



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR**  
**GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA**

**MARINA DA SILVA MENDONÇA**

**DIVERSIDADE DE ALGAS VERMELHAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS**  
**(Coralinophycidae) EM PRAIAS DO CEARÁ E DO PIAUÍ**

**FORTALEZA**

**2017**

MARINA DA SILVA MENDONÇA

**DIVERSIDADE DE ALGAS VERMELHAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS  
(Coralinophycidae) EM PRAIAS DO CEARÁ E DO PIAUÍ**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia no Instituto de Ciências do Mar – Labomar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Co-orientador: Dr. Pedro Bastos de Macedo Carneiro

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M496d Mendonça, Marina da Silva  
DIVERSIDADE DE ALGAS VERMELHAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS  
(Coralinophycidae) EM PRAIAS DO CEARÁ E DO PIAUÍ / Marina da Silva Mendonça. – 2017.  
38 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Coorientação: Dr. Pedro Bastos de Macedo Carneiro.

1. Barcoding. 2. Marinhos. 3. DNA. 4. Marcadores. I. Título.

CDD 551.46

---

MARINA DA SILVA MENDONÇA

**DIVERSIDADE DE ALGAS VERMELHAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS  
(Coralinophycideae) EM PRAIAS DO CEARÁ E DO PIAUÍ**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia, no Instituto de Ciências do Mar – Labomar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rodrigo Magionni (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Pedro Bastos de Macedo Carneiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Janaína de Araújo Sousa Santiago (Membro Externo)  
Universidade Federal do Piauí - UFPI

A Deus.

Aos meus pais, Maurinho e Meirinha <3.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por nunca ter me deixado desistir, ao longo dos anos na Oceanografia.

Aos meus pais, pelo apoio integral que recebi desde o dia em que escolhi o curso até o dia de hoje. Agradeço também por todo apoio financeiro para participação em eventos que contribuíram para o meu desenvolvimento como Oceanógrafa e como pessoa, mesmo nos momentos em que a situação não era favorável, mas mesmo assim não deixaram de me apoiar da maneira que era possível.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, pela orientação tanto neste trabalho quanto nos dois anos da Monitora nas disciplinas de Oc. Biológica I e II. Por todo o apoio intelectual e econômico que destinou a esta pesquisa, e pela confiança em mim depositada.

Ao Pedro Bastos, por todo o conhecimento que compartilhou comigo desde que bati no Laboratório de Macrogalgas com interesse em saber mais sobre as macroalgas. Sem o Pedro este trabalho não teria sido possível, o seu apoio foi fundamental nos momentos de desânimo e descrença. Além de toda a colaboração e sugestões para tornar este trabalho melhor e mais completo.

A todo apoio que recebi da Janaína durante as minhas dúvidas neste trabalho e na disciplina de Oc. Biológica II. Por toda paciência que teve desde o dia que me ensinou o que são *primers* até os procedimentos utilizados neste trabalho.

À Vanessa agradeço por todas as horas dedicadas a extração e *pcr's* mesmo nos finais de semana, por todo o companheirismo em todos os trabalhos e na vida.

Aos meus amigos da faculdade João Luís, Franklin, Ítele, Marianna Rozas, Sália e Thaís Bastos por todo o apoio recebido ao longo dessa graduação tão feliz e confusa que foi a Oceanografia para turma de 2012. Pelo 12/12/2012 e todas as histórias que deixaram nosso dia a dia melhor.

Aos meus irmãos por serem meus companheiros e amigos em todas as situações.

Aos meus amigos Thaís Buchholz, Hanna Larissa, Beth Duarte, Marianna Marinho, Tamires, Carol, Gyovana, Amanda e Wan por não deixarem a distância física ou não interferir nessas amizades que tenho há tantos anos e são essenciais na vida.

Fernanda, Falcão, Fox, Oscar, Alexandre e tantos outros que considero presentes de Oceanografia por tantos momentos felizes e por todos os que ainda virão.

Ao pessoal do CEDECAM por todo conhecimento compartilhado e pelos momentos de descontração quando as análises não saíam da forma esperada. Especialmente a

Gracinha e a Renata por todo o apoio que recebi durante a execução dos procedimentos e pelas respostas as minhas dúvidas.

Ao PET Oceanografia, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, além das amizades e momentos que levarei comigo por toda a vida. A profa. Ozileia, por sempre nos permitir conciliar as atividades do PET com os estudos da melhor maneira.

“Depois o Nautilus aproximou-se das margens africanas onde a profundidade do mar é maior. Ali podíamos admirar, através dos painéis abertos, os belos corais e as vastas extensões de rochedos revestidos de uma esplêndida cobertura de algas. Que espetáculo indescritível...”

