes demonstraram grande potencial biotecnológico dessas macroalgas, agregando valor como matéria-prima para novos segmentos das indústrias farmacêutica e cosmética. Entretanto, como o talo dessas macroalgas possui morfologia simples, problemas taxonômicos são abundantes na literatura. Apesar do histórico de vida e ontogenia do talo auxiliarem a delimitação dos táxons, nem sempre são conclusivos em nível de gênero e espécie. O uso de técnicas de biologia molecular, associado a estudos de morfologia, vem demonstrando grande potencial para a correta identificação dos táxons e a descoberta de espécies crípticas. Assim, este trabalho visou analisar a diversidade de algas verdes monostromáticas, por meio de estudos morfológicos e moleculares dos marcadores plastidiais *rbcL*-5P e *tufA* e do nuclear ITS, para confirmar a identidade taxonômica das amostras e avaliar as relações filogenéticas dentro do grupo. As algas foram coletadas aleatoriamente nas seguintes localidades: São Paulo - Rio Escuro, Praia do Lamberto e Lagoinha (Ubatuba, litoral norte), Praia das Cigarras (São Sebastião), Ilha do Cardoso e Cananéia (litoral sul); Bahia - Estuário de Maraú (Itacaré) e Ceará - Praia de Flecheiras (Trairi). Material proveniente da Coreia do Sul e Península Antártica também foram incluídas na análise. Quatro espécies foram identificadas neste estudo: *Gayralia brasiliensis*, *Monostroma oxyspermum*, *Monostroma hariatii* e *Monostroma kuroshiense*, mas somente as duas primeiras ocorrem no Brasil. *Monostroma oxyspermum* possui ampla distribuição nos dois hemisférios, mas no Brasil está mais restrita ao litoral sul e sudeste, nos ambientes estuarinos. *Gayralia brasiliensis* está mais bem distribuída nos ambientes estuarinos e marinhos do Brasil, desde Ceará em direção ao sul do país. Através dos marcadores *tufA* e ITS, foi confirmada a primeira ocorrência de *G. brasiliensis* no Oceano Pacífico (Havaí, EUA) e no Oceano Índico (Índia), uma espécie até então endêmica do Brasil. *M. kuroshiense* é o nome correto das macroalgas verdes monostromáticas que ocorrem na Coreia do Sul e que vem sendo identificadas com base em morfologia como *M. nitidum*. Pela primeira vez foram obtidas as sequências de ITS para *M. hariatii* da Península Antártica (localidade tipo), *tufA* para *G. brasiliensis* do Brasil e *tufA* e *rbcL*-5P para *M. oxyspermum* do Brasil, e com base nas filogenias desses três marcadores confirmaram que o gênero *Monostroma* é parafilético, estando presente em dois clados: um dos clados corresponde a *Ulvopsis* e o outro, que contém espécies identificadas como *Monostroma* e *Gayralia*, correspondem a um único gênero, *Monostroma*. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que o gênero *Gayralia* é parte do histórico de vida de *Monostroma*, como já havia sido apontado por outros autores. Ainda como resultado das análises filogenéticas, novas combinações para *Monostroma hariatii* e *Gayralia brasiliensis* devem ser providenciadas dentro de *Ulvopsis* e *Monostroma*, respectivamente. Os resultados destacam também o potencial do uso de marcadores moleculares para auxiliar na identificação taxonômica de espécies de interesse comercial.

Palavras-chave: filogenia, ITS, *rbcL*-5P, *tufA*, Ulotrichales, Ulvaes.

ABSTRACT

The monostromatic green macroalgae are blade-shaped species with only one layer of cells in thickness, belonging to the genera *Gayralia*, *Monostroma* and *Protomonostroma* (Ulotrichales), *Kornmannia* and *Ulvaria* (Ulvaes). In Brazil, *Gayralia*/*Monostroma* species are common in mangroves, estuaries and, eventually, in the marine environment. In Southeast Asia, monostromatic green macroalgae are known as “*parae*”, “*hitoegusa*” and have high commercial value for being used in traditional cuisine and have been cultivated for centuries. Recent studies have shown great biotechnological potential of these macroalgae, adding value as a raw material for new segments of the pharmaceutical and cosmetic industries. However, as the thallus of these macroalgae has a simple morphology, taxonomic problems abound in the literature. Although the life history and ontogeny of the thallus help the delimitation of taxa, they are not always conclusive at the genus and species level. The use of molecular biology techniques, associated with morphology studies, has shown great potential for the correct identification of taxa and the discovery of cryptic species. Thus, this work aimed to analyze the diversity of monostromatic green algae, through morphological and molecular studies of the plastid markers *rbcL*-5P and *tufA* and the nuclear ITS, to confirm the taxonomic identity of the samples and evaluate the phylogenetic relationships within the group. The algae were randomly collected in the following locations: São Paulo - Rio Escuro, Praia do Lamberto and Lagoinha (Ubatuba, north coast), Praia das Cigarras (São Sebastião), Ilha do Cardoso and Cananéia (south coast); Bahia - Maraú Estuary (Itacaré) and Ceará - Flecheiras Beach (Trairi). Material from South Korea and the Antarctic Peninsula was also included in the analysis. Four species were identified in this study: *Gayralia brasiliensis*, *Monostroma oxyspermum*, *Monostroma hariatii* and *Monostroma kuroshiense*, but only the first two occur in Brazil. *Monostroma oxyspermum* has a wide distribution in both hemispheres, but in Brazil it is restricted to the south and southeast coast, in estuarine environments. *Gayralia brasiliensis* is better distributed in the estuarine and marine environments of Brazil, from Ceará towards the south of the country. Through the markers *tufA* and ITS, the first occurrence of *G. brasiliensis* in the Pacific Ocean (Hawaii, USA) and in the Indian Ocean (India) was confirmed, a species until then endemic to Brazil. *M. kuroshiense* is the correct name for the monostromatic green macroalgae that occurs in South Korea and which has been identified based on morphology as *M. nitidum*. For the first time, ITS sequences were obtained for *M. hariatii* from the Antarctic Peninsula (type locality), *tufA* for *G. brasiliensis* from Brazil and *tufA* and *rbcL*-5P for *M. oxyspermum* from Brazil, and based on the phylogenies of these three markers confirmed that the genus *Monostroma* is paraphyletic, being present in two clades: one of the clades corresponds to *Ulvopsis* and the other, which contains species identified as *Monostroma* and *Gayralia*, correspond to a single genus, *Monostroma*. The results obtained in the present study confirm that the genus *Gayralia* is part of the life history of *Monostroma*, as had already been pointed out by other authors. Also, as a result of the phylogenetic analyses, new combinations for *Monostroma hariatii* and *Gayralia brasiliensis* should be provided within *Ulvopsis* and *Monostroma*, respectively. The results also highlight the potential of using molecular markers to assist in the taxonomic identification of species of commercial interest.

Keywords: phylogeny, ITS, *rbcL*-5P, *tufA*, Ulotrichales, Ulvaes.

LISTA DE ABREVIATURAS

DSL: ontogenia do talo do tipo “disco-saco-lâmina”

FSL: ontogenia do talo do tipo “filamento-saco-lâmina”

FL: ontogenia do talo do tipo “filamento-lâmina”

ITS: gene nuclear que codifica o espaçador interno transcrito do rDNA que separa as subunidades ribossomais 18S e 5,8S (ITS1) e 5,8S e 26S (ITS2)

MVM: macroalgas verdes monostromáticas

pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

***rbcL*-5P:** região 5’ do gene plastidial que codifica a subunidade grande da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase

SR: sulfato ramnano

***tufA*:** gene plastidial que codifica o fator de elongação Tu

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrões de ontogenia do talo em macroalgas verdes monostromáticas. Adaptado de Bast (2015).....7

Figura 2. Tipos de histórico de vida em macroalgas verdes monostromáticas. **(a)** Reprodução sexual isomórfica. **(b)** Reprodução sexual heteromórfica sem a fase “codiolum”. **(c)** Reprodução sexual heteromórfica com a fase “codiolum”. **(d)** Reprodução assexual monomórfica. **(e)** Reprodução assexual heteromórfica.....8

Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências de DNA do marcador plastidial *tufA* de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. **(A)** Clado do gênero *Monostroma*. **(B)** Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.....22

Figura 4. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do marcador plastidial *rbcL-5P A* de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. **(A)** Clado do gênero *Monostroma*. **(B)** Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.....23

Figura 5. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do marcador nuclear ITS de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. **(A)** Clado do gênero *Monostroma*. **(B)** Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.....24

Figura 6. Morfologia de *Gayralia brasiliensis*. **(a)** Exemplares crescendo no manguezal da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo. **(b)** Ambiente marinho (Praia das Flecheiras, Ceará) onde foi coletado *G. brasiliensis*. **(c)** Detalhe de pequenos espécimes crescendo em estacas dos currais de pesca marinha. **(d)** Aspecto geral do talo. **(e)** Porção basal do talo, mostrando células rizoidais e o apressório discoide. **(f)** Vista superficial mostrando células dispostas em pares. **(g)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Escala: d, 1 cm; e-g, 25 μm27

Figura 7. Morfologia de *Monostroma oxyspermum* do sudeste do Brasil. **(a)** Pequenas populações crescendo em um costão rochoso sombreado, associadas a *Bostrychia* spp. **(b)** Hábito de alguns espécimes enterrados no lodo. **(c, d)** Aspecto geral dos espécimes. Observe o aspecto intrincado das lâminas e o acúmulo de sedimentos na região de fixação ao substrato. **(e)** Porção basal do talo, mostrando o desenvolvimento inicial das células rizoidais. **(f)** Detalhe de células rizoidais inchadas com extensões multicelulares (setas). **(g)** Células rizoidais em forma de clava, extremamente alongadas. **(h)** Detalhe da região basal do talo mostrando a massa de filamentos rizoidais bem desenvolvidos. **(i)** Vista superficial do talo mostrando células com 2 pirenóides (setas). **(j)** Corte transversal mostrando a estrutura monostromática. **(k)** Vista superficial mostrando a zona da lâmina reprodutiva, na cor verde-oliva. **(l)** Detalhe das células férteis em vista superficial. Escala: c-d, 530 μm ; h, 50 μm ; e-g e i-l, 25 μm30

Figura 8. Morfologia de *Monostroma kuroshiense* de Chaeseokgang, Coreia do Sul. **(a)** População crescendo aderida a substrato rochoso. **(b-c)** Aspecto geral dos espécimes e suas variações morfológicas. **(d)** Vista superficial do talo, mostrando células com cantos angulares. **(e)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Escala: b-c, 1 cm; d-e, 25 μm32

Figura 9. Morfologia de *Monostroma hariotii* da Península Antártica. **(a)** População crescendo em substrato rochoso da zona entremarés. **(b-c)** Aparência geral dos espécimes. Observe o aspecto em forma de saco do talo. **(d)** Vista superficial mostrando células próximas umas das outras. **(e)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Observe as células alongadas e compactadas. Escala: b-c, 1 cm; d-e, 25 μm33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo do histórico nomenclatural dos gêneros de macroalgas verdes monostromáticas, por ordem cronológica, de acordo com Guiry & Guiry (2022). Comentários taxonômicos incluem os principais pontos para cada gênero.....	6
Tabela 2. Espécies de macroalgas verdes monostromáticas com sequências produzidas; Coletas, depósito e marcadores sequenciados.....	11
Tabela 3. Etapas dos ciclos de PCR utilizados na amplificação dos marcadores selecionados. O número de ciclos se refere às etapas de desnaturação, anelamento e extensão.....	14
Tabela 4. Marcadores moleculares analisados e respectivos <i>primers</i> utilizados na PCR e sequenciamento.....	14
Tabela 5. Sequências importadas do <i>GenBank</i> para as análises filogenéticas.....	16
Tabela 6. Resumo das principais características do histórico de vida e ontogenia do talo dos gêneros de macroalgas verdes monostromáticas.....	34

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Histórico de estudos taxonômicos das Macroalgas Verdes Monostromáticas.....	3
1.2. Histórico de vida e ontogenia das Macroalgas Verdes Monostromáticas.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1. Coletas e processamento das amostras.....	10
3.2. Estudos morfológicos.....	13
3.3. Estudos moleculares.....	13
3.3.1. Extração de DNA.....	13
3.3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento dos marcadores moleculares.....	13
3.3.3. Alinhamento de sequências.....	15
3.3.4. Análises filogenéticas.....	15
4. Resultados.....	21
4.1. Estudos moleculares.....	21
4.1.1. Marcador plastidial <i>tufA</i>	21
4.1.2. Marcador plastidial <i>rbcL</i> -5P.....	22
4.1.3. Marcador nuclear ITS.....	23
4.2. Estudos morfológicos.....	25
<i>Gayralia brasiliensis</i>	25
<i>Monostroma oxyspermum</i>	28
<i>Monostroma kuroshiense</i>	31
<i>Monostroma hariotii</i>	32
5. Discussão.....	34
6. Considerações finais.....	39
Referências bibliográficas.....	40
Anexos.....	52

1. INTRODUÇÃO

As macroalgas verdes monostromáticas (MVM) compreendem um complexo de gêneros pertencentes às ordens Ulvales e Ulotrichales (classe Ulvophyceae) que exibem talos foliáceos, às vezes tubulares, com uma camada de células (monostromáticos) em pelo menos um estágio do histórico de vida (Tatewaki 1969, Golden & Cole 1986). Os gêneros mais conhecidos e atualmente aceitos, incluindo os comestíveis, são *Ulvaria* Ruprecht e *Kornmannia* Bliding (ordem Ulvales) e *Monostroma* Thuret, *Protomonostroma* K.L.Vinogradova e *Gayralia* K.L.Vinogradova (ordem Ulotrichales). As espécies têm ampla distribuição mundial, desde as regiões polares aos trópicos de ambos os hemisférios, ocorrendo principalmente em águas estuarinas, mas também em habitats marinhos (Guiry & Guiry 2022). Atualmente são reconhecidas 40 espécies de MVM, sendo 32 do gênero *Monostroma*, três de *Ulvaria*, duas de *Gayralia*, duas de *Protomonostroma* e uma de *Kornmannia* (Guiry & Guiry 2022).

Algumas espécies de *Monostroma* são cultivadas há séculos no sudeste asiático para fins de alimentação humana, devido a importantes fontes nutricionais e ricas em vitaminas B e C, sendo conhecidas na Coreia do Sul como “parae” e no Japão como “hitoegusa” (Nisizawa *et al.* 1987, Sanyal *et al.* 2019). Em 2019, a FAO registrou a produção de 6.321 toneladas (massa úmida) de *Monostroma* (Cai *et al.* 2019). No entanto, esse número pode estar subestimado, pois apenas a produção de *M. nitidum* Wittrock na Coreia do Sul foi registrada. A produção anual de *Monostroma* somente em Okinawa, no Japão, foi cerca de 100 toneladas em 2016 (Tako *et al.* 2017). Contudo, a aplicação incorreta de nomes também é comum, referindo-se *Monostroma* como “aosa”, nome popular de *Ulva* Linnaeus, enquanto *Enteromorpha* Link pode ser rotulada como “hitoegusa” e “aosa”, em vez de seu nome popular correto “aonori” (Kawashima *et al.* 2013).

No Brasil, as MVM já foram exploradas em bancos naturais na região sul do estado de São Paulo por descendentes de imigrantes asiáticos e por pescadores locais no estado do Paraná, entre 1980 e 1990, que forneciam aos restaurantes japoneses (Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2008, Pellizzari & Reis 2011). No entanto, a atividade foi interrompida devido à diminuição dos bancos naturais e incerteza de fatores comerciais (Pellizzari & Reis 2011).

Pellizzari *et al.* (2007) realizaram experimento de cultivo de *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya, na Baía de Paranaguá (Paraná), utilizando redes de polipropileno instaladas na margem do manguezal. Os autores observaram que o recrutamento e produção de *G. brasiliensis* ocorreram durante todo o ano, com maior taxa de crescimento e, consequentemente, maior tamanho do talo e biomassa produzida durante o inverno e primavera. Esses resultados demonstraram que o cultivo de *G. brasiliensis* no Brasil seria uma boa opção

de maricultura para as comunidades locais e uma alternativa para a redução da dependência de importação de produtos provenientes de diferentes países produtores de algas.

Estudos recentes demonstraram que polissacarídeos com atividade biológica podem ser extraídos das MVM. Por exemplo, o sulfato ramnoso (SR), um polissacarídeo composto por L-ramnose e L-ramnose sulfatada é encontrado em algas verdes e possui diversas propriedades (Shimada *et al.* 2021). Estudos com SR em *Monostroma nitidum* encontraram propriedades antioxidantes (Hoang *et al.* 2015), anti-inflamatórias (Hoang *et al.* 2015, Terasawa *et al.* 2022), hipolipemiante (Hoang *et al.* 2015) e gelificantes (Tako *et al.* 2017), além de melhorar a constipação e alterar a microbiota do intestino (Shimada *et al.* 2021). SR de *M. angicava* Kjellman possui atividade anticoagulante (Li *et al.* 2017) e de *M. latissimum* Wittrock, possui atividade contra os enterovírus 71 (Wang *et al.* 2018), entre outros exemplos. Espécies de *Gayralia* produzem heteroramnose sulfatada, e estudos com *G. oxysperma* (Kützing) K.L.Vinogradova ex Scagel & *al.* demonstraram propriedades contra o vírus herpes simplex (Cassolato *et al.* 2008), antitumorais (Ropellato *et al.* 2015) e antiveneno (Silva *et al.* 2018). Análises bioquímicas preliminares corroboram os usos nutracêuticos e cosméticos de *G. brasiliensis* (Pellizzari & Reis 2011), suas propriedades antioxidantes (Bernardi *et al.* 2016), de inibição de migração e invasão de células cancerígenas (Bellan *et al.* 2020) e ação citotóxica em células de glioblastoma (Mazepa *et al.* 2021). Este interesse recente no potencial biotecnológico de MVM pode aumentar a demanda por sua produção comercial e reforça a necessidade de identificação precisa das espécies, utilizando principalmente ferramentas moleculares.

As MVM e outras espécies de Ulvophyceae são comuns em manguezais e estuários brasileiros, muitas vezes associadas com algumas algas vermelhas (Rhodophyta), em uma comunidade definida por Post (1936) como “Bostrychietum”, crescendo sobre pneumatóforos ou diretamente sobre o substrato (Eston *et al.* 1992, Braga *et al.* 1997). Estas macroalgas são importantes produtoras primárias deste ecossistema e fornecem abrigo para micro-invertebrados (MMA 2018). As macroalgas interagem diretamente com as condições ambientais dos manguezais, como a disponibilidade de luz, gradiente de salinidade e tipo de substrato, que podem influenciar seu crescimento, sobrevivência e reprodução (Eston *et al.* 1991, Braga *et al.* 1997, Cunha & Costa 2002).

No Brasil, existem diversos registros de MVM, mas apenas *Gayralia brasiliensis* e *G. oxysperma* possuem ocorrência confirmada por dados moleculares. *G. brasiliensis* foi descrita a partir de material coletado do litoral do Paraná por Pellizzari *et al.* (2013) e possui ampla distribuição na costa brasileira, ocorrendo em estuários e manguezais e também nos ambientes marinhos, desde os estados do Pará (Pedrini *et al.* 2021), Pernambuco, Bahia, Espírito Santo,

Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná até Santa Catarina (Pellizzari *et al.* 2013). Contudo, essa espécie era conhecida na costa brasileira com diferentes nomes, por exemplo, como *Monostroma* sp. no Espírito Santo (Cordeiro-Marino *et al.* 1993) e São Paulo (Braga 1997, Braga *et al.* 1997), e como *Protomonostroma* sp. em São Paulo (Coto 2007). Já para *G. oxysperma*, Pellizzari *et al.* (2013) demonstraram, através do marcador nuclear ITS, uma distribuição restrita aos estuários e manguezais subtropicais dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Similarmente, *G. oxysperma* já foi registrada em São Paulo como *M. latissimum* (Joly 1957), *M. oxyspermum* (Joly 1965), *Ulvaria oxysperma* var. *oxysperma* (Ugadim 1973) e *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding (Braga 1997, Braga *et al.* 1997).

1.1. Histórico de estudos taxonômicos das Macroalgas Verdes Monostromáticas

Linnaeus (1753) ao descrever o gênero *Ulva*, na primeira edição de “Species Plantarum”, não especificou se as espécies foliáceas apresentavam uma ou duas camadas de células em espessura, ou seja, se eram monostromáticas ou distromáticas, respectivamente. Assim, Kützinger (1843) propôs que o gênero *Ulva* acomodasse as algas monostromáticas e descreveu um novo gênero *Phycoseris* (atualmente sinônimo de *Ulva*) para as espécies distromáticas.

Ruprecht (1850) descreveu o gênero *Ulvaria*, primeiro gênero monostromático (a exceção de *Ulva*, na época), com base nas estruturas de “frutificação” (reprodução) de *U. fusca* Postels & Ruprecht (= *Ulvaria splendens* (Ruprecht) K.L.Vinogradova). Thuret (1854), por meio de estudos de anatomia interna, discordou de Kützinger (1843) e propôs que o gênero *Ulva* fosse conservado para as macroalgas foliáceas distromáticas, uma vez que as espécies comumente estudadas pelos autores, como *U. lactuca* Linnaeus, *U. rigida* C.Agardh e *U. linza* Linnaeus, são todas distromáticas. Dessa forma, Thuret (1854) sinonimizou *Phycoseris* a *Ulva*, e descreveu o gênero *Monostroma* para as macroalgas foliáceas monostromáticas. Kunieda (1934) propôs a nova família Monostromataceae para abrigar o gênero *Monostroma*, pois observou diferenças no histórico de vida em relação à família Ulvaceae, especialmente a presença de um esporófito do tipo “codiolum”.

Papenfuss (1960) examinou o material tipo do gênero *Ulva*, um exemplar de *U. lactuca* depositado no herbário Lineano em Londres (Inglaterra) e concluiu que Thuret (1854) estava correto e, de fato, *Ulva* era um gênero distromático. Então, Papenfuss (1960) propôs a conservação do nome *Monostroma* para as algas monostromáticas, tornando *Ulvaria* um sinônimo de *Monostroma*. Porém, no mesmo ano, Bliding (1960) sugeriu a manutenção do gênero *Ulvaria* para as espécies monostromáticas que possuem apenas reprodução assexuada por zooides biflagelados e *Monostroma* para as espécies que possuem uma geração sexual e outra

assexual em seu histórico de vida. Como Ruprecht (1850) não designou um holótipo para o gênero *Ulvaria*, Papenfuss (1960) designou *Ulvaria fusca* (= *U. splendens* (Ruprecht) K.L.Vinogradova) como lectotipo.

Outra questão alvo de debate taxonômico foi quais espécies constituíam o gênero *Monostroma*, uma vez que Thuret (1854) não indicou o holótipo, mas mencionou duas espécies na descrição do gênero, *M. bullosum* (Roth) Thuret e *M. oxyspermum* Thuret (= *Gayralia oxysperma*). Diante disso, Pfeiffer (1874) designou *M. bullosum* como lectotipo, porém Papenfuss (1960) relectotipifica-o com *M. oxyspermum* (Kützinger) Doty (= *Gayralia oxysperma*). Kornmann (1964) discordou de Papenfuss (1960) e retornou a espécie tipo de *Monostroma* para *M. bullosum*, a partir de estudos de ontogenia. Contudo, o histórico de vida e ontogenia do talo das duas espécies são diferentes: *M. bullosum* possui reprodução sexual com alternância de gerações heteromórficas e ontogenia do talo do tipo “disco-saco-lâmina” enquanto *M. oxyspermum* possui apenas reprodução assexual com uma fase macroscópica foliácea e ontogenia “filamento-saco-lâmina” (Bliding 1968). Com base nessas diferenças, Gayral (1964) descreveu o gênero *Ulvopsis* para abrigar as espécies com histórico de vida diplobionte e alternância de gerações heteromórficas, com *U. grevillei* (Thuret) Gayral da França como espécie tipo. Bliding (1968) considerou que a descrição de Thuret (1854) para o gênero *Monostroma* era mais semelhante a *M. bullosum* e transferiu *M. oxyspermum* para o gênero *Ulvaria*. No mesmo trabalho, Bliding (1968) também transferiu duas espécies de *Monostroma*, *M. leptodermum* Kjellman e *M. zostericola* Tilden [= *Kornmannia leptoderma* (Kjellman) Bliding], para o novo gênero *Kornmannia*, com base em características morfológicas e de histórico de vida, que eram diferentes de *Monostroma*. Como o gênero *Kornmannia* não apresentava alternância de gerações isomórficas, característico da família Ulvaceae, e nem alternância de gerações heteromórficas com um esporófito do tipo “codiolium”, típico de Monostromataceae, Golden & Cole (1986) transferiram o gênero *Kornmannia* para a nova família Kornmanniaceae.

Vinogradova (1969) não considerou *Monostroma oxyspermum* como pertencente ao gênero *Ulvaria*, conforme proposto por Bliding (1968), devido às diferenças no histórico de vida e propôs um novo gênero *Gayralia* para acomodar *M. oxyspermum*, como *G. oxysperma*. A autora também propôs o gênero *Protomonostroma* para acomodar *M. undulatum* Wittrock, da Noruega. Vinogradova (1969) designou a nova família Gayraliaceae para incluir os novos gêneros *Gayralia* e *Protomonostroma*.

Borzi (1895) descreveu a ordem Ulotrichales para acomodar a família Ulvaceae, anteriormente descrita como “Ulvaceés” por Lamouroux (1813) para agrupar todas as algas verdes. A ordem Ulvales foi descrita alguns anos depois por Blackman & Tansley (1902),

porém somente alguns autores aceitaram a necessidade de duas ordens para as algas verdes foliáceas. O estudo de Floyd & O'Kelly (1984) foi inovador ao considerar a ultraestrutura das células móveis (zooides, gametas e esporos) de vários gêneros, além de caracteres morfológicos e de histórico de vida, para corroborar a separação das ordens Ulvales e Ulotrichales. Somente com o advento da biologia molecular e o aumento dos estudos sobre as algas verdes, a posição das ordens, famílias e gêneros vem sendo esclarecida (Hayden & Waaland 2002, Leliaert *et al.* 2012, Bast *et al.* 2015). Em nível de ordem, por exemplo, dados filogenômicos recentes suportaram Ulvales e Ulotrichales como ordens distintas e irmãs na classe Ulvophyceae (Hou *et al.* 2022). Dentre as macroalgas, as verdes foram as últimas a terem marcadores moleculares específicos para DNA barcoding desenvolvidos e avaliados, sendo *tufA* o melhor marcador selecionado, pois é o que possui maior universalidade, melhor qualidade de sequências e menor taxa de contaminação (Saunders & Kucera 2010). O marcador *rbcL* foi considerado o segundo melhor para as macroalgas verdes, porém poucos estudos de MVM utilizaram-no (Saunders & Kucera 2010; Hayden & Waaland 2002; Shimada *et al.* 2003; Lin *et al.* 2013; Bast *et al.* 2015). Entretanto, os únicos estudos brasileiros de DNA barcoding sobre MVM utilizaram o marcador ITS, apesar deste anteriormente ter sido considerado difícil de amplificar e possuir variância muito alta para análises ao nível de gênero (Pellizzari *et al.* 2013; Silva *et al.* 2022).

A visão geral desse histórico é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo do histórico nomenclatural dos gêneros de macroalgas verdes monostromáticas, por ordem cronológica, de acordo com Guiry & Guiry (2022). Comentários taxonômicos incluem os principais pontos para cada gênero.

Gêneros	<i>Ulvaria</i>	<i>Monostroma</i>	<i>Ulvopsis</i>	<i>Kornmannia</i>	<i>Protomonostroma</i>	<i>Gayralia</i>
Descrição original	Ruprecht (1850)	Thuret (1854)	Gayral (1964)	Bliding (1968)	Vinogradova (1969)	Vinogradova (1969)
Espécie tipo	<i>U. splendens</i>	<i>M. bullosum</i>	<i>U. grevillei</i>	<i>K. leptoderma</i>	<i>P. undulatum</i>	<i>G. oxysperma</i>
Localidade tipo	Ilhas Aleutian, Alasca	Inglaterra	Bretagne, França	Novaya Zemlya, Ártico russo	Ilhas Nordland, Noruega	Mar Báltico, Alemanha
Espécies aceitas	03	32	-	01	02	02
Ordem	Ulvaes	Ulotrichales	Ulotrichales	Ulvaes	Ulotrichales	Ulotrichales
Distribuição mundial	América do Norte, América do Sul, Europa, Ártico, Ásia e Oceania	cosmopolita	Ilhas do Atlântico, Mar Báltico e Japão	Ártico, América do Norte, Norte da Europa	América do Norte, América do sul, Europa, Ásia, Antártica	América do Norte, América do sul, América Central, Europa, África e Oceania
Comentários taxonômicos	Papenfuss (1960) considerou sinônimo de <i>Monostroma</i> . Bliding (1960) ressuscitou <i>Ulvaria</i> para espécies assexuais com zooides biflagelados	Pfeiffer (1874) designou <i>M. bullosum</i> como tipo. Papenfuss (1960) designou <i>M. oxyspermum</i> como tipo. Kornmann (1964) retornou a espécie tipo para <i>M. bullosum</i>	Atualmente é sinônimo de <i>Monostroma</i>	Proposto para acomodar <i>M. leptoderma</i> e <i>M. zostericola</i>	Proposto para acomodar <i>M. undulatum</i>	Proposto para acomodar <i>M. oxyspermum</i> devido a diferenças no histórico de vida

1.2 Histórico de vida e ontogenia das Macroalgas Verdes Monostromáticas

Devido à simplicidade dos caracteres morfológicos, muitos autores optaram por estudos de histórico de vida e ontogenia do talo para a identificação das macroalgas verdes monostromáticas. Três padrões de ontogenia do talo são atualmente reconhecidos nas MVM: “disco-saco-lâmina” (DSL), “filamento-saco-lâmina” (FSL) e “filamento-lâmina” (FL). Contudo, nenhum dos tipos de ontogenia é exclusivo ou único para os gêneros. Espécies do mesmo gênero podem apresentar ontogenias do talo diferentes, como é o caso de *Gayralia oxysperma* que possui ontogenia FSL e *G. brasiliensis* que possui ontogenia do tipo FL (Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2013). Da mesma forma, espécies de gêneros diferentes podem ter ontogenias semelhantes, como é o caso de *Monostroma grevillei* e *Kornmannia leptoderma*, ambas com ontogenia do tipo DSL (Bliding 1968). Um resumo dos principais padrões de ontogenia do talo e tipos de histórico de vida em macroalgas verdes monostromáticas são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

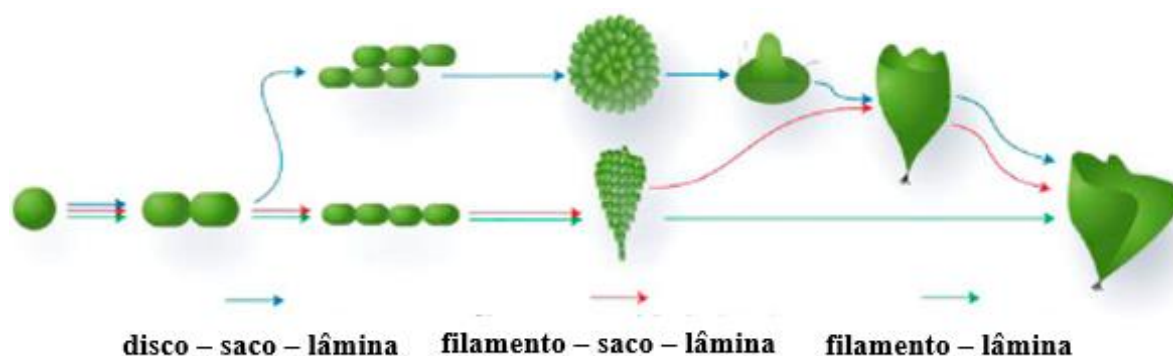


Figura 1. Padrões de ontogenia do talo em macroalgas verdes monostromáticas (adaptado de Bast 2015).

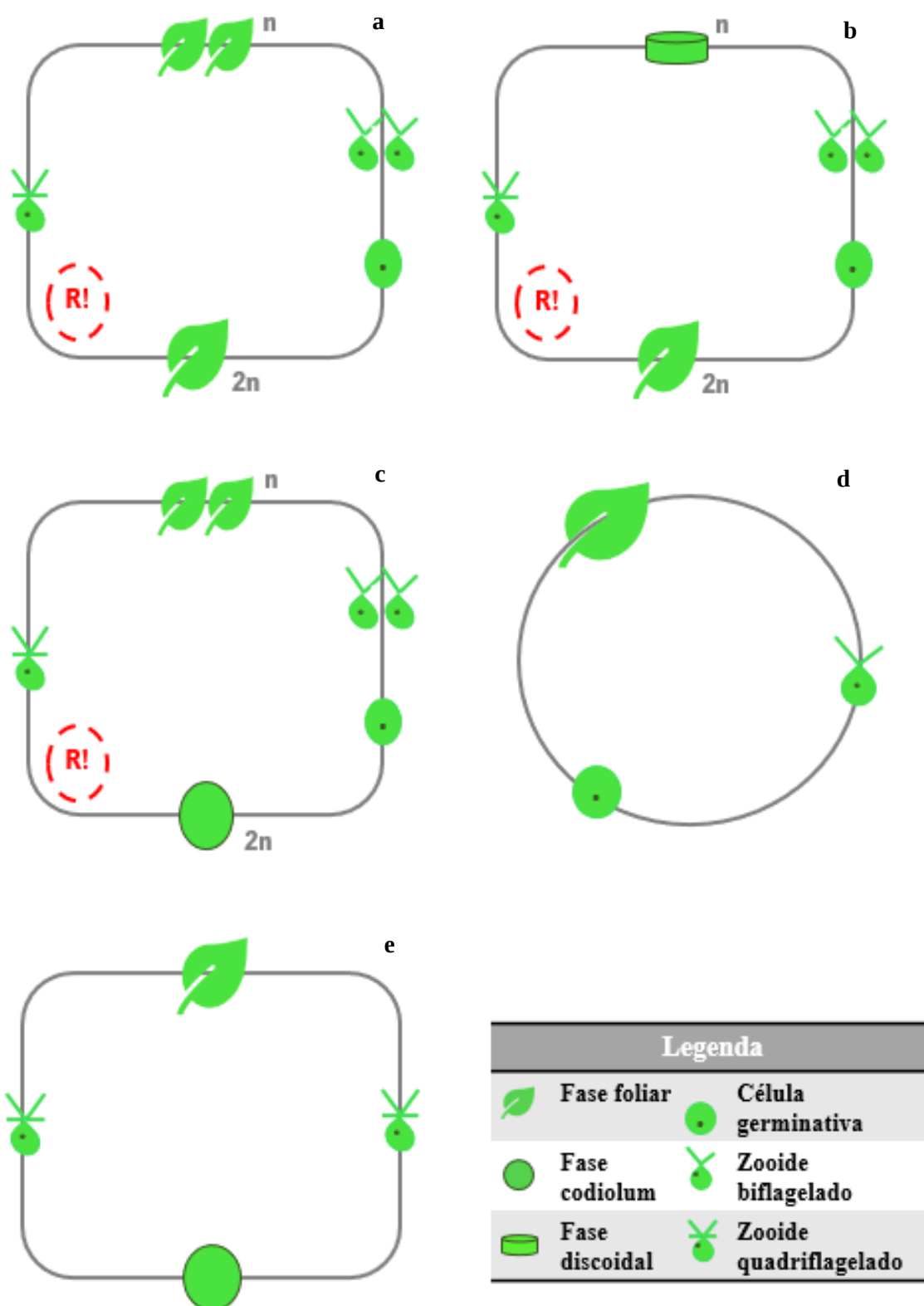


Figura 2. Tipos de histórico de vida em macroalgas verdes monostomáticas. **(a)** Reprodução sexual isomórfica. **(b)** Reprodução sexual heteromórfica sem a fase “codiolum”. **(c)** Reprodução sexual heteromórfica com a fase “codiolum”. **(d)** Reprodução assexual monomórfica. **(e)** Reprodução assexual heteromórfica.

Em *Ulvaria* há alternância de gerações isomórficas (Figura 2a), onde o gametófito macroscópico laminar libera isogametas quadriflagelados, que após a fusão, o zigoto se

desenvolve novamente em uma fase laminar macroscópica; que por sua vez, libera zoósporos quadriflagelados (Bliding 1968, O’Kelly *et al.* 1984).

O gênero *Kornmannia* possui histórico de vida diplobionte e alternância de gerações heteromórficas: um esporófito macroscópico laminar libera zoósporos quadriflagelados, que germinam em um gametófito discoidal microscópico (Figura 2b). Os discos liberam isogametas quadriflagelados, que após a fusão se desenvolvem na fase laminar novamente (Golden & Cole 1986). A reprodução assexual também já foi relatada para o gênero, com zooides que se desenvolvem em um disco, que por sua vez se desenvolve em uma lâmina (Bliding 1968).

O gênero *Monostroma* histórico de vida diplobionte e alternância de gerações heteromórficas (Figura 2c), onde o gametófito macroscópico laminar (haploide) libera isogametas biflagelados e o zigoto formado pela fusão dos gametas desenvolve um esporófito unicelular chamado “codiolum” (diploide), que libera zoósporos flagelados e germinam na fase laminar haploide (Bliding 1968, Horinouchi 2019). A reprodução assexual também já foi observada no gênero (Figura 2d); neste caso a lâmina macroscópica libera zooides biflagelados que, após a germinação, se desenvolvem novamente em uma lâmina macroscópica (Bliding 1968, Bast *et al.* 2009).

O gênero *Ulvopsis*, atualmente considerado sinônimo de *Monostroma*, foi descrito como possuindo reprodução sexual, apresentando alternância de gerações heteromórficas com gametófitos macroscópicos e esporófitos microscópicos, além de ontogenia do talo do tipo DSL (Gayral 1964; Figura 2c).

No gênero *Gayralia*, apenas a reprodução assexual é conhecida (Figura 2d). A alga macroscópica laminar libera zooides biflagelados que germinam novamente num indivíduo macroscópico laminar [Tatewaki 1969, Cordeiro-Marino *et al.* 1993 (como *Ulvaria* e *Monostroma*), Braga *et al.* 1997 (como *Ulvaria* e *Monostroma*), Pellizzari *et al.* 2013].

No gênero *Protomonostroma* apenas a reprodução assexual é conhecida, porém há alternância de duas gerações heteromórficas (Figura 2e): a fase macroscópica laminar libera zooides quadriflagelados que, após a germinação desenvolvem-se em um cisto unicelular microscópico que, por sua vez, supõe-se que libera zooides quadriflagelados que germinam na fase macroscópica laminar (Tatewaki 1969).

Apesar de grande avanço nos estudos taxonômicos de macroalgas verdes monostromáticas ainda há muitas divergências, pois os táxons possuem morfologia semelhante e a sua distinção é geralmente realizada através do estudo da ontogenia e histórico de vida. Entretanto, a descrição dos gêneros a partir da ontogenia também não é conclusiva, pois há uma grande variedade de estratégias reprodutivas e uma provável perda da capacidade de reprodução sexuada também é comumente relatada (Cordeiro-Marino *et al.* 1993, Bast *et al.* 2009,

Pellizzari *et al.* 2013). Assim, o uso de marcadores moleculares, tais como o gene nuclear que codifica o espaçador interno transcrito do rDNA (ITS) e os genes plastidiais que codificam o fator de alongação Tu (*tufA*) e a enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (*rbcL*), tem se mostrado uma ferramenta de auxílio à taxonomia das MVM (Saunders & Kucera 2010, Pellizzari *et al.* 2013, Du *et al.* 2014). Portanto, este trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento das espécies de macroalgas verdes monostromáticas que ocorrem principalmente no Brasil, mas também de outras espécies que ocorrem na Península Antártica e na Coreia do Sul, com base em dados morfológicos e moleculares, para possibilitar uma visão mais ampla das relações filogenéticas de MVM dentro de Ulvophyceae.

2. OBJETIVOS

- I. Conhecer a diversidade de macroalgas verdes monostromáticas que ocorrem no Brasil com base em morfologia aliada a dados moleculares;
- II. Selecionar os caracteres morfológicos diagnósticos para a diferenciação dos táxons encontrados;
- III. Avaliar as relações filogenéticas das macroalgas verdes monostromáticas baseando-se em diferentes marcadores moleculares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coletas e processamento das amostras

As amostras foram coletadas entre junho e outubro de 2019, nos estados do Ceará, Bahia e São Paulo. Adicionalmente, para uma melhor compreensão da filogenia das macroalgas verdes monostromáticas, espécimes coletados na Península Antártica, em 2015, e na Coreia do Sul, em 2019 e 2021, também foram incluídos no estudo. Detalhes dos locais de coleta, datas e coletores das amostras estão descritos na Tabela 2. As coletas foram realizadas manualmente com o uso de uma espátula metálica, buscando conservar o apressório, e as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados. Todo o material coletado foi levado ao Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), São Paulo. As siglas dos herbários estão de acordo com Thiers (2022). Após serem limpas, porções do talo foram desidratadas em sílica gel para estudos moleculares e o restante foi mantido seco para os estudos morfológicos.

Tabela 2. Espécies de macroalgas verdes monostromáticas com sequências produzidas; Coletas, depósito e marcadores sequenciados.

Taxa	Voucher	Data e local	Amostras	Coletores	N° de acesso GenBank/ código		
					ITS	rbcL -5P	tufA
<i>Gayralia brasiliensis</i>	SP470472	18/07/2019, Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo, Brasil	4	H.R. Fragoso & L.P. Soares	RE3		MW242795
	SP514093	24/02/2021, Praia das Cigarras, São Sebastião, São Paulo, Brasil.	1	L.P. Soares	CI1		
	SP514086	04/06/2019, Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo, Brasil	1	H.R. Fragoso & M.T. Fujii			RE1
	SP514087	18/07/2019, Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo, Brasil	18	H.R. Fragoso & L.P. Soares			RE8
	SP514085	18/07/2019, Praia do Lamberto, Ubatuba, São Paulo, Brasil	17	H.R. Fragoso & L.P. Soares			IO1
	SP514090	07/07/2019, Estuário de Maraú, Itacaré, Bahia, Brasil	3	M.T. Fujii			BA1
	SP514091	07/07/2019, Estuário de Maraú, Itacaré, Bahia, Brasil	3	M.T. Fujii			BA2
	SP514088	26/10/2019, Cananéia, Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil	11	H.R. Fragoso & L.P. Soares			IC1
	SP514089	26/10/2019, Cananéia, Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil	1	H.R. Fragoso & L.P. Soares			PO2
	SP514092	30/06/2019, Praia de Flecheiras, Trairi, Ceará, Brasil	1	L.P. Soares			CE1
<i>Gayralia oxysperma</i>	SP470475	15/09/2019, Rio Lagoinha, Ubatuba, São Paulo, Brasil	5	M.T. Fujii	M2		MW242794
	SP470473	04/06/2019, Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo, Brasil	2	H.R. Fragoso & M.T. Fujii		MW242792	
	SP470474	18/07/2019, Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo, Brasil	2	H.R. Fragoso & L.P. Soares			MW242796 MW242793
<i>Monostroma nitidum</i>	SP514094	06/05/2019, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	23	M.T. Fujii	CO1		CO1
	NIBRCL000 0115738	29/05/2021, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	1	E.H. Bae	D1		D1
	NIBRCL000 0115739	29/05/2021, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	1	E.H. Bae	D2		D2
	NIBRCL000 0115740	29/05/2021, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	1	E.H. Bae	D3		D3

	NIBRCL000 0115741	29/05/2021, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	1	E.H. Bae	D4	D4
	NIBRCL000 0115742	29/05/2021, Chaeseokgang, Buan-gun, Jeollabuk-do, Coreia do Sul	1	E.H. Bae	D5	D5
<i>Monostroma harii</i>	SP514095	08/01/2015, Demay, Ilha do Rei George, Península Antártica	3	B.B. Souza	AT1	
	SP514096	20/01/2015, Baía de Dorian, Ilha Wiencke, Península Antártica	2	B.B. Souza	AT4	

(-) Não consta.

3.2. Estudos morfológicos

As amostras coletadas foram analisadas minuciosamente sob estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000-C), para observar a presença de epífitas, o aspecto geral do talo, estruturas de fixação e presença de estruturas reprodutivas. Cortes anatômicos à mão livre foram realizados com o auxílio de lâmina de aço para observação da estrutura interna sob microscópio óptico (Zeiss Primo Star). As imagens foram obtidas com câmera digital (Canon IXUS 185) diretamente acoplada ao estereomicroscópio e ao microscópio óptico. As exsicatas foram depositadas no Herbário Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo (SP) do Instituto de Pesquisas Ambientais, em São Paulo. A nomenclatura dos táxons seguiu Guiry & Guiry (2022).

3.3. Estudos moleculares

3.3.1. Extração de DNA: Porções limpas e livres de epífitas do talo desidratado foram selecionadas sob estereomicroscópio e maceradas no homogeneizador de tecidos (Precellys®, Bertin Instruments, França). Em seguida, a extração do DNA genômico total foi realizada com o uso do kit de extração de tecidos vegetais “NucleoSpin Plant II Kit” (Machery-Nagel, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Aliquotas de DNA foram armazenadas no freezer a -22°C.

3.3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento dos marcadores moleculares: O DNA extraído foi utilizado na amplificação de marcadores selecionados com base na quantidade de sequências disponíveis no *GenBank*, sendo esses: 1) ITS - espaçador interno transcrito do rDNA, incluindo ITS1 (separa as subunidades ribossomais 18S e 5.8S), gene 5.8S e ITS2 (separa as subunidades ribossomais 5,8S e 26S); 2) *tufA* - gene plastidial que codifica o fator de alongação Tu (media a entrada de um aminoacil-tRNA ao sítio receptor do ribossomo durante a síntese proteica) e 3) *rbcL*-5P – porção 5’ do gene plastidial que codifica a subunidade grande da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo). Os marcadores foram amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com as condições descritas em Saunders & Kucera (2010, Tabela 3), e com o uso de *primers* específicos para cada região a ser amplificada (Tabela 4).

Tabela 3. Etapas dos ciclos de PCR utilizados na amplificação dos marcadores selecionados. O número de ciclos se refere às etapas de desnaturação, anelamento e extensão.

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>tufA</i>	94°C por 4'	94°C por 1'	45°C por 30''	72°C por 1'	72°C por 7'
	38 ciclos				
<i>rbcL</i> - 5P	95°C por 2'	93°C por 1'	54°C por 45''	72°C por 2'	72°C por 7'
	35 ciclos				
ITS	94°C por 3'	94°C por 30''	54°C por 40''	72°C por 1'30''	72°C por 7'
	38 ciclos				

Tabela 4. Marcadores moleculares analisados e respectivos *primers* utilizados na PCR e sequenciamento.

Marcador	Primer	Sequência 5' → 3'	Referência
<i>tufA</i> (807bp)	<i>tufA</i> 'F	TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC	Famà <i>et al.</i> (2002)
	<i>tufA</i> 'R	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC	Famà <i>et al.</i> (2002)
<i>rbcL</i> - 5P (559bp)	<i>GrbcL</i> 'nF	GCTGGWGTAAGATTAYCG	Saunders & Kucera (2010)
	<i>GrbcL</i> 'R	TCACGCCAACGCATRAASGG	Saunders & Kucera (2010)
ITS (620bp)	18S1763'F	GGTGAACCTGCGGAGGGATCATT	Hayden <i>et al.</i> (2003)
	G4'R	CTTTTCCTCCGCTTATTGATATG	Harper & Saunders (2001)
	JO6'R	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	Lindstrom & Hanic (2005)

A amplificação dos marcadores foi realizada com o uso do GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Estados Unidos) e/ou do ilustra™ PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), em um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas no termociclador C1000 Touch (Biorad, Califórnia, EUA). Em seguida, alíquotas de 4 µL dos produtos da PCR foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com GelRed® (Biotium, Califórnia, EUA) e com marcador de tamanho conhecido (1kb DNA Ladder, Invitrogen®), para verificar o tamanho e a quantidade dos fragmentos amplificados, bem como checar a ausência de organismos contaminantes. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado através de comparação visual, em eletroforese de gel de agarose 0,7%. Os produtos purificados com sucesso foram submetidos a reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e em seguida precipitados seguindo as instruções do fabricante. Por fim, as amostras foram sequenciadas comercialmente no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco

(Universidade de São Paulo), em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems), com os “primers” utilizados na PCR.

3.3.3. Alinhamento de sequências: As sequências obtidas para os três marcadores, nas direções direta e reversa, foram alinhadas e editadas manualmente no programa BioEdit versão 7.2.6.1 (Hall 1999) para a obtenção das sequências consenso de cada amostra. Os cromatogramas foram checados visualmente para verificar a presença de nucleotídeos ambíguos e as inconsistências foram manualmente corrigidas. Os *primers* foram retirados das sequências, quando sua identificação foi possível. A identidade molecular dos táxons estudados foi previamente checada com o auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* da plataforma do *The National Center for Biotechnology Information* (BLAST, Altschul *et al.* 1997).

3.3.4. Análises filogenéticas: Sequências adicionais de representantes das ordens Ulotrichales e Ulvales foram importadas do *GenBank* (Benson *et al.* 2018, tabela 5) e adicionadas às matrizes de cada marcador, contendo as sequências geradas neste trabalho para construir os alinhamentos finais. Quando possível, sequências das espécies tipo e/ou da localidade tipo foram selecionadas e indicadas nas análises filogenéticas. As sequências foram alinhadas múltiplas vezes com o programa *online* MAFFT versão 7 (Kato & Standley 2013). Os valores de divergência genética foram estimados usando as distâncias genéticas pareadas, não corrigidas (p-distance) conforme implementado no programa MEGA X (Kumar *et al.* 2018). As reconstruções filogenéticas foram realizadas usando análise de máxima verossimilhança (ML) no programa RAxML v8.2.X em uma sessão do Windows PowerShell (Stamatakis 2014) com 1000 réplicas de *bootstrap*, para avaliar a confiabilidade das topologias (Felsenstein 1985). Membros do gênero *Caulerpa* J.V.Lamouroux (ordem Bryopsidales) foram selecionados como grupo externo para todos os marcadores. Os modelos de substituição de nucleotídeos mais adequados, selecionados com o programa jModelTest v2.1.10 (Darriba *et al.* 2012, Guindon & Gascuel 2003), foram GTR+GAMMA para ITS e *rbcL*-5P, e GTR+GAMMA+I para *tufA*. As árvores foram visualizadas com o auxílio do programa FigTree v.1.4.4 (Rambaut 2018).

Tabela 5. Sequências importadas do *GenBank* para as análises filogenéticas.

Espécie	País	Voucher	Nº de acesso <i>GenBank</i>		Referência
			ITS	<i>tufA</i> <i>rbcL</i>	
<i>Blidingia minima</i>	Japão	NIES-1837		MG721599	Fang <i>et al.</i> 2018
<i>Capsosiphon sp</i>	Antártica	MLG_0523		MN145919	Dubrasquet <i>et al.</i> 2021
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	Índia	CSIR-CSMCRI 645	JQ745718	JQ745704	Kazi <i>et al.</i> 2013
<i>Caulerpa racemosa</i>	Japão	-		AB038486	Hanyuda <i>et al.</i> 2000
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>macrophysa</i>	Índia	CSIR-CSMCRI 20101230003	JQ745722	KC153520	Kazi <i>et al.</i> 2013
<i>Caulerpa taxifolia</i>	Itália	PhL249		MF172076	Miladi <i>et al.</i> 2018
<i>Chlorothrix sp.</i>	Canadá	C167	AY653740		Lindstrom & Hanic 2005
<i>Fernandinella sp.</i>	-	Lukesova F4		MF000596	Škaloud <i>et al.</i> 2018
<i>Gayralia brasiliensis</i>	Brasil	SPF56198	KC143762		Pellizzari <i>et al.</i> 2013
<i>Gayralia sp.</i>	EUA	ALC-2011 isolate 06969		JF680967	Carlile <i>et al.</i> 2011.
<i>Gayralia sp.</i>	Tanzânia	SPF57055	KC143771		Pellizzari <i>et al.</i> 2013
<i>Gayralia oxysperma</i>	-	-		AF387112	Não publicado.
	Canadá	GWS004830		HQ610252 HQ603384	Saunders & Kucera 2010
	Índia	-	JF918550		Gupta <i>et al.</i> 2015
	Austrália	-	AY016306		Woolcott & King 1998
	Brasil	SPF56197	KC143758		Pellizzari <i>et al.</i> 2013

<i>Gloeotilopsis planctonica</i>	República Tcheca	SAG 29.93		AF499681	Hayden & Waaland 2002
<i>Hazenian mirabilis</i>	EUA	SAG 1.87	HF570953		Škaloud <i>et al.</i> 2013
<i>Helicodictyon planctonicum</i>	EUA	UTEX LB1570		KM464721	Fučíková <i>et al.</i> 2014
<i>Kornmannia leptoderma</i>	Dinamarca	HCOP19		MH720542	Steinhagen <i>et al.</i> 2019
	Alemanha	S_334		MG944400	Weinberger <i>et al.</i> 2019
	EUA	isolate DNAS-1E7-197440		MH230065	Não publicado.
	Canadá	WTU344784		AF499677	Hayden & Waaland 2002
<i>Kraftionema allantoideum</i>	Austrália	-		KX268524	Wetherbee & Verbruggen 2016
<i>Monostroma angicava</i>	Antártica	A-GW2014030903		MG646366	Não publicado.
	China	A-GW2014030903	MG572118		Não publicado.
<i>Monostroma arcticum</i>	China	TWL-20110412-1	KC411873		Du <i>et al.</i> 2014
<i>Monostroma grevillei</i>	Alemanha	S_624		MH538599	Steinhagen <i>et al.</i> 2019
	China	-		JN093111	Lin <i>et al.</i> 2013
	Irlanda	MonA1	AF499456		Blomster <i>et al.</i> 2002
	Reino Unido	-	GU062560	GU183089	Bast <i>et al.</i> 2015
<i>Monostroma sp.1 grevillei</i>	Canadá	GWS003763		HQ610256	Saunders & Kucera 2010
	EUA	GWS003588		HQ610255	Saunders & Kucera 2010
<i>Monostroma sp.2 grevillei</i>	Canadá	GWS003787		HQ610261	Saunders & Kucera 2010

	EUA	GWS003626	HQ610262	Saunders & Kucera 2010
<i>Monostroma hariotii</i>	Antártica	ANT_2004-2	MK507414	Dubrasquet <i>et al.</i> 2021
<i>Monostroma kuroshiense</i>	Japão	SAP108019	GU062561	Bast <i>et al.</i> 2015
<i>Monostroma latissimum</i>	Japão	strain KUM 1	EU664977	Bast <i>et al.</i> 2015
<i>Monostroma nitidum</i>	-	-	AF415170	Não publicado.
	-	-	AF387110	Não publicado.
	Japão	-	AF499680	Hayden & Waaland 2002
	Japão	-	AF163111	Woolcott <i>et al.</i> 2000
<i>Monostroma</i> sp.	Canadá	SCL16806	MZ401486	Lindstrom <i>et al.</i> 2021
<i>Planophila laetevirens</i>	Itália	SAG 2008	AJ416102	Friedl & O'Kelly 2002
<i>Planophila</i> sp.	Costa Rica	SAG 32.98	MF000595	Škaloud <i>et al.</i> 2018
<i>Protomonostroma</i> sp.	Antártica	MLG_0234A	MN145889	Dubrasquet <i>et al.</i> 2021
<i>Protomonostroma undulatum</i>	Canadá	GWS003761	HQ610274	Saunders & Kucera 2010
	EUA	GWS002668	HQ610275	Saunders & Kucera 2010
	EUA	-	DQ821517	Hanic & Lindstrom 2008
	EUA	UBC A93898	MZ413899	Lindstrom <i>et al.</i> 2021
	Canadá	MAL_445	MZ401485	Lindstrom <i>et al.</i> 2021
<i>Rhexinema paucicellulare</i>	República Tcheca	CCAC 3283B	MF000601	Fučíková <i>et al.</i> 2014

	República Tcheca	SAG 8.90	MF034601		Darienko & Proeschold 2017	
<i>Rhexinema</i> sp.	Suíça	SAG 466-2		MF000600	Fučíková <i>et al.</i> 2014	
<i>Sarcinofilum mucosum</i>	EUA	SAG 24.93		MF000597	Škaloud <i>et al.</i> 2018	
	EUA	SAG 24.93	MF034649		Darienko & Proeschold 2017	
<i>Ulothrix flacca</i>	Noruega	2016_BIO309A_86		MN184608	Bringloe <i>et al.</i> 2019	
<i>Ulothrix</i> sp. X1	EUA	-	DQ821515		Hanic & Lindstrom 2008	
<i>Ulothrix</i> sp. X3	EUA	-	DQ821516		Hanic & Lindstrom 2008	
<i>Ulothrix zonata</i>	Japão	NIES-537		MG721891	MG721865	Fang et al. 2018
	EUA	UTEX 745		AY454424		O’Kelly <i>et al.</i> 2004
	República Tcheca	SAG 38.86			AF499683	Hayden & Waaland 2002
<i>Ulva chaugulii</i>	Índia	CAL/ALG./029	KT429218		Kazi <i>et al.</i> 2013	
<i>Ulva compressa</i>	China	RZ-20111206-2	KC411878		Du <i>et al.</i> 2014	
<i>Ulva intestinalis</i>	Alemanha	S_381		MH538534		Steinhagen <i>et al.</i> 2019
	Reino Unido	isolate UI_LM_F1			MF038885	Ghaderiardakani <i>et al.</i> 2017
<i>Ulva lactuca</i>	Canadá	GWS005842		HQ610365		Saunders & Kucera 2010
	Japão	SAP:095076			AB097623	Shimada <i>et al.</i> 2003
<i>Ulva laetevirens</i>	China	JZW-20111118-5	KC411866		Du <i>et al.</i> 2014	
<i>Ulva rigida</i>	Irlanda	GALW0015523			EU484408	Loughnane <i>et al.</i> 2008

<i>Ulvaria splendens</i>	Japão	SAP:095049	AB097637	AB097611	Shimada <i>et al.</i> 2003
	Japão	KU-d13936	LC507159	LC507139	Kawai <i>et al.</i> 2021
<i>Ulvaria obscura</i>	EUA	GWS003667		HQ610426	Saunders & Kucera 2010
	Canadá	GWS037926		MH308688	Bringloe <i>et al.</i> 2020
<i>Ulvaria obscura</i> var. <i>blyttii</i>	EUA	WTU 344838	AY260571	AF499673	Hayden & Waaland 2002
	EUA	1.4MW		AY454402	O’Kelly <i>et al.</i> 2004
<i>Ulvaria</i> sp.	Canadá	GWS030975		KM255027	Saunders & Kucera 2010
<i>Urospora neglecta</i>	Canadá	SCL17354		MZ401487	Lindstrom <i>et al.</i> 2021
<i>Urospora penicilliformis</i>	Canadá	strain Donna 6	AY476811		Lindstrom & Hanic 2005
<i>Urospora wormskioldii</i>	Canadá	GWS006374		HQ610441	Saunders & Kucera 2010
<i>Vischerioclodium submersum</i>	EUA	UTEX 1913	MF000586	MF000599	Škaloud <i>et al.</i> 2018

(-) Não consta.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos moleculares

Um total de 30 sequências foram geradas neste trabalho, sendo dezoito de *tufA* (583-860 bp), onze de ITS (571-682 pb) e uma de *rbcL*-5P (587 pb). Quatro entidades taxonômicas distintas e previamente identificadas como *Gayralia oxysperma* (n = 5) e *Gayralia brasiliensis* (n = 11) no Brasil, *Monostroma hariatii* Gain (n = 2) na Península Antártica e *Monostroma nitidum* (n = 9) na Coreia do Sul foram incluídas nas análises filogenéticas.

4.1.1. Marcador plastidial *tufA*: O conjunto final de dados incluiu 57 sequências com 842 pb. Foram obtidas sequências para espécimes morfológicamente identificados como *Gayralia oxysperma* (n = 3), *G. brasiliensis* (n = 9) e *Monostroma nitidum* (n = 6). A filogenia de *tufA* (Figura 3) resolveu *G. oxysperma* do Brasil (n = 3) em um clado bem suportado (BS = 99) com um espécime do Canadá (HQ610252) e amostras previamente identificadas como *Kornmannia leptoderma* da Alemanha (MG944400) e Dinamarca (MH720542), com uma divergência intraespecífica variando de 0,0 a 0,7%. *Gayralia oxysperma* formou um clado irmão com um subclado que incluiu *G. brasiliensis* e *M. nitidum*, com total suporte filogenético (BS = 100). As amostras de *G. brasiliensis* do Brasil (n = 9) formaram um clado (BS = 70), com um espécime não identificado de *Gayralia* do Havaí, EUA (JF680967), apresentando divergência intraespecífica de 0,0 a 0,2%, sugerindo tratar-se de um mesmo táxon. As amostras provenientes da Coreia do Sul, morfológicamente identificadas como *Monostroma nitidum* (n = 6) foram agrupadas em um clado com alto suporte (BS = 99), irmão de *G. brasiliensis*. A divergência genética interespecífica total dentro do clado contendo *G. brasiliensis*, *G. oxysperma* e *M. nitidum* variou de 1,0% (entre *G. brasiliensis* e *M. nitidum*) a 7,0% (entre *G. brasiliensis* e *G. oxysperma*).

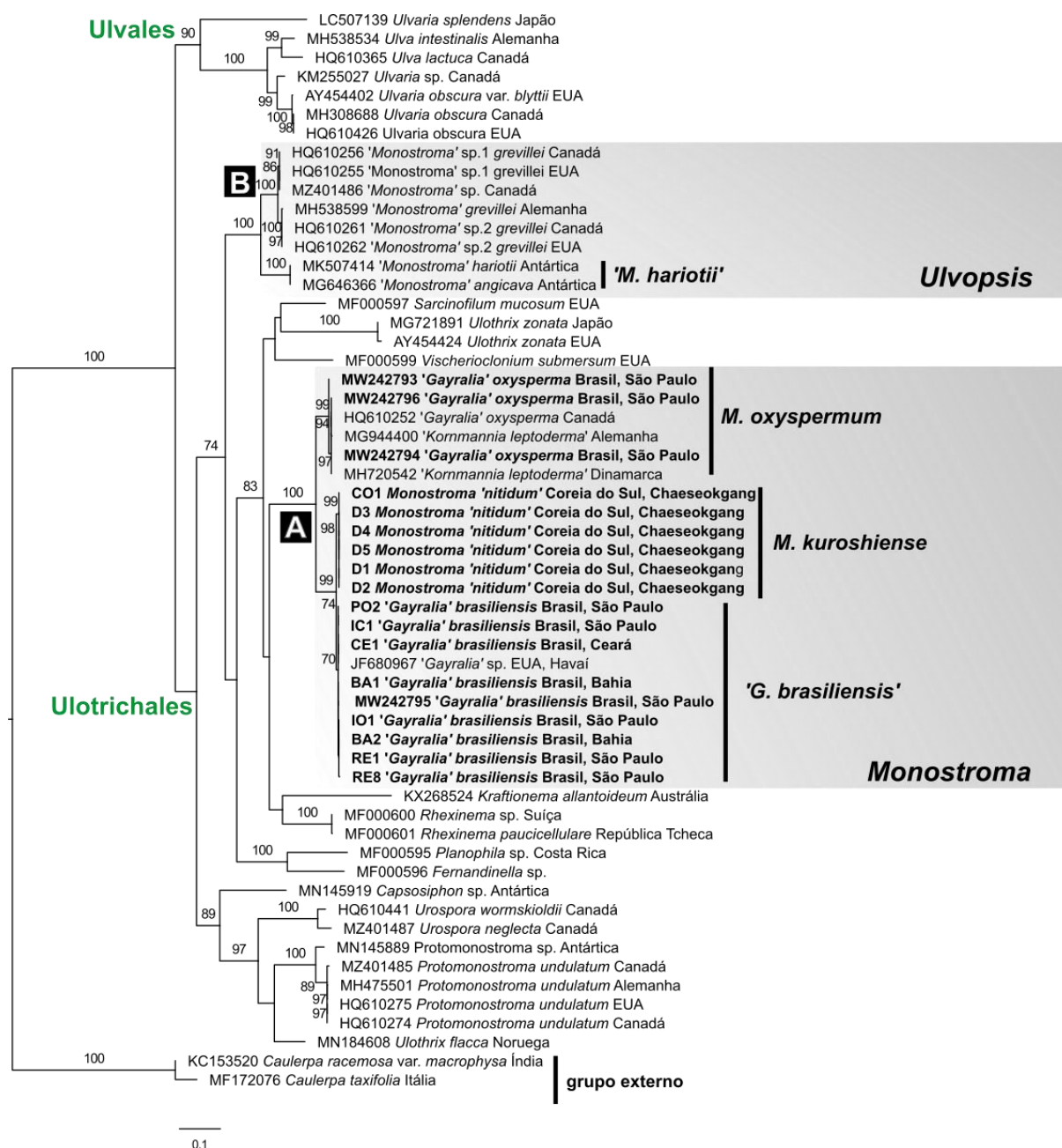


Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do marcador plastidial *tufA* de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. (A) Clado do gênero *Monostroma*. (B) Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.

4.1.2. Marcador plastidial *rbcL*-5P: O alinhamento final incluiu 22 sequências com 571 pb. Apesar de inúmeras tentativas com diversas combinações de *primers*, não foi possível obter sequências para as demais amostras. A filogenia de *rbcL* (Figura 4) agrupou o espécime de *G. oxysperma* de São Paulo ($n = 1$) em um clado totalmente suportado (BS = 100) com um espécime da Colúmbia Britânica, Canadá (HQ603384) e uma amostra identificada como *Kormmannia leptoderma* proveniente de Nova York, EUA (MH230065). Não foi observada variação intraespecífica em *G. oxysperma*. Além disso, esse clado formado por amostras do

oceano Atlântico e Pacífico foi irmão de *Monostroma nitidum* do Japão (AF499680), com alto suporte (BS = 99). A divergência genética entre *G. oxysperma* e *M. nitidum* variou entre 2,2 e 2,6%.

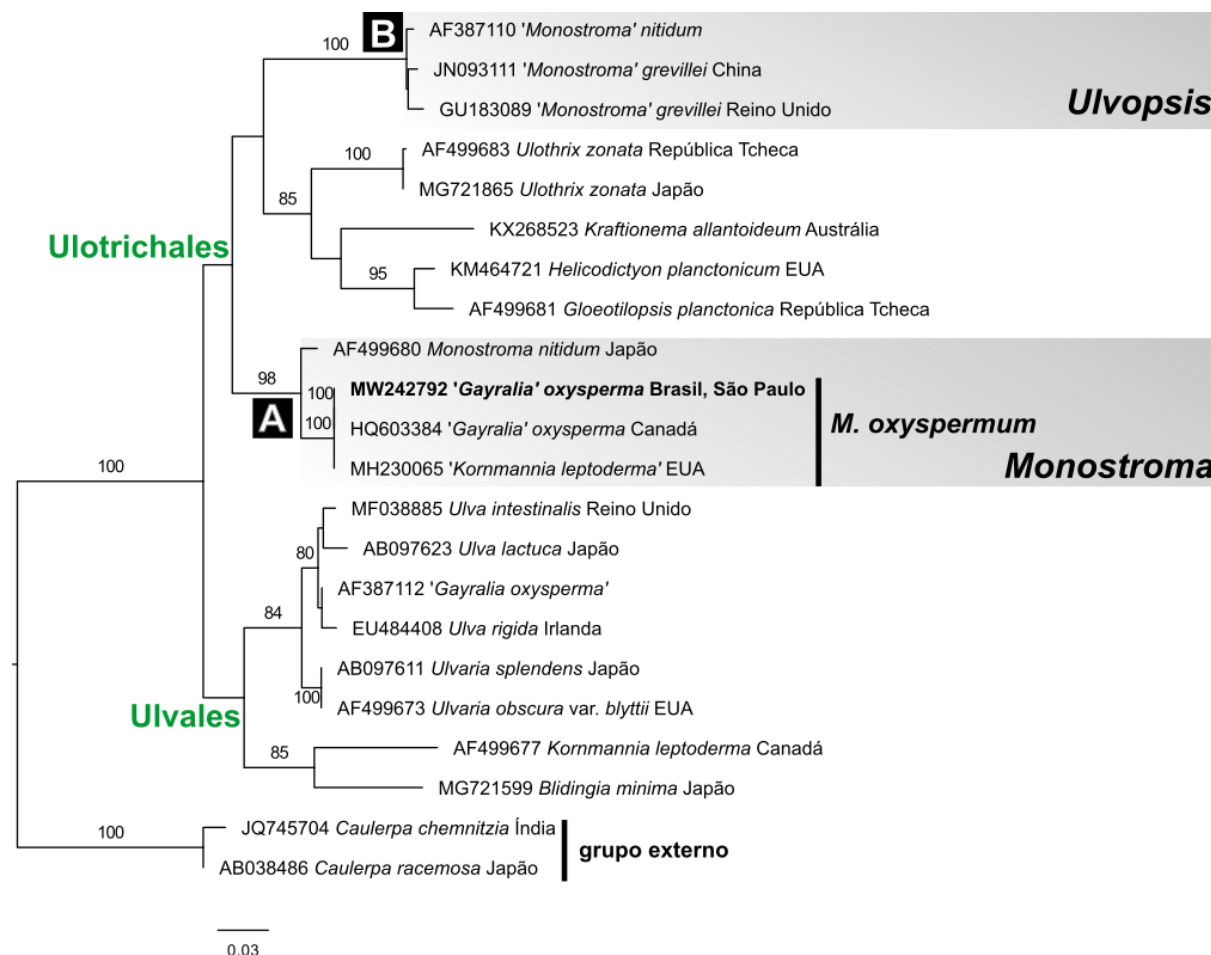


Figura 4. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do marcador plastidial *rbcL*-5P de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. (A) Clado do gênero *Monostroma*. (B) Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.

4.1.3. Marcador nuclear ITS: O conjunto de dados final incluiu 41 sequências com 755 pb. *Gayralia brasiliensis* (n = 2) de São Paulo (Ilha do Cardoso e Rio Escuro) formou um subclado com alto suporte (BS = 99), juntamente com o holótipo da espécie (KC143762) e um espécime identificado como *G. oxysperma* da Índia (JF918550), com distância genética de 0,2-0,5% (Figura 5). O espécime de *G. oxysperma* (n = 1) coletado em São Paulo (Lagoinha) formou um subclado com alto suporte (BS = 93) com *G. oxysperma* da Austrália (AY016306), juntamente com uma amostra do Paraná, Brasil, (KC143758), com uma divergência intraespecífica de 0,4%. As amostras provenientes da Coreia do Sul identificadas como *M. nitidum* (n = 3) foram agrupadas em um subclado com suporte moderado (BS = 79) em um clado que contém o holótipo de *M. kuroshiense* do Japão (GU062561) e um espécime japonês

identificado como *M. latissimum* (EU664977). A divergência genética entre *M. nitidum*, *M. kuroshiense* e *M. latissimum* foi 0,5-1,0%, indicando que correspondem a uma única espécie. Dessa forma, esses espécimes são tratados neste trabalho como *M. kuroshiense* e a prévia identificação das amostras da Coreia do Sul como *M. nitidum* é equivocada. Para a espécie *M. hariatii* da Península Antártica (Ilha Rei George e Ilha Wiencke) foram geradas duas sequências idênticas, as quais agruparam em um clado com suporte máximo (BS = 100) com uma amostra identificada como *M. angicava* da Ilha Rei George (MG572118), localidade tipo de *M. hariatii*, com uma divergência intraespecífica de 0,0-0,9%.

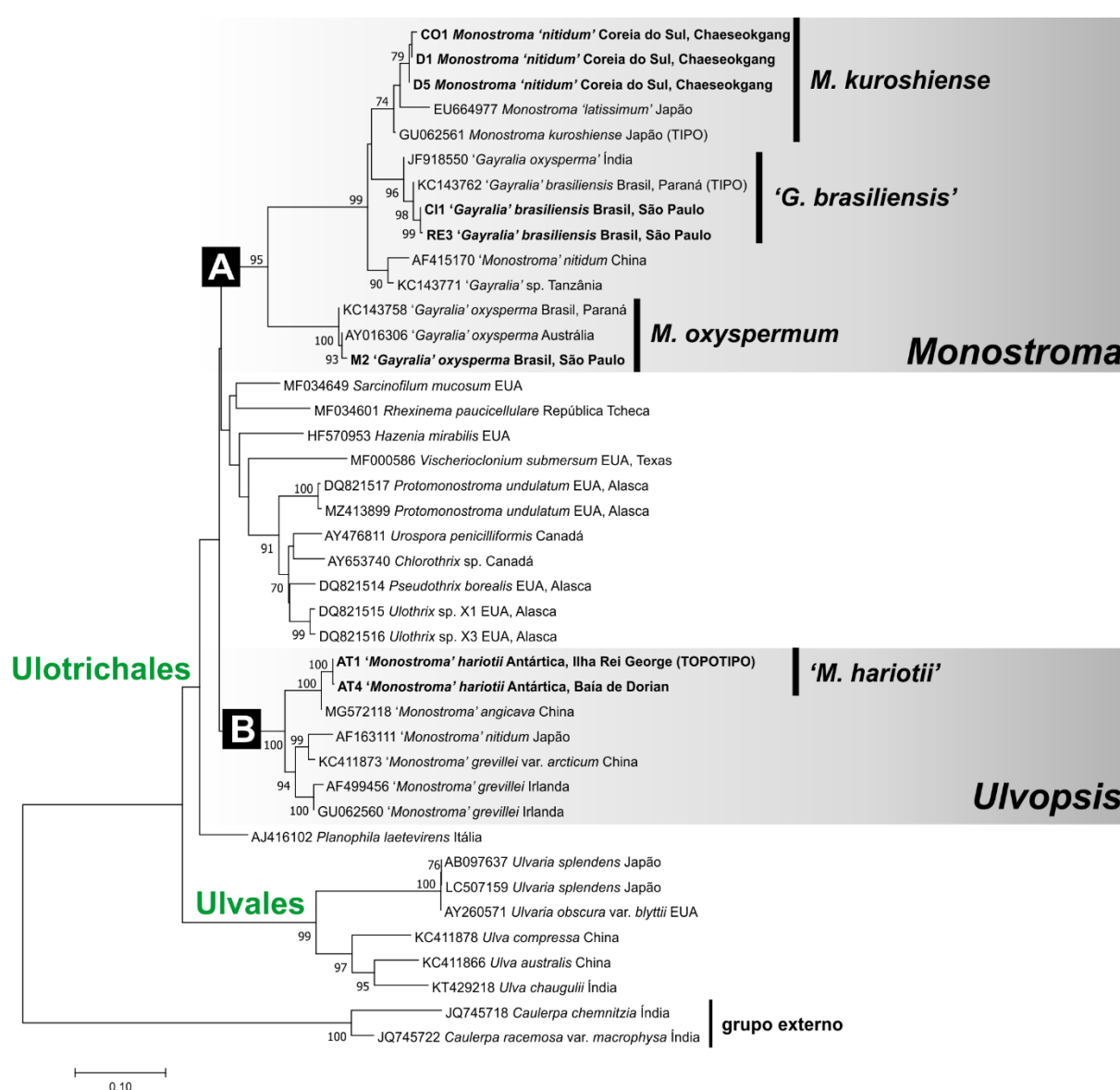


Figura 5. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do marcador nuclear ITS de representantes das ordens Ulvales e Ulotrichales. **(A)** Clado do gênero *Monostroma*. **(B)** Clado do gênero *Ulvopsis*. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores de suporte para 1000 réplicas de *bootstrap*. Somente valores ≥ 70 são exibidos. Sequências em negrito foram geradas no presente trabalho.

As três filogenias demonstraram algumas inconsistências nas identificações com base em dados morfológicos. Por exemplo, as amostras analisadas neste trabalho que foram previamente identificadas como *Monostroma hariatii* (Península Antártica) e *M. nitidum* (Coreia do Sul), que deveriam corresponder ao mesmo gênero, foram resolvidas em clados distantemente relacionados filogeneticamente. *M. hariatii* foi resolvida em um clado maior que contém outras espécies identificadas como *Monostroma*, indicado como Clado B (ITS, Figura 5); enquanto *M. nitidum* foi agrupada em outro clado juntamente com diversas espécies de *Monostroma* e *Gayralia*, indicado como Clado A (*tufA*, Figura 2; ITS, Figura 5). Esse padrão foi observado nos três marcadores e os dois clados foram devidamente indicados nas três filogenias (Figuras 3-5). O Clado A corresponde ao gênero *Monostroma* e o Clado B deve ser identificado como *Ulvopsis*. As novas combinações necessárias e outras mudanças taxonômicas serão abordadas na seção de estudos morfológicos. Os valores de divergência para os dois clados em *tufA*, ITS e *rbcL*-5P se encontram nas tabelas do Anexo.

4.2. Estudos morfológicos

As quatro espécies identificadas neste trabalho são descritas a seguir como *Gayralia brasiliensis*, *Monostroma oxyspermum*, *M. kuroshiense* e *M. hariatii*. As questões nomenclaturais são abordadas nos comentários de cada espécie. Para cada uma é apresentada uma descrição com medidas e ilustrações, material examinado e distribuição. Para as espécies que já são bem conhecidas em termos de descrições e ilustrações, apenas uma breve descrição foi fornecida.

***Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya**

Holótipo: SPF56198.

Localidade tipo: Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil.

Figura 6.

Descrição: Talo ereto, verde claro, lâminas delicadas e expandidas, com até 10 cm de comprimento e 9,5 cm de largura. Margens lisas ou irregulares, fixadas ao substrato por um pequeno apressório discoide, geralmente localizado em uma extremidade da lâmina. O apressório é formado por um aglomerado de células rizoidais originadas pela extensão das células basais do talo. Em vista superficial, células poligonais com cantos arredondados, 2,5-5,0 × 5,0-12,5 µm, geralmente dispostas em pares. Em corte transversal, talo monostromático

com células quadráticas, mais altas que largas, 20 µm de espessura e lúmen celular de 7,6-9 × 7,7-12,4 µm. Não foram observadas estruturas reprodutivas.

Habitat: Espécie encontrada em vários ambientes, crescendo em costões rochosos de ambientes marinhos, na boca de rios, nos estuários e formando grandes populações sobre os pneumatóforos de manguezais. Durante a maré baixa suporta alto grau de ressecamento.

Distribuição: Brasil: Ceará (presente trabalho), Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina (Pellizzari *et al.* 2013). Estados Unidos: Havaí.

Material analisado: Brasil, Bahia: Península de Maraú, Praia de Barra Grande (13°53'3.1"S 38°56'53.7"W), 07 de julho de 2019, M.T Fujii (SP514090, SP514091). Brasil, **Ceará:** Trairí, Praia de Flecheiras (3°13'9.2"S 39°16'10.8"W), 30 de junho de 2019, L.P. Soares (SP514092). Brasil, **São Paulo:** Ubatuba, Praia do Lamberto (23°30'1,1"S 45°7' 6,8"W), 18 de julho de 2019, H.R. Fragoso e L.P. Soares (SP514085) e 16 de outubro de 2019, H.R. Fragoso (SP514138). Ubatuba, Rio Escuro (23°29'31,1"S 45°9'50,3"W), 04 de junho de 2019, H.R. Fragoso e M.T Fujii (SP514086) e 18 de julho de 2019, H.R. Fragoso e L.P. Soares (SP470472, SP514087). Ubatuba, Rio Lagoinha (23°31'13,1"S 45°11'22,1"W), 15 de junho de 2021, M.T Fujii (SP514137), M.T Fujii. São Sebastião, Praia das Cigarras (23°43'48.8"S 45°23'58.2712"W), 24 de fevereiro de 2021, L.P. Soares (SP514093). Cananéia, Ilha do Cardoso (25° 4' 3.3"S 47°55'14.9" W), 26 de novembro de 2019, H.R. Fragoso e L.P. Soares (SP514088, SP514141). Cananéia, Porto Bacharel (25°0'56.9"S 47°55'34.9"W), 26 de novembro de 2019, H.R. Fragoso e L.P. Soares (SP514089 e SP514142).

Comentários: As características morfológicas dos exemplares analisados foram similares ao material tipo (Pellizzari *et al.* 2013), que descreveram a espécie com base em dados ontogenéticos e moleculares. É uma espécie comum no litoral de São Paulo, sendo encontrada em todas as coletas realizadas. Em campo, não é possível distingui-la de *G. oxysperma*, o que exige maior atenção durante a coleta, já que, muitas vezes, crescem simpatricamente.

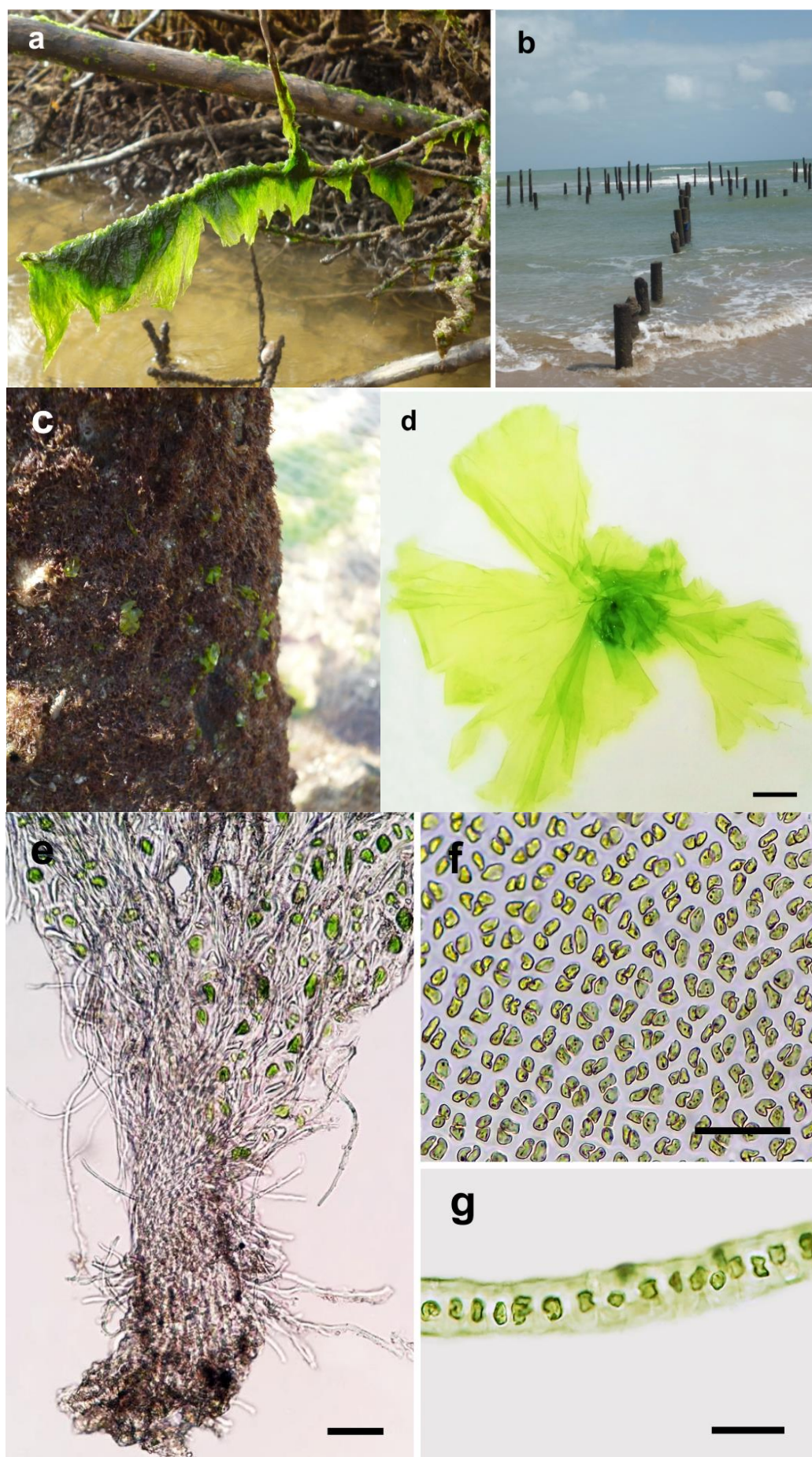


Figura 6. Morfologia de *Gayralia brasiliensis*. **(a)** Exemplos crescendo no manguezal da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo. **(b)** Ambiente marinho (Praia das Flecheiras, Ceará) onde foi coletado *G. brasiliensis*. **(c)**

Detalhe de pequenos espécimes crescendo em estacas dos currais de pesca marinha. **(d)** Aspecto geral do talo. **(e)** Porção basal do talo, mostrando células rizoidais e o apressório discoide. **(f)** Vista superficial mostrando células dispostas em pares. **(g)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Escala: d, 1 cm; e-g, 25 µm.

***Monostroma oxyspermum* (Kützinger) Doty**

Basiônimo: *Ulva oxysperma* Kützinger

Lectótipo: L 938.53.82a.

Localidade tipo: Mar Báltico, Alemanha.

Figura 7.

Descrição: Talo formando pequenos e discretos tufo de até 3 cm de comprimento, em forma de lâmina, irregularmente arredondados a lobados, fixados ao substrato por uma zona rizoidal composta por células extremamente alongadas, com até 125 µm de comprimento. Algumas dessas células podem apresentar extremidades inchadas, com a porção superior verde escura, sugerindo que podem funcionar como propágulos. Em vista superficial, lâminas com margens lisas, células poligonais a retangulares, com cantos arredondados, 6–10 × 7,5–12,5 µm, geralmente dispostas aos pares. Células com cloroplasto parietal, com um, raramente dois pirenóides centrais. Em corte transversal, talo monostromático, com 25 µm de espessura, composto por uma camada de células quadráticas mais altas que largas, com lúmen celular medindo 5–7,5 × 7,5–12,5 µm. Estruturas reprodutivas dispostas em uma margem verde-oliva amplamente fértil. Em vista superficial, células férteis irregularmente arredondadas, 5–10 µm de diâmetro. A liberação de zoóides não foi observada.

Habitat: *Monostroma oxyspermum* foi encontrada na região entremarés superior nos estuários do Rio Escuro e Rio Lagoinha, em Ubatuba, geralmente coberta por lodo e sedimentos, formando pequenos agrupamentos irregulares, como manchas, geralmente nas laterais sombreadas do substrato rochoso, associadas a espécimes de *Bostrychia* Montagne, *G. brasiliensis*, *Rhizoclonium* Kützinger e *Chaetomorpha* Kützinger. Indivíduos férteis foram observados em setembro. A espécie não foi encontrada em ambiente marinho.

Distribuição: amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas da Europa, Américas, Ásia, África e Oceania, em ambos os hemisférios (Guiry & Guiry 2022).

Material analisado: Brasil, **São Paulo:** Ubatuba, Rio Escuro (23°29'31.1"S 45°9'50.3"W), 04 de junho de 2019, H.R. Fragoso e M.T. Fujii (SP470473), 18 de julho de 2019, H.R. Fragoso e

L.P. Soares (SP470474). Ubatuba, Rio Lagoinha (23°31'13,1"S 45°11'22,1"W), 15 de setembro de 2019, M.T Fujii (SP470475).

Comentários: A espécie foi inicialmente proposta como *Ulva oxysperma* por Kützinger (1843), a partir de espécimes coletados no Mar Báltico, Alemanha. Posteriormente, a espécie foi transferida para o gênero *Monostroma* por Doty (1947), para *Ulvaria* por Bliding (1968) e para *Gayralia* por Vinogradova (1969). Com base em estudos moleculares usando o marcador ITS, Bast (2015) retornou a espécie para o gênero *Monostroma*. No presente trabalho foi adotada a proposição de Bast (2015), que também foi corroborada pelos novos dados moleculares que foram gerados para os outros marcadores plastidiais.

No Brasil, a espécie foi encontrada apenas no estado de São Paulo, crescendo nos estuários de rios, sobre os matacões cobertos por cracas e lama. A espécie possui a capacidade de se fixar inclusive sobre o substrato lamoso devido à produção de rizoides ou filamentos longos a partir das células da região basal que se entrelaçam produzindo uma zona basal de fixação, diferente daquela observada em *G. brasiliensis*, que forma um pequeno apressório como resultado da união das células basais rizoidais. Como resultado da formação de uma zona rizoidal, o talo desta espécie está sempre impregnado com lodo e grãos de areia.

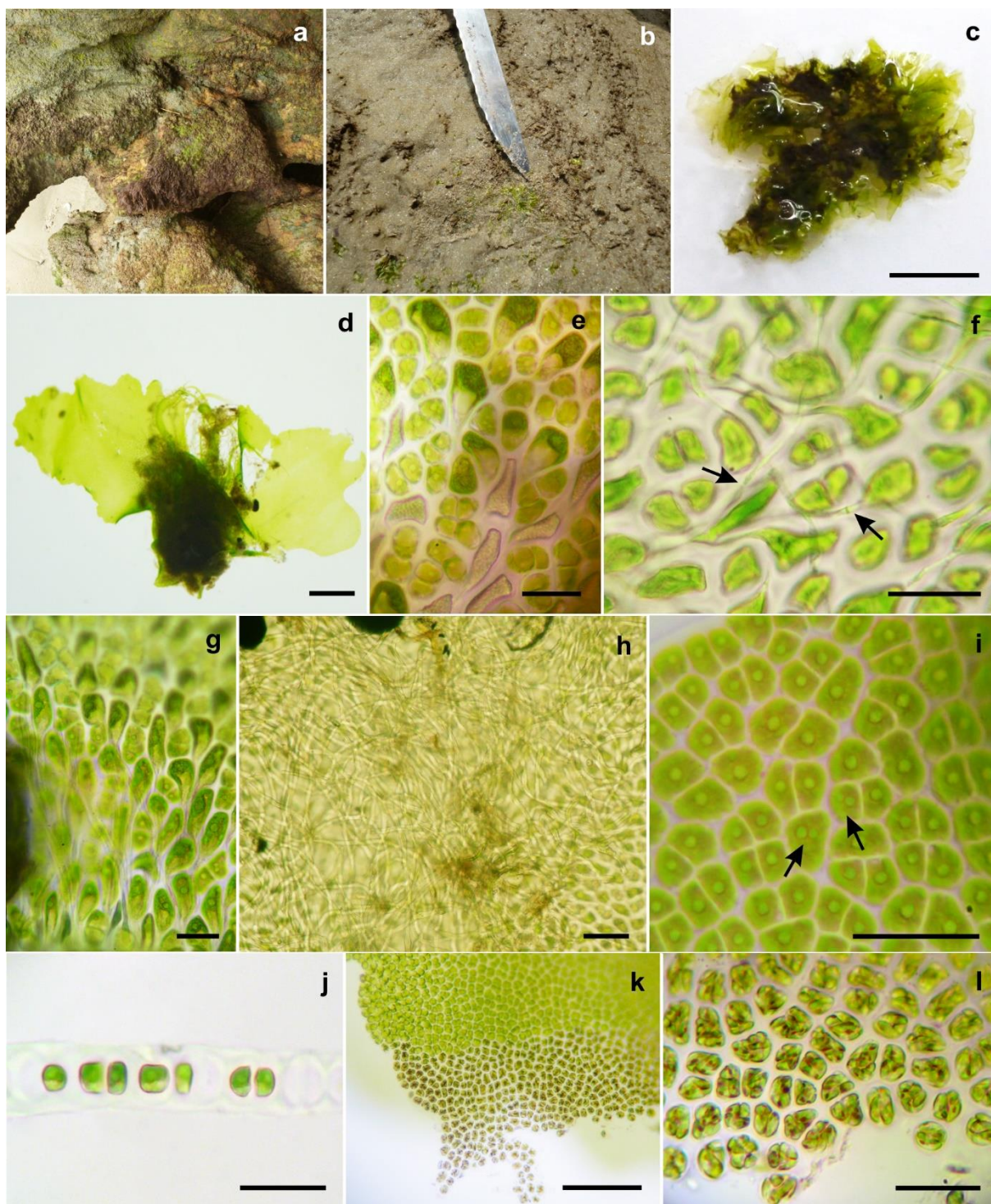


Figura 7. Morfologia de *Monostroma oxyspermum* do sudeste do Brasil. **(a)** Pequenas populações crescendo em um costão rochoso sombreado, associadas a *Bostrychia* spp. **(b)** Hábito de alguns espécimes enterrados no lodo. **(c, d)** Aspecto geral dos espécimes. Observe o aspecto intrincado das lâminas e o acúmulo de sedimentos na região de fixação ao substrato. **(e)** Porção basal do talo, mostrando o desenvolvimento inicial das células rizoidais. **(f)** Detalhe de células rizoidais inchadas com extensões multicelulares (setas). **(g)** Células rizoidais em forma de clava, extremamente alongadas. **(h)** Detalhe da região basal do talo mostrando a massa de filamentos rizoidais bem desenvolvidos. **(i)** Vista superficial do talo mostrando células com 2 pirenóides (setas). **(j)** Corte transversal mostrando a estrutura monostromática. **(k)** Vista superficial mostrando a zona da lâmina reprodutiva, na cor verde-oliva. **(l)** Detalhe das células férteis em vista superficial. Escala: c-d, 530 µm; h, 50 µm; e-g e i-l, 25 µm.

***Monostroma kuroshiense* F. Bast**

Holótipo: SAP108021.

Localidade-tipo: Cultivo de *Monostroma* em Matsusaka, Mie Prefecture, Japão.

Figura 8.

Descrição: Talo verde-escuro a verde-claro, com lâminas expandidas pouco a profusamente recortadas, com aproximadamente 8 cm de comprimento, fixadas ao substrato por um pequeno apressório discoide. Em vista superficial, células poligonais a oblongas, $4,0\text{--}7,5 \times 5,0\text{--}10,0\text{ }\mu\text{m}$. Em corte transversal, uma camada de células ovais, com $37,5\text{ }\mu\text{m}$ de espessura e lúmen celular de $5,0\text{--}7,5 \times 2,5\text{--}7,5\text{ }\mu\text{m}$. Não foram observadas estruturas reprodutivas.

Habitat: Espécie encontrada crescendo sobre substrato rochoso na região entremarés, de região estuarina.

Distribuição: Japão (Bast 2015) e Coreia do Sul (presente trabalho).

Material analisado: Coreia do Sul, Jeollabuk-do, Buan-gun, Chaeseokgang ($35^{\circ}37'26.2''\text{N}$ $126^{\circ}27'58.7''\text{E}$), 06 de maio de 2019, M.T.Fujii, N.S.Yokoya, B.Y.Won e T.O.Cho (SP514094, SP514146) e 29 de maio de 2021, E.H. Bae (NIBRCL0000115738- NIBRCL0000115742).

Comentários: Na Coreia do Sul a espécie vem sendo identificada como *M. nitidum* com base apenas em dados morfológicos.

As plantas descritas por Bast (2015) alcançam até 30 cm de comprimento, enquanto os espécimes da Coreia do Sul apresentaram menos de 10 cm. Além disso, *M. kuroshiense* da Coreia do Sul apresentou uma evidente variação morfológica, exibindo talos com lâminas lobadas e inteiras a lâminas intensamente ramificadas e recortadas.

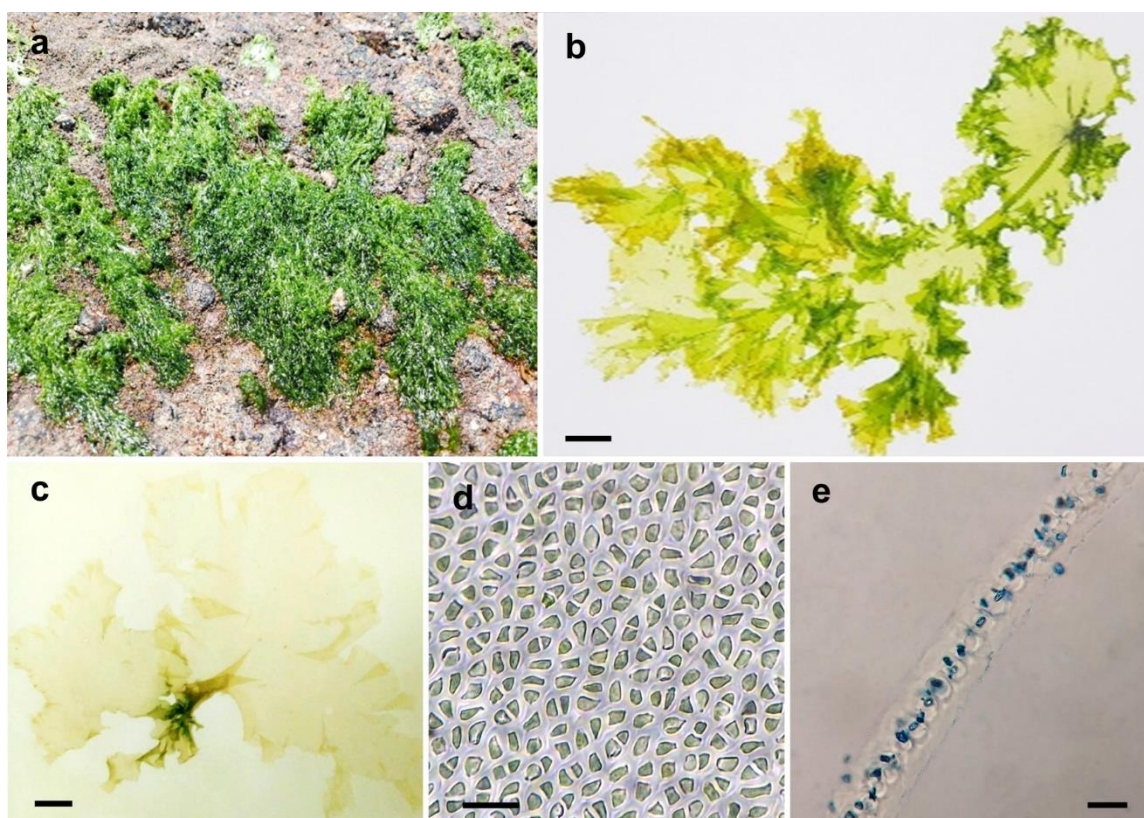


Figura 8. Morfologia de *Monostroma kuroshiense* de Chaeseokgang, Coreia do Sul. **(a)** População crescendo aderida a substrato rochoso. **(b-c)** Aspecto geral dos espécimes e suas variações morfológicas. **(d)** Vista superficial do talo, mostrando células com cantos angulares. **(e)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Escala: b-c, 1 cm; d-e, 25 μ m.

Monostroma hariotii Gain

Holótipo: Não encontrado.

Localidade-tipo: Região Antártica da América do Sul (Guiry & Guiry 2022).

Figura 9.

Descrição: Talo verde escuro, em forma de saco, não ramificado, com até 12 cm de comprimento, fixado ao substrato por um pequeno apressório discoide. Em vista superficial, células poligonais a arredondadas, muito próximas umas das outras, $7,5\text{--}10,0 \times 5,0\text{--}15,0 \mu\text{m}$. Em seção transversal, lâmina monostromática de $54,3 \mu\text{m}$ de espessura com células compactadas e alongadas com lúmen celular de $4,5\text{--}5,2 \times 21,1\text{--}24,1 \mu\text{m}$, geralmente dividida em duas partes horizontais. Não foram observadas estruturas reprodutivas.

Habitat: Espécie fixa ao substrato rochoso ou seixos na região entremarés e no infralitoral raso (Bernardi & Pellizzari 2013).

Distribuição: Argentina, Antártica, Ilhas Antárticas e Ilhas subantárticas (Guiry & Guiry 2022).

Material analisado: Península Antártica: Ilha Rei do George, Demay (62°12.1'15.4''S 58°26'28.6''W), 08 de janeiro de 2015, A. Desideri, A.P. Martins, B.B. Souza, K. Paresque, M. Graminha e R.M. Pereira (SP514095); Baía Dorian, Ilha Wiencke (64°49'4,3"S 63°30'32,6"W), 15 de janeiro de 2015, A. Desideri, A.P. Martins, B.B. Souza, K. Paresque, M. Graminha e R.M. Pereira (SP514096).

Comentários: Os espécimes examinados por Gain (1911) e Bernardi & Pellizzari (2013) apresentam uma espessura de talo menor ($25 \pm 8,8 \mu\text{m}$) do que as amostras analisadas no presente estudo ($54,3 \mu\text{m}$ de espessura). Observamos também que as células em corte transversal do talo eram alongadas e justapostas.

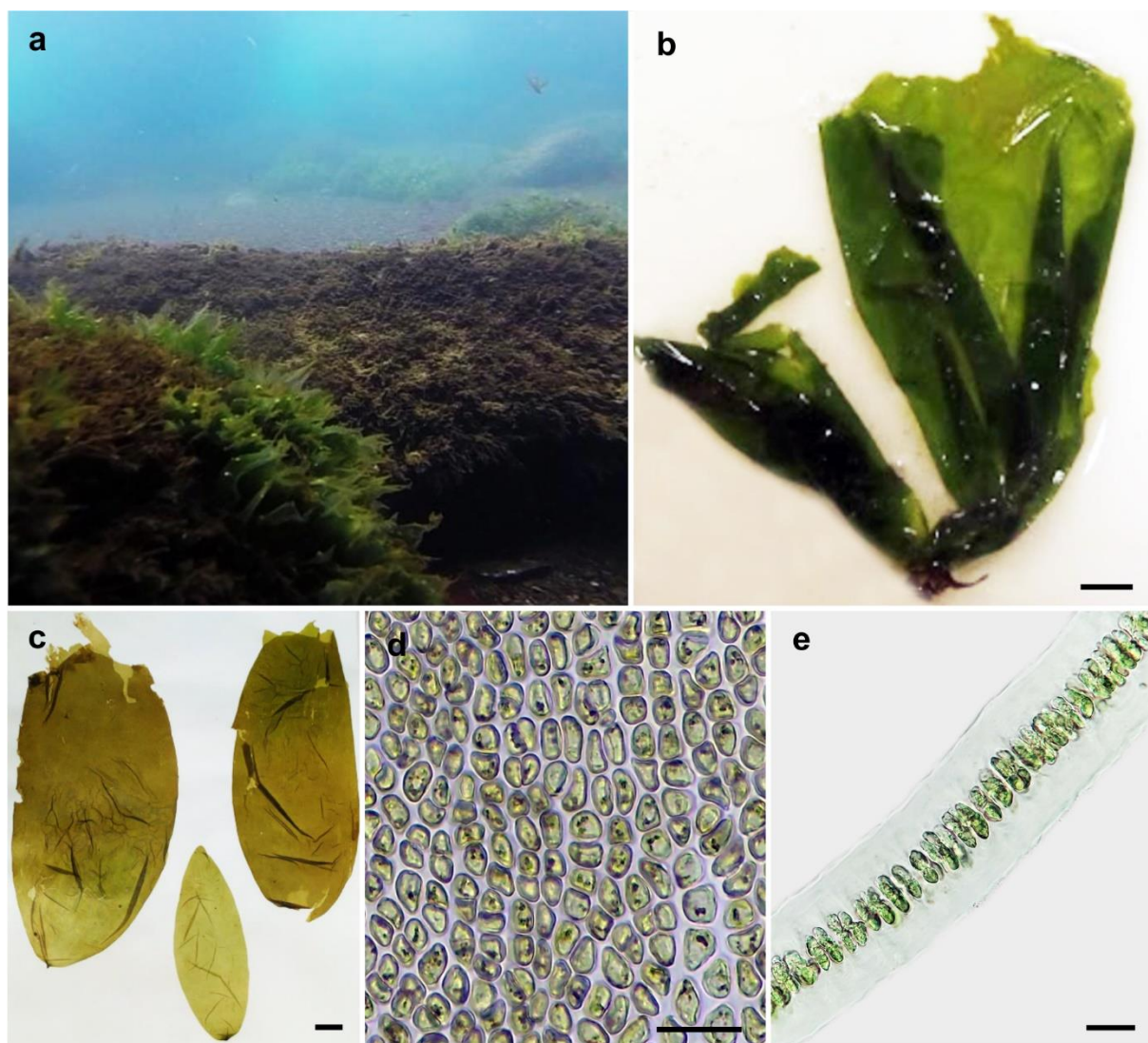


Figura 9. Morfologia de *Monostroma hariotii* da Península Antártica. **(a)** População crescendo em substrato rochoso da zona entremarés. **(b-c)** Aparência geral dos espécimes. Observe o aspecto em forma de saco do talo. **(d)** Vista superficial mostrando células próximas umas das outras. **(e)** Corte transversal mostrando o talo monostromático. Observe as células alongadas e compactadas. Escala: b-c, 1 cm; d-e, 25 μm .

5. DISCUSSÃO

Os dados moleculares gerados no presente trabalho permitiram o reconhecimento das espécies estudadas como pertencentes aos gêneros *Monostroma* (*Gayralia brasiliensis*, *M. kuroshiense*, *M. oxyspermum*) e *Ulvopsis* (*M. hariotii*). Estes gêneros apresentaram alto suporte filogenético e foram indicados como Clado A e B, respectivamente, nas filogenias dos marcadores *tufA*, *rbcL*-5P e ITS. Essa posição taxonômica foi adotada após revisão das tipificações e nomes historicamente propostos em macroalgas verdes monostromáticas.

Devido à morfologia simples das macroalgas verdes monostromáticas, estudos de ontogenia do talo e histórico de vida têm sido usados para distinguir os gêneros (Bliding 1968, Tatewaki 1969, O’Kelly *et al.* 1984, Cordeiro-Marino *et al.* 1993, Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2013). Um resumo das principais características do histórico de vida e ontogenia do talo dos gêneros de MVM é apresentado na Tabela 6. Contudo, esses caracteres nem sempre são taxonomicamente satisfatórios, pois espécies de diferentes gêneros podem ter ontogenia do talo e/ou tipo de reprodução semelhantes (Tatewaki 1969, Bast *et al.* 2009, Cordeiro-Marino *et al.* 1993, Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2013).

Tabela 6. Resumo das principais características do histórico de vida e ontogenia do talo dos gêneros de macroalgas verdes monostromáticas.

Ordem	Gênero	Histórico de vida	Nº de flagelos	“Codiolum”	Ontogenia
Ulvaes	<i>Kornmannia</i>	HS	4 e/ou 2	Não	DSL
	<i>Ulvaria</i>	IS	4 e 2	Não	FSL
	<i>Gayralia</i>	MA	2	Não	FSL, FL
Ulotrichales	<i>Monostroma</i>	HS, MA	4 e/ou 2	Sim	FSL, FL
	<i>Protomonostroma</i>	HÁ	4	Sim	FL
	<i>Ulvopsis</i>	HS, MA	4 e/ou 2	Sim	DSL, FSL, FL

Abreviações: Heteromórfico sexual (HS), isomórfico sexual (IS), heteromórfico assexual (HA), monomórfico assexual (MA), disco-saco-lâmina (DSL), filamento-saco-lâmina (FSL) e filamento-lâmina (FL).

A confusão nomenclatural que envolve *Monostroma* (Thuret 1854), *Ulvopsis* (Gayral 1964) e *Gayralia* (Vinogradova 1969) ocorre principalmente porque Vinogradova (1969), quando descreveu *Gayralia* para acomodar *M. oxyspermum*, não considerou a proposição de *Ulvopsis*, para *M. bullosum*, feita por Gayral (1964). O gênero monostromático mais diverso, *Monostroma*, foi proposto por Thuret (1854) sem designação de tipo, mas com as citações de *M. bullosum* e *M. oxycoccum* (= *M. oxyspermum*). A partir de então, ocorreram três episódios envolvendo a lectotipificação de *Monostroma*. Inicialmente, Pfeiffer (1874) designou *M. bullosum* da Inglaterra como lectotipo e uma segunda lectotipificação foi realizada por Papenfuss (1960), com *M. oxyspermum* do Mar Báltico (Alemanha), pois este autor achou que

a descrição de *M. oxyspermum* se enquadrava melhor no protólogo de *Monostroma* fornecido por Thuret (1854). Posteriormente, Kornmann (1964) retornou o lectotipo de *Monostroma* para *M. bullosum*, que é a proposição taxonômica atualmente aceita na literatura (Guiry & Guiry 2022).

As diferenças no histórico de vida entre *Monostroma bullosum* da Inglaterra (DSL, heteromórfico sexual) e *M. oxyspermum* da Alemanha (FSL, monomórfico assexual) levou Gayral (1964) a propor o gênero *Ulvopsis* para acomodar *M. bullosum*. Dessa forma, *M. oxyspermum* passou a ser a espécie tipo de *Monostroma*. Contudo, essa proposição taxonômica aparentemente não foi considerada nos estudos subsequentes, embora o gênero *Ulvopsis* seja mencionado em trabalhos europeus, envolvendo ultraestrutura flagelar (Moestrup 1978) e aspectos ecológicos (Castro & Viegas 1987, Worm *et al.* 2000, Wahl *et al.* 2004). Baseando-se em diferenças no histórico de vida, Vinogradova (1969) descreveu *Gayralia* para incluir *M. oxyspermum*. Contudo, a proposição de *Gayralia* foi desnecessária, pois *Ulvopsis* já havia sido proposto com base nas mesmas diferenças reprodutivas exibidas entre *M. bullosum* e *M. oxyspermum*. Tendo em vista essas informações, *Gayralia* deve ser considerado sinônimo de *Monostroma*, o que já foi observado e proposto por Bast (2015), com base em dados moleculares. Sendo assim, *G. oxysperma* deve retornar para *Monostroma*, como *M. oxyspermum*, e novas combinações serão propostas para ‘*Gayralia*’ *brasiliensis* e ‘*Monostroma*’ *hariotii*. A espécie da Coreia do Sul deve ser identificada corretamente como *M. kuroshiense*.

Monostroma oxyspermum é uma espécie reconhecida como amplamente distribuída (Guiry & Guiry 2022), principalmente com base em dados morfológicos. De acordo com os dados moleculares disponíveis, a ocorrência desta espécie está confirmada no Brasil, Estados Unidos (Nova York), Canadá (Columbia Britânica), Alemanha (localidade tipo), Dinamarca e Austrália. As sequências de *tufA* e *rbcL-5P* fornecidas neste trabalho são as primeiras para espécimes do Brasil e poderão ser utilizadas em futuros estudos de barcoding no grupo. Conforme observado na filogenia de *tufA*, dois espécimes nomeados como *Kornmannia leptoderma* da Dinamarca (MH720542) e Alemanha (MG944400), região da localidade tipo no Mar Báltico, correspondem na verdade a *M. oxyspermum*. A identificação errônea destes espécimes europeus como *K. leptoderma* ocorreu devido a uma sequência de *tufA* proveniente do Canadá (HQ610252) que foi usada como referência para propor os novos registros de *K. leptoderma* ao longo da costa alemã por Steinhagen *et al.* (2019) e Weinberger *et al.* (2019). Contudo, a amostra do Canadá (como *K. leptoderma*) teve sua identificação recentemente corrigida para *M. oxyspermum* (como *G. oxysperma*, Gary Saunders, comunicação pessoal). Devido a essa identificação molecular errônea, espécimes de *M. oxyspermum* do Mar Báltico

(localidade-tipo), sequenciados por Steinhagen *et al.* (2019), também foram considerados *K. leptoderma*. Devido à ontogenia do talo exibida pelos espécimes da Alemanha (DSL) e, mesmo não observando fusão de gametas, Weinberger *et al.* (2019) mantiveram o nome *K. leptoderma* e apontaram a necessidade de um estudo taxonômico mais detalhado. Tradicionalmente, *K. leptoderma* pode ser distinguida de *M. oxyspermum* por seu histórico de vida (sexual heteromórfico e assexuado, respectivamente) e ontogenia (DSL e FSL, respectivamente; Golden & Cole 1986, Bast 2015, Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2013).

Kornmannia leptoderma é uma espécie monostromática pertencente à ordem Ulvales, descrita para o Estreito de Matochkin (Novaya Zemlya), Ártico russo, e por muito tempo foi conhecida como uma espécie circumboreal, restrita às águas frias e com afinidades temperadas (Bliding 1969 ‘1968’, Golden & Cole 1986, Fredriksen *et al.* 2014). O *status* taxonômico de *K. leptoderma* permanece incerto, uma vez que não há sequências de DNA da localidade tipo. De acordo com a filogenia do marcador *rbcL*-5P obtida neste trabalho, um espécime da Columbia Britânica depositado no *GenBank* como *K. leptoderma* talvez realmente corresponda a essa espécie, diante do seu posicionamento filogenético na ordem Ulvales, proximamente relacionada a *Blidingia minima* (Nägeli ex Kützinger) Kylin do Japão. A elucidação deste táxon monostromático só será possível após sequenciamento do material tipo ou de topotipos. Nossos resultados reforçam a necessidade de aliar dados moleculares aos caracteres morfológicos e ontogenéticos para identificar com precisão as algas verdes monostromáticas, até mesmo em nível de gênero.

Gayralia brasiliensis foi descrita para o Brasil por Pellizzari *et al.* (2013), com distribuição confirmada por dados moleculares entre as costas de Pernambuco e Santa Catarina. O resultado do presente trabalho ampliou a distribuição de *G. brasiliensis* ao norte do Brasil, até a costa do Ceará, apesar de Pedrini *et al.* (2021) terem registrado a espécie no Pará, baseados apenas em morfologia. Além disso, as novas sequências de *tufA* que foram geradas são inéditas para a espécie. O marcador *tufA* é considerado um barcode primário para as algas verdes (Saunders & Kucera 2010) e essas sequências servirão de base para futuros estudos de levantamento da biodiversidade. As primeiras ocorrências de *G. brasiliensis* fora da localidade tipo foram confirmadas no Havaí (como *Gayralia* sp.; Carlile *et al.* 2011) e Índia (como *G. oxysperma*; Gupta *et al.* 2015), por meio dos marcadores *tufA* e ITS, respectivamente. Estas são as primeiras sequências de *tufA* geradas para *G. brasiliensis* do Brasil. Esses dados demonstram que *G. brasiliensis* é, até o momento, uma espécie com distribuição disjunta e poderá ser encontrada em outros locais, à medida que novos estudos moleculares forem realizados mundialmente.

No Brasil, as espécies identificadas como *Gayralia brasiliensis* e *Monostroma oxyspermum* podem ser encontradas ocorrendo simpatricamente nos manguezais de São Paulo (Braga 1997). Até então, o único estudo molecular neste grupo havia sido realizado por Pellizzari *et al.* (2013) e os autores distinguiram as duas espécies pela ontogenia do talo, fatores ecológicos e dados moleculares. Apesar de ambas serem assexuadas e possuírem zooides biflagelados, *M. oxyspermum* apresenta ontogenia do talo do tipo FSL, enquanto em *G. brasiliensis* a ontogenia é do tipo FL (Cordeiro-Marino *et al.* 1993, Braga 1997, Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2013).

Em termos de tolerância a fatores abióticos, *Monostroma oxyspermum* do Brasil apresenta menor tolerância a altas temperaturas e salinidade elevada, sendo encontrada apenas em estuários e manguezais. *Gayralia brasiliensis*, no entanto, pode crescer e se reproduzir em 30°C e não se restringe a águas salobras, sendo também encontrada em costões rochosos marinhos (Braga *et al.* 1997, Pellizzari *et al.* 2008). Algumas características observadas nos espécimes analisados no presente trabalho podem ser úteis na distinção das duas espécies. Em São Paulo, *G. brasiliensis* costuma formar populações com espécimes bem mais desenvolvidos que *M. oxyspermum*, alcançando 10 cm de comprimento e fixos ao substrato por um distinto e pequeno apressório. As populações mais bem desenvolvidas foram observadas na Ilha do Cardoso (Cananéia, estado de São Paulo), enquanto os espécimes coletados em praias foram significativamente menores. Por outro lado, *M. oxyspermum* sempre foi encontrada formando pequenos tufos nos matacões onde crescem as cracas cobertas por lama, nos estuários do Rio Escuro e do Rio Lagoinha. Morfologicamente, foi observado que *M. oxyspermum* se fixa ao substrato por um extenso sistema rizoidal formado por longos filamentos multicelulares que são produzidos a partir das células basais. Tal sistema rizoidal bem desenvolvido também foi observado em *M. oxyspermum* (como *Ulvaria oxysperma*) da Austrália (Woolcott & King 1998) e do Uruguai (como *G. oxysperma*; Bernardi & Pellizzari 2013). Esta característica explica a dificuldade encontrada durante o processamento das amostras de *M. oxyspermum*, na tentativa de separar indivíduos e retirar o excesso de sedimentos. Em relação à morfologia, os espécimes de *M. oxyspermum* da localidade tipo examinados por Steinhagen *et al.* (2019) e Weinberger *et al.* (2019) também exibiram pequenas dimensões (1-5 cm), mas os autores não mencionam a presença de um extenso sistema rizoidal filamentoso como observado nos espécimes do Brasil e da Austrália, mas sim apenas células rizoidais com extremidades longas. Conforme enfatizado por Woolcott & King (1998), detalhes da região basal não são comumente descritos ou observados em estudos florísticos tradicionais. Essas evidências demonstram que a região basal do talo deve ser investigada com mais detalhes em outras espécies do gênero.

Monostroma kuroshiense foi proposta por Bast (2015) para acomodar espécimes identificados como pertencentes ao complexo *M. latissimum-nitidum* no Japão e, até o momento, era considerada uma espécie endêmica daquela região. No presente trabalho, foram analisados espécimes da Coreia do Sul morfologicamente identificados como *M. nitidum*, uma espécie amplamente citada naquela região. As análises moleculares de *tufA* e de ITS confirmaram a ocorrência de *M. kuroshiense* na Coreia do Sul, com base na afinidade genética entre a amostra da Coreia do Sul e da localidade tipo. Estas são as primeiras sequências de *tufA* e ITS de *M. nitidum* da Coreia do Sul.

Monostroma latissimum e *M. nitidum* possuem histórico de vida idêntico, com diferenças apenas na ontogenia do talo: “filamento-lâmina” em *M. latissimum* e “filamento-saco-lâmina” em *M. nitidum* (Bast 2015). A morfologia das duas espécies também é muito semelhante, com diferença mínima na espessura do talo: 20-25 µm em *M. latissimum* e 24-30 µm em *M. nitidum* (Wittrock 1866). Por meio de estudos de biologia molecular e de cruzamento de gametas, Bast *et al.* (2015) observaram que *M. latissimum* e *M. nitidum* do Japão correspondem a uma única espécie (*M. latissimum-nitidum*) e que a diferença na ontogenia do talo é um indício de uma provável especiação simpátrica em andamento. Tendo em vista a importância econômica das MVM nos países asiáticos, a correta identificação de espécimes coreanos como *M. kuroshiense* é importante para agregar valor comercial a esse produto e evitar a perpetuação de erros nomenclaturais. Na Coreia do Sul, ambas as espécies, *M. latissimum* e *M. nitidum*, são registradas, porém como não há estudos ontogenéticos realizados com amostras coreanas, não sabemos qual desses dois nomes está sendo substituído por *M. kuroshiense*. Além disso, as filogenias de ITS e de *rbcL*-5P demonstraram que várias entidades taxonômicas são identificadas sob o nome de *M. nitidum*, mas na realidade correspondem a diferentes linhagens dentro de *Ulvopsis* e *Monostroma*.

Da mesma forma, as filogenias de *tufA* e ITS demonstraram que duas entidades geneticamente distintas estão passando pelo nome de *Monostroma grevillei* (Thuret) Wittrock, a espécie tipo do gênero *Ulvopsis* (Tabela 1). De acordo com os dados de *tufA*, existe uma espécie que ocorre nas costas Pacífica (Columbia Britânica) e Atlântica do Canadá (New Brunswick) e Estados Unidos (Maine), sem variação intraespecífica; e uma segunda espécie no Mar Báltico (Alemanha) e da costa Atlântica do Canadá (New Brunswick) e Estados Unidos (Maine), com divergência genética de 0,1%. Do mesmo modo, a filogenia de ITS revelou espécimes identificados como *M. grevillei* da Irlanda e China formando dois clados distintos. Os dados de *rbcL*-5P mostraram *M. grevillei* em um clado único com espécimes da Irlanda, China e, provavelmente, Austrália. Como a localidade tipo de *M. grevillei* é a França, os clados que contém espécimes da Alemanha e Irlanda provavelmente correspondem a verdadeira *M.*

grevillei. Dessa forma, essa espécie deve ser investigada em mais detalhes, já que é o tipo de *Ulvopsis*, proposto por Gayral (1964) e que deve ser considerado um gênero aceito.

Inconsistências de identificação também foram observadas em *Monostroma hariatii*. As duas sequências de ITS de *M. hariatii* da localidade tipo (Península Antártica) primeiras sequências de ITS para *M. hariatii* da Península Antártica obtidas no presente estudo foram idênticas a um espécime identificado como *M. angicava*, também da Península Antártica. O mesmo padrão foi observado na filogenia de *tufA*, onde uma sequência de *M. hariatii* foi idêntica a uma sequência de *M. angicava*, ambas da Península Antártica (Dubrasquet *et al.* 2021). No entanto, como *M. hariatii* é uma espécie antártica e subantártica relativamente comum e a localidade tipo de *M. angicava* é o Mar da Noruega, Oceano Ártico Norte (Kjellman 1883), sua ocorrência na Península Antártica provavelmente corresponde a um erro de identificação. *Monostroma hariatii* e as demais espécies filogeneticamente próximas devem ser transferidas para o gênero *Ulvopsis*, pois são distantemente relacionadas ao verdadeiro clado de *Monostroma*, que contém a espécie tipo *M. oxyspermum* da Alemanha (clado A na Figura 3).

A escassez de caracteres morfológicos que possam ser usados para distinguir as MVM contribui para os diversos erros de identificação observados no grupo, além da presença de linhagens genéticas distintas dentro do que é considerado uma única espécie. Saunders & Kucera (2010) relataram que a existência de espécies crípticas é comum em MVM, demonstrada em suas análises, por exemplo, pela presença de duas espécies identificadas sob o nome de *Monostroma grevillei*. As diversas inconsistências nas identificações reconhecidas no presente trabalho, além das novas ocorrências de *Gayralia brasiliensis* no Indo-Pacífico e *M. kuroshiense* na Coreia do Sul, sugerem que uma reavaliação taxonômica global do grupo, com uma ampla amostragem de táxons, é necessária e será crucial para a circunscrição precisa das algas verdes monostromáticas. Essa questão é também importante levando-se em consideração as espécies que são exploradas comercialmente e que apresentam potencial biotecnológico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As filogenias dos marcadores utilizados demonstraram que o gênero *Gayralia* deve ser considerado sinônimo de *Monostroma* e que o gênero *Ulvopsis* deve ser taxonomicamente reconhecido. Novas combinações devem ser feitas para '*G. brasiliensis*' e '*M. hariatii*' para acomodá-las em *Monostroma* e *Ulvopsis*, respectivamente.

- O gênero *Gayralia* tornou-se supérfluo e, conseqüentemente, *Gayralia oxysperma* deve retornar para o gênero *Monostroma*.
- ‘*Gayralia*’ *brasiliensis* e *Monostroma oxyspermum* são muito semelhantes morfológicamente, mas em São Paulo *M. oxyspermum* pode ser reconhecida pelas suas dimensões menores e por comumente formar pequenas manchas isoladas, enterradas no lodo e sedimento.
- *Monostroma oxyspermum* se fixa ao substrato por um extenso sistema rizoidal constituído por longos filamentos multicelulares produzidos a partir das células basais, estrutura ausente em ‘*G. brasiliensis*’, que apresenta um pequeno apressório discoide.
- Novos registros de ‘*G. brasiliensis*’ no Havaí (EUA) e na Índia, e de *M. kuroshiense* na Coreia do Sul foram confirmados através de sequências de *tufA* e ITS, primeira ocorrência de ambas fora das localidades tipo, Brasil e Japão, respectivamente.
- A distribuição de *G. brasiliensis* no Brasil foi expandida para a costa do Ceará, por meio de dados moleculares.
- Foram disponibilizadas as primeiras sequências de *tufA* e *rbcL*-5P para *M. oxyspermum* do Brasil; *tufA* de ‘*G. brasiliensis*’ do Brasil; *tufA* e ITS para *M. kuroshiense* da Coreia do Sul; e ITS de ‘*M. hariatii*’ da Península Antártica.
- Os marcadores *tufA* e ITS foram mais fáceis de amplificar e sequenciar do que o *rbcL*-5P, corroborando o seu uso como marcadores do tipo barcode.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Madden, T. L., Schaffer, 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 Research* 25: 3389-3402.
- Bast, F., Shimada, S., Hiraoka, M. & Okuda, K.** 2009. Asexual life history by biflagellate zoids in *Monostroma latissimum* (Ulotrichales). *Aquatic Botany* 91: 213-218.
- Bast, F. & Okuda, K.** 2010. Gametangial Ontogeny in Intertidal Green Alga: *Monostroma latissimum* (Kützinger) Wittrock. *International Journal of Plant Reproductive Biology* 2(1): 1-5.
- Bast, F.** 2015. Taxonomic reappraisal of Monostromataceae (Ulvophyceae: Chlorophyta) based on multi-locus phylogeny. *Webbia* 70: 43–57. <https://doi.org/10.1080/00837792.2015.1004845>

- Bast, F., Kubota, S. & Okuda, K.** 2015. Phylogeographic assessment of panmictic *Monostroma* species from Kuroshio Coast, Japan, reveals sympatric speciation. *Journal of Applied Phycology* 27(4): 1725-1735.
- Bellan, D. L., Mazepa, E., Biscaia, S. M. P., Gonçalves, J. P., Oliveira, C. C., Rossi, G. R., ... & Franco, C. R. C.** 2020. Non-cytotoxic sulfated heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* green seaweed reduces driver features of melanoma metastatic progression. *Marine Biotechnology* 22: 194-206.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D. & Sayers, E.W.** 2018. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46: 41–47.
- Bernardi, J. & Pellizzari, F.** 2013. Morfologia comparada e mapeamento latitudinal de Clorófitas monostromáticas (Ulotrichales) do Atlântico Sul e península Antártica. *Acta Botanica Venezuelica* 36(2): 269-286.
- Bernardi, J., de Vasconcelos, E. R., Lhullier, C., Gerber, T., Neto, P. C. & Pellizzari, F. M.** 2016. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (Ulvophyceae) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica* 26(2): 233-239.
- Blackman, F.F. & Tansley, A.G.** 1902. A revision of the classification of the green algae. *New Phytologist* 1: 17-24, 47-48, 67-72, 89-96, 114-120, 133-144, 163-168, 189-192, 213-220, 238-244, 1 plate.
- Bliding, C.** 1960. A preliminary report on some new Mediterranean green algae. *Botaniska Notiser* 113(2): 172-184, 11 figs.
- Bliding, C.** 1968. A critical survey of European taxa Ulvales II. *Ulva, Ulvaria, Monostroma, Kornmannia*. *Bot. Not.* 121: 535-629.
- Blomster, J., Bäck, S., Fewer, D. P., Kiirikki, M., Lehvo, A., Maggs, C. A. & Stanhope, & M. J.** 2002. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. *American Journal of Botany* 89(11): 1756-1763.
- Braga, M.R.A.** 1997. Recruitment of two species of monostromatic blade-like chlorophytes, *Monostroma* sp. and *Ulvaria oxysperma* (Ulvales, Chlorophyta), in São Paulo State, Brazil. *Phycol. Res.* 45: 153–161.
- Braga, M.R.A., Fujii, M.T. & Cordeiro-Marino, M.** 1997. Monostromatic green algae (Ulvales, Chlorophyta) of São Paulo and Paraná states (Brazil): distribution, growth, and reproduction. *Rev. Bras. Botânica* 20: 197–203.
- Bringloe, T. T., Sjøtun, K. & Saunders, G. W.** 2019. A DNA barcode survey of marine macroalgae from Bergen (Norway). *Marine Biology Research* 15(10): 580-589.

- Bringloe, T. T., Verbruggen, H. & Saunders, G. W.** 2020. Unique biodiversity in Arctic marine forests is shaped by diverse recolonization pathways and far northern glacial refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(36): 22590-22596.
- Borzí, A.** 1895. Studi algologici: saggio di ricerche sulla biologia delle alghe. Fasc. II. pp. [121]-378, pls X-XXXI. Palermo: Alberto Reber Libreria Carlo Clausen.
- Cai, J., Huang, H. & Leung, P.** 2019. Understanding and measuring the contribution of aquaculture and fisheries to gross domestic product (GDP). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper N° 606. Rome, FAO. 80 pp.
- Carlile, A.L., O’Kelly, C.J. & Sherwood, A.R.** 2011. The green algal genus *Cloniophora* represents a novel lineage in the Ulvales: a proposal for Cloniophoraceae fam. nov. *J. Phycol.* 47, 1379–1387.
- Cassolato, J. E., Nosedá, M. D., Pujol, C. A., Pellizzari, F. M., Damonte, E. B. & Duarte, M. E.** 2008. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydrate Research* 343: 3085-3095.
- Castro, M.L. & Viegas, M.C.** 1987. Contribuição para o estudo da zona intertidal (substrato rochoso) da Ilha de São Miguel-Açores. Facies de *Corallina elongata* Ellin & Solander. Resultados preliminares. Cuadernos Marisqueros 1: 159-169.
- Cordeiro-Marino, M., Braga, M.R.A., Fujii, M.T., Guimarães, S.M.P.B. & Mitsugui, E.M.** 1993. Monostromatic green algae from Espírito Santo State, Brazil: Life-history, growth and reproduction in culture. *Rev. Brasil. Biol.* 53: 285–293.
- Coto, A.C.S.P.** 2007. Biodiversidade de Clorofíceas Marinhas Bentônicas do Litoral do Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica.
- Cunha, S.R.D. & Costa, C.S.** 2002 Gradientes de salinidade e frequência de alagamento como determinantes da distribuição e biomassa de macroalgas associadas a troncos de manguezais na Baía de Babitonga, SC. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 6: 93-102.
- Darienko, T. & Proeschold, T.** 2017. Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II.). *Phytotaxa* 324(1): 1-41.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D.** 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- Doty, M.S.** 1947. The marine algae of Oregon. Part I. Chlorophyta and Phaeophyta. *Farlowia* 3: 1-65, pls 1-10.

- Du, G., Wu, F., Mao, Y., Guo, S., Xue, H. & Bi, G.** 2014. DNA barcoding assessment of green macroalgae in coastal zone around Qingdao, China. *Journal of Ocean University of China*, 13: 97-103.
- Dubrasquet, H., Garrido, I., Bruning, P., Reyes, J. & Guillemin, M.-L.** 2021. Building-up knowledge on green marine macroalgae diversity in the Western Antarctic Peninsula: data from two molecular markers reveals numerous species with amphipolar distribution. *Cryptogamie, Algologie* 42: 21-37.
- Eston, V.R., Braga, M.R.A., Cordeiro-Marino, M., Fujii, M.T. & Yokoya, N.S.** 1992. Macroalgal colonization patterns on artificial substrates inside southeastern Brazilian mangroves. *Aquatic Botany* 42: 315-325.
- Eston, V.R., Yokoya, N.S., Fujii, M.T., Braga, M.R.A., Plastino, E.M. & Cordeiro-Marino, M.** 1991. Mangrove macroalgae in southeastern Brazil: spatial and temporal patterns. *Revista Brasileira de Biologia* 51: 829-837.
- Famà, P., Wysor, B., Kooistra, W. & Zuccarello, G.C.** 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of Phycology* 38: 1040-1050.
- Fang, L., Leliaert, F., Novis, P. M., Zhang, Z., Zhu, H., Liu, G., ... & Zhong, B.** 2018. Improving phylogenetic inference of core Chlorophyta using chloroplast sequences with strong phylogenetic signals and heterogeneous models. *Molecular phylogenetics and evolution* 127: 248-255.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Friedl, T. & O'Kelly, C. J.** 2002. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure. *European Journal of Phycology* 37(3): 373-384.
- Floyd, G. L. & O'Kelly, C. J.** 1984. Motile cell ultrastructure and the circumscription of the orders Ulotrichales and Ulvales (Ulvophyceae, Chlorophyta). *American Journal of Botany* 71(1): 111-120.
- Fredriksen, S., Bartsch, I., & Wiencke, C.** 2014. New additions to the benthic marine flora of Kongsfjorden, western Svalbard, and comparison between 1996/1998 and 2012/2013. *Botanica Marina* 57: 203–216.
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E. D., Škaloud, P., D'hondt, S., De Clerck, O., ... & Verbruggen, H.** 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution* 2: 63.

- Gayral, P.** 1964. Sur le démembrement de l'actuel genre *Monostroma* Thuret (Chlorophycées, Ulothricales s.l.). *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences*. Paris. 258: 2149-2152.
- Ghaderiardakani, F., Coates, J. C. & Wichard, T.** 2017. Bacteria-induced morphogenesis of *Ulva intestinalis* and *Ulva mutabilis* (Chlorophyta): a contribution to the lottery theory. *FEMS microbiology ecology* 93(8).
- Golden, L. & Cole, K.M.** 1986. Studies of the green algae *Kornmannia* (Kornmanniaceae fam. nov., Ulotrichales) in British Columbia. *Jap. J. Phycol* 34: 263–274.
- Guindon, S. & Gascuel, O.** 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** 2022. *AlgaeBase*. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <algaebase.org>. Acessado em 07 de abril de 2022.
- Gupta, V., Kumari, P. & Reddy, C. R. K.** 2015. Development and characterization of somatic hybrids of *Ulva reticulata* Forsskål (×) *Monostroma oxyspermum* (Kütz.) Doty. *Frontiers in Plant Science* 6: 3.
- Hanic, L. A. & Lindstrom, S. C.** 2008. Life history and systematic studies of *Pseudothrix borealis* gen. et sp. nov. (= North Pacific *Capsosiphon groenlandicus*, Ulotrichaceae, Chlorophyta). *Algae* 23(2): 119-133.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hanyuda, T., Arai, S. & Ueda, K.** 2000. Variability in the *rbcL* introns of Caulerppalean algae (Chlorophyta, Ulvophyceae). *Journal of Plant Research* 113(4): 403.
- Harper, J. T. & Saunders, G. W.** 2001. Molecular systematics of the Florideophyceae (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data. *Journal of Phycology* 37: 1073-1082.
- Hayden, H.S. & Waaland, J.R.** 2002. Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences. *J. Phycol.* 38: 1200–1212. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01167.x>
- Hayden, H. S., Blomster, J., Maggs, C. A., Silva, P. C., Stanhope, M. J. & Waaland, J. R.** 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology* 38: 277-294.
- Hoang, M. H., Kim, J. Y., Lee, J. H., You, S. & Lee, S. J.** 2015. Antioxidative, hypolipidemic, and anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum*. *Food Science and Biotechnology* 24(1): 199-205.

- Horinouchi, Y., Yamaguchi, M., Chibana, H. & Togashi, T.** 2019. Nuclear behavior and roles indicate that Codium phase is a sporophyte in *Monostroma angicava* (Ulotrichales, Ulvophyceae). *Journal of phycology* 55(3): 534-542.
- Hou, Z., Ma, X., Shi X., Li, X., Yang, L., Xiao, S., De Clerck, O., Leliaert, F. & Zhong, B.** 2022. Phylotranscriptomic insights into a Mesoproterozoic-Neoproterozoic origin and early radiation of green seaweeds (Ulvophyceae). *Nature Communications* 13: 1610.
- Joly, A. B.** 1957. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Botânica*, 14, 7-237.
- Joly, A. B.** 1965. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Univ São Paulo: Fac Filos Cienc Let Bot* 21: 1-393.
- Katoh, K. & Standley, D.M.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- Kawai, H., Hanyuda, T., Mine, I., Takaichi, S., Terada, R. & Kitayama, T.** 2021. Morphology and molecular phylogeny of *Umbraulva* spp.(Ulvaes, Ulvophyceae), and proposal of *Ryuguphyucus* gen. nov. and *R. kuaweuweu* comb. nov. *European Journal of Phycology* 56(1): 1-11.
- Kawashima, Y., Akasaki, T., Matsumoto, Y., Yamazaki, Y. & Shimada, S.** 2013. Species identification of imported and Japanese commercial green algal products based on phylogenetic analyses using the nrITS2 and 5S rDNA spacer regions. *Fisheries Science* 79: 521-529.
- Kazi, M. A., Reddy, C. R. K. & Jha, B.** 2013. Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the *tufA*, *rbcL*, 18S rDNA and ITS rDNA genes. *PloS one* 8(12), e82438.
- Kida, W.** 1990. Culture of seaweeds *Monostroma*. *Marine & Freshwater Behaviour & Phy*, 16(2): 109-131.
- Kjellman, F. R.** 1883. The algae of the Arctic Sea: a survey of the species, together with an exposition of the general characters and the development of the flora (Vol. 20). PA Norstedt & söner.
- Kornmann, P.** 1964. Über *Monostroma bullosum* (Roth) Thuret und *M. oxyspermum* (Kütz.) Doty. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 11: 13-21.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K.** 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.

- Kunieda, H.** 1934. On the life-history of *Monostroma*. Proceedings of the Imperial Academy 10: 103-106.
- Kützting, F.T.** 1843. Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange. Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser. pp. [part 1]: [i]-xxxii, [1]-142, [part 2:] 143-458, 1, err.], pls 1-80. Leipzig: F.A. Brockhaus.
- Lamouroux, J.V.F.** 1813. Essai sur les genres de la famille des Thalassiophytes non articulées présenté a l'Institut, dand la séance du 3 Février 1812. pp. [1]-84, plus pls 7-13. Paris: chez G. Dufour et Cie, libraires, rue des Mathurins-Satin-Jaques, No. 7. De ;'Imprimerie de A. Belin.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. & De Clerck, O.** 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. Critical reviews in plant sciences 31(1): 1-46.
- Li, N., Liu, X., He, X., Wang, S., Cao, S., Xia, Z., ... & Mao, W.** 2017. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. Carbohydrate Polymers 159: 195-206.
- Lin, Z., Shen, S., Chen, W., & Li, H.** 2013. Phylogenetic analyses of four species of *Ulva* and *Monostroma grevillei* using ITS, *rbcL* and 18S rDNA sequence data. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 31(1): 97-105.
- Lindstrom, S. C. & Hanic, L. A.** 2005. The phylogeny of North American *Urospora* (Ultrichales, Chlorophyta) based on sequence analysis of nuclear ribosomal genes, introns and spacers. Phycologia 44(2): 194-201.
- Lindstrom, S. C., Lemay, M. A., Starko, S., Hind, K. R. & Martone, P. T.** 2021. New and interesting seaweed records from the Hakai area of the central coast of British Columbia, Canada: Chlorophyta. Botanica Marina 64(5): 343-361.
- Linnaeus, C.** 1753. Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Vol. 2 pp. [i], 561-1200, [1-30, index], [i, err.]. Holmiae [Stockholm]: Impensis Laurentii Salvii.
- Loughnane, C. J., McIvor, L. M., Rindi, F., Stengel, D. B. & Guiry, M. D.** 2008. Morphology, *rbcL* phylogeny and distribution of distromatic *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) in Ireland and southern Britain. Phycologia 47(4): 416-429.
- Mazepa, E., Nosedá, M. D., Ferreira, L. G., de Carvalho, M. M., Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R., ... & Duarte, M. E.** 2021. Chemical structure of native and modified sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia brasiliensis* and their cytotoxic effect

- on U87MG human glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 187: 710-721.
- Miladi, R., Manghisi, A., Minicante, S. A., Genovese, G., Abdelkafi, S., & Morabito, M.** 2018. A DNA barcoding survey of *Ulva* (Chlorophyta) in Tunisia and Italy reveals the presence of the overlooked alien *U. ohnoi*. *Cryptogamie, Algologie* 39(1): 85-107.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente).** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Atlas dos Manguezais do Brasil. Brasília.
- Moestrup, Ø.** 1978. On the phylogenetic validity of the flagellar apparatus in green algae and other chlorophyll a and b containing plants. *Biosystems* 10: 117-144.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R. & Watanabe, T.** 1987. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia* 151: 5-29.
- O'Kelly, C. J., Floyd, G. L. & Dube, M. A.** 1984. The fine structure of motile cells in the genera *Ulvaria* and *Monostroma*, with special reference to the taxonomic position of *Monostroma oxyspermum* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Plant Systematics and Evolution* 144: 179-199.
- O'Kelly, C. J., Wysor, B. & Bellows, W. K.** 2004. Gene sequence diversity and the phylogenetic position of algae assigned to the genera *Phaeophila* and *Ochlochaete* (Ulvophyceae, Chlorophyta) 1. *Journal of Phycology* 40(4): 789-799.
- Papenfuss, G.F.** 1960. On the genera of the Ulvales and the status of the order. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 56: 303-318, 21 figs, 6 pls.
- Pedrini, A. D. G., Guarino, G. I. P., Diniz, F. D. S. P. & Martinelli Filho, J. E.** 2021. Inventário de algas bentônicas de praias e matacões rochosos da costa nordeste do Pará, Amazônia brasileira. *Acta Amazonica* 51(2): 166-170.
- Pellizzari, F. M., Absher, T., Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C.** 2007. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in southern Brazil. *Journal of Applied Phycology* 19(1): 63-69.
- Pellizzari, F., Oliveira, E. C. & Yokoya, N. S.** 2008. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. *Journal of Applied Phycology* 20: 75-82.
- Pellizzari, F. & Reis, R. P.** 2011. Seaweed cultivation on the southern and southeastern Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(2): 305-312.
- Pellizzari, F., Oliveira, M.C., Medeiros, A.S., Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C.** 2013. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov.

- (Ulotrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. *Botanica Marina* 56: 197–205. <https://doi.org/10.1515/bot-2012-0197>
- Pellizzari, F., Vélez-Rubio, G. M., Cristine-Silva, M., & Carranza, A.** 2016. The seaweeds *Myriogloea major* Asensi (Chordariaceae, Phaeophyceae) and *Gayralia oxysperma* (Kützinger) KL Vinogradova ex Scagel et al. (Ulvophyceae, Chlorophyta): a case of range extension in the Southwestern Atlantic Ocean? *Marine Biodiversity* 46: 853-860.
- Pfeiffer, L.** 1874. *Nomenclator botanicus. Nominum ad finem anni 1858 publici juris factorum, classes, ordines, tribus, familias, divisiones, genera, subgenera vel sectiones designantium enumeratio alphabetica. Adjectis auctoribus, temporibus, locis systematicis apud varios, notis literariis atque etymologicis et synonymis.* Vol. 2 pp. [1]-760. Cassellis [Cassel]: Sumptibus Theodori Fischeri [Theodor Fischer].
- Post, E.** 1936 Systematische und pflanzengeographische Notizen zur Bostrychia-Caloglossa-Assoziation. *Revue Algologique* 9: 1–84.
- Rambaut, A.** 2018. FigTree v1.4.2, a graphical viewer of phylogenetic trees. <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Accessed on 20 September 2020.
- Ropellato, J., Carvalho, M. M., Ferreira, L. G., Nosedá, M. D., Zuconelli, C. R., Gonçalves, A. G., ... & Duarte, M. E.** 2015. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: Partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. *Carbohydrate polymers* 117: 476-485.
- Ruprecht, F.J.** 1850. *Algae ochotenses. Die ersten sicheren Nachrichten über die Tange des Ochotskischen Meeres.* pp. 1-243, 10 pls. St. Petersburg: Buchdruckerei der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.
- Sanyal, B., Lee, E., Jo, Y., Kim, G. R., Ghosh, S. K., & Kwon, J. H.** 2019. Electron spin resonance spectroscopy identifies radiation-induced markers in 7 kGy-irradiated dried lavers subjected to alkaline pretreatment. *Korean Journal of Food Preservation* 26: 441-448.
- Saunders, G.W. & Kucera, H.** 2010. An evaluation of *rbcL*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogam. Algol.* 31: 487–528.
- Shimada, S., Hiraoka, M., Nabata, S., Iima, M. & Masuda, M.** 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycological research* 51(2): 99-108.
- Shimada, Y., Terasawa, M., Okazaki, F., Nakayama, H., Zang, L., Nishiura, K., ... & Nishimura, N.** 2021. Rhamnan sulphate from green algae *Monostroma nitidum* improves constipation with gut microbiome alteration in double-blind placebo-

- controlled trial. Scientific reports 11(1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92459-7>
- Silva, A. C. R., Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., Ferreira, L. G., Cassolato, J. E. F., Sanchez, E. F., & Fuly, A. L.** 2018. Potential utilization of a polysaccharide from the marine algae *Gayralia oxysperma*, as an antivenom for viperidae snakebites. Marine drugs 16(11): 412.
- Silva, S.L.A., Brito, J.O.F., Pereira, S.B., Gama, W.A., Silva Junior, W.J., Benko-Iseppon, A.M. & Cassano V.** 2022 Morphological and molecular studies on the genus *Gayralia* (Ulotrichales, Chlorophyta) in northeastern Brazil with expansion of its species distribution. Bot Mar. <https://doi.org/10.1515/bot-2021-0099>
- Škaloud, P., Nedbalová, L., Elster, J. & Komárek, J.** 2013. A curious occurrence of *Hazenia broadyi* spec. nova in Antarctica and the review of the genus *Hazenia* (Ulotrichales, Chlorophyceae). Polar Biology 36(9): 1281-1291.
- Škaloud, P., Rindi, F., Boedeker, C. & Leliaert, F.** 2018. Freshwater Flora of Central Europe, Vol 13: Chlorophyta: Ulvophyceae (Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 13: Chlorophyta: Ulvophyceae) (Vol. 13). Springer-Verlag.
- Stamatakis, A.** 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 10:1093.
- Steinhagen, S., Karez, R. & Weinberger, F.** 2019. Cryptic, alien and lost species: molecular diversity of *Ulva* sensu lato along the German coasts of the North and Baltic Seas. Eur. J. Phycol. 54: 466-483.
- Tako, M., Yamashiro, Y., Teruya, T. & Uechi, S.** 2017. Structure-function relationship of rhamnan sulfate isolated from commercially cultured edible green seaweed, *Monostroma nitidum*. American Journal of Applied Chemistry 5: 38.
- Tatewaki, M.** 1969. Culture studies on the life history of some species of the genus *Monostroma*. Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci. Hokkaido Univ. 6: 1-56.
- Terasawa, M., Hiramoto, K., Uchida, R. & Suzuki, K.** 2022. Anti-Inflammatory Activity of Orally Administered *Monostroma nitidum* Rhamnan Sulfate against Lipopolysaccharide-Induced Damage to Mouse Organs and Vascular Endothelium. Marine Drugs 20(2): 121.
- Thiers, B.** 2022. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>; Acessado em 07 de abril de 2022.

- Thuret, G.** 1854. Note sur la synonymie des *Ulva lactuca* et *latissima*, L., suivie de quelques remarques sur la tribu des Ulvacées. Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Cherbourg 2: 17-32.
- Ugadim, Y.** 1973. Algas marinhas bentônicas do litoral sul do estado de São Paulo e do litoral do estado do Paraná. I Divisão Chlorophyta/benthic marine algae from the south of state of São Paulo and state of Paraná—i. Chlorophyta. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo: 11-77.
- Vinogradova, K.L.** 1969. K. sistematike poryadka Ulvales (Chlorophyta) s.l. A contribution to the taxonomy of the order Ulvales. Botanicheskij Zhurnal SSSR 54: 1347-1355, one un-numbered figure. [in Russian with English title and summary]
- Wahl, M., Molis, M., Davis, A., Dobretsov, S., Dürr, S.T., Johanssons, J., Kinley, J., Kirugara, D., Langer M., Lotze, H.K., Thiel M., Thomason J.C., Worm B. & Bem-Yosef D.Z.** 2004. UV effects that come and go: a global comparison of marine benthic community level impacts. Global Change Biology 10: 1962-1972.
- Wan, A. H., Wilkes, R. J., Heesch, S., Bermejo, R., Johnson, M. P. & Morrison, L.** 2017. Assessment and characterisation of Ireland's green tides (*Ulva* species). PLoS One 12(1), e0169049.
- Wang, S., Wang, W., Hao, C., Yunjia, Y., Qin, L., He, M. & Mao, W.** 2018. Antiviral activity against enterovirus 71 of sulfated rhamnan isolated from the green alga *Monostroma latissimum*. Carbohydrate Polymers 200: 43-53.
- Weinberger, F., Steinhagen, S., Afanasyev, D.F. & Karez, R.** 2019. New records from the southern North Sea and first records from the Baltic Sea of *Kornmannia leptoderma*. Botanica Marina 62: 63–73.
- Wetherbee, R. & Verbruggen, H.** 2016. *Kraftionema allantoides*, a new genus and family of Ulotrichales (Chlorophyta) adapted for survival in high intertidal pools. Journal of Phycology 52(5): 704-715.
- Wittrock, V.B.** 1866. Försök till en Monographie öfver Algsläktet Monostroma. pp. 1-66, IV plates, folded scheme [= 14 figs]. Stockholm: Akademisk Afhandling.
- Woolcott, G. W. & King, R. J.** 1998. *Ulvaria* (Ulvales, Chlorophyta) in eastern Australia: Morphology, anatomy and ontogeny compared with molecular data. Botanica Marina 41: 63-76.
- Woolcott, G. W., Iima, M. & King, R. J.** 2000. Speciation within *Blidingia minima* (Chlorophyta) in Japan: Evidence from morphology, ontogeny, and analyses of nuclear rDNA its sequence. Journal of Phycology 36(1): 227-236.

Worm B., Lotze H.K. & Sommer U. 2000. Coastal food web structure, carbon storage, and nitrogen retention regulated by consumer pressure and nutrient loading. *Limnology and Oceanography* 45: 339-349.

ANEXOS

Tabela A: Valores de divergência para o marcador *tufA*. Valores intraespecíficos em negrito.

	<i>G. brasiliensis</i>	<i>M. oxyspermum</i>	<i>M. kuroshiense</i>	<i>M. angicava</i>	<i>Monostroma</i> sp1. <i>grevillei</i>	<i>Monostroma</i> sp2. <i>grevillei</i>	<i>M. hariatii</i>
<i>G. brasiliensis</i>	0 – 0,2						
<i>M. oxyspermum</i>	5,9 – 7,0	0 – 0,7					
<i>M. kuroshiense</i>	0,9 – 1,3	6,0 – 6,7	0				
<i>M. angicava</i>	16,6 – 17,9	15,5 – 16,5	16,9 – 19,4	–			
<i>M. sp1. grevillei</i>	17,1 – 19,2	16,3 – 18,3	17,2 – 19,5	7,0 – 7,9	0		
<i>M. sp2. grevillei</i>	17,3 – 17,9	16,3 – 16,7	17,5 – 18,6	7,4 – 7,6	1,0 – 1,4	0 – 0,1	
<i>M. hariatii</i>	16,8 – 17,9	15,6 – 16,6	17,0 – 19,4	0	7,0 – 7,9	7,5 – 7,6	–

Tabela B: Valores de divergência para o marcador *rbcL*-5P. Valores intraespecíficos em negrito.

	<i>G. oxysperma</i>	<i>M. nitidum</i> (AF499680)	<i>M. grevillei</i>	<i>M. nitidum</i> (AF387110)
<i>G. oxysperma</i>	0			
<i>M. nitidum</i> (AF499680)	2,2 – 2,5	–		
<i>M. grevillei</i>	11,6 – 12,9	11,6 – 12,2	1,4	
<i>M. nitidum</i> (AF387110)	11,3 – 11,4	11,4	1,1 – 1,3	–

Tabela C: Valores de divergência para o marcador ITS. Valores intraespecíficos em negrito

	<i>G. brasiliensis</i>	<i>G. oxysperma</i>	<i>Gayralia sp.</i>	<i>M. kuroshiense</i>	<i>M. nitidum</i> (AF415170)	<i>M. angicava</i>	<i>M. grevillei</i>	<i>M. grevillei</i> var. <i>arcticum</i>	<i>M. hariatii</i>	<i>M. nitidum</i> (AF163111)
<i>G. brasiliensis</i>	0 – 0,5									
<i>G. oxysperma</i>	18,9 – 20,3	0 – 0,4								
<i>Gayralia sp.</i>	6,6 – 7,2	18,8 – 19,5	–							
<i>M. kuroshiense</i>	7,3 – 8,4	19,3 – 20,3	7,7 – 8,2	0 – 0,6						
<i>M. nitidum</i> (AF415170)	6,9 – 7,1	19,3 – 19,7	2,8	8,0 – 8,6	–					
<i>M. angicava</i>	22,8 – 25,2	19,9 – 20,7	23,1	24,2 – 26,3	24,7	–				
<i>M. grevillei</i>	24,2 – 26,8	19,8 – 20,6	23,8 – 24,0	24,7 – 26,8	25,0 – 25,4	7,0 – 7,1	0,7			
<i>M. grevillei</i> var. <i>arcticum</i>	24,8 – 27,4	21,2 – 22,1	24,4	25 – 27,1	25,8	6,7	4,3 – 4,5	–		
<i>M. hariatii</i>	24,8 – 25,3	20,7 – 21,2	24,0 – 24,3	26 – 26,9	24,7	0 – 0,2	7,3 – 7,9	7,4 – 7,5	0	
<i>M. nitidum</i> (AF163111)	26,7 – 27,6	22,1 – 22,6	25,3	26,9 – 27,4	26,4	8,3	6,2	3,3	8,3 – 8,7	–