**(Vinte mil léguas submarinas – Júlio Verne)**

## RESUMO

As macroalgas vermelhas (Filo Rodophyta) incluem cerca de 7.000 espécies divididas em 830 gêneros. As algas vermelhas calcárias incorporam o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) a sua estrutura, e são divididas em articuladas e não articuladas. As articuladas podem crescer como inscrustações no sedimento ou formando nódulos de vida livre, os rodolitos. Estes servem de berçário e habitat para diversidade marinha a atuam também como sumidouros de carbono atmosférico. Estão agrupadas na subclasse Coralinophycidea. Devido a ampla convergência evolutiva e taxonomia simples, as algas são candidatas ao uso de biologia molecular para resoluções filogenéticas e de espécies, neste trabalho foram usados os marcadores UPA, *rcbL* e *psbA* em amostras coletadas nas praias de Luis Correia (PI) e Pedra Rachada (CE), com objetivo de realizar o levantamento da flora de algas vermelhas não articuladas, através da revisão bibliográfica, amostragem exploratória e análises de sequências de DNA de exemplares coletados. Em campo foi realizada a coleta aleatória seguida por lavagem das amostras em água corrente para remoção de epífitas e após 48h armazenadas com sílica em gel. As etapas do protocolo de extração, purificação e sequenciamento de DNA foram feitas segundo Bellorin et. al. (2002). As sequências foram alinhadas com MAFFT v7.017 e implementadas com Geneious 8.1.8 e comparadas com as já disponíveis no GenBank. Foram construídas árvores de Neighbor-Joining com o modelo de distância genética de Tamura-Nei e 10.000 réplicas de bootstraps. 04 amostras foram sequenciadas para o Ceará e 02 para o Piauí. As amostras do Paracuru apresentaram afinidade com as espécies *Sporolithon episorum*, *Pneophyllum fragile* e *Phymatolithon* sp, e um bom alinhamento com sequencias disponíveis no GenBank. As amostras de Luis Correia apresentaram melhor homologia com o gênero *Sporolithon*, porém com uma distância genética significativa quando comparadas entre si, com a sequência de Paracuru e com outras do GenBank. Estudo anteriores já haviam registrado *Sporolithon episorum* e *Pneophyllum fragile* para o estado do Ceará. Porém, para o Piauí marca a primeira ocorrência de algas vermelhas não articuladas. E o primeiro registro do gênero *Phymatolithon* no Ceará. Este resultado pode indicar uma baixa diversidade do táxon para os estados, onde Ceará e Piauí apresentam baixa diversidade quando comparados a estados com Bahia e Espírito Santo. Contudo, a utilização de um maior número de amostras, mais marcadores moleculares e estudos morfológicos podem auxiliar a refinar os dados.

**Palavras-chave:** Marcadores. Marinhos. DNA. *Barcoding*.

## ABSTRACT

Red macroalgae (phylum Rhodophyta) include about 7,000 species divided into 830 genera. Calcareous red algae incorporate calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) into their structure, and are divided into articulated and non-articulated. The non-articulated can grow as encrustations in the sediment or forming free-living nodules, the rhodoliths. These serve as nursery and habitat for marine diversity and also act as atmospheric carbon sinks. They are grouped in the subclass Corallinophycidea. Due to the wide evolutionary convergence and simple taxonomy, algae are candidates for the use of molecular biology for phylogenetic and species resolutions, in this work the UPA, rcbL and psbA markers were used in samples collected on the beaches of Luis Correia (PI) and Pedra Rachada (CE), with the objective of performing a survey of non-articulated red algae flora through bibliographic review, exploratory sampling and analysis of DNA sequences from collected specimens. In the field, random collection followed by washing the samples in running water to remove epiphytes and after 48h stored with silica gel. The steps of protocol extraction, purification and DNA sequencing were done according to Bellorin et. Al. (2002). The sequences were aligned with MAFFT v7.017 and implemented with Geneious 8.1.8 and compared to those already available on GenBank. Neighbor-Joining trees were constructed with the Tamura-Nei genetic distance model and 10,000 replicas of bootstraps. 04 samples were sequenced for Ceará and 02 for Piauí. Paracuru samples showed affinity with the species *Sporolithon episporum*, *Pneophyllum fragile* and *Phymatolithon* sp, and a good alignment with sequences available in GenBank. The samples of Luis Correia presented better homology with the genus *Sporolithon*, but with a significant genetic distance when compared to each other, with the sequence of Paracuru and others of GenBank. Previous studies had already recorded *Sporolithon episporum* and *Pneophyllum fragile* for the state of Ceará. However, for Piauí it marks the first occurrence of non-articulated red algae. And the first record of the genus *Phymatolithon* in Ceará. This result may indicate a low taxon diversity for the states, where Ceará and Piauí present low diversity when compared to states with Bahia and Espírito Santo. However, the use of a larger number of samples, more molecular markers and morphological studies may help refine the data.

**Keywords:** Markers. Marine. DNA. *Barcoding*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Algas calcárias não articuladas incrustantes. B) Algas calcárias de vida livre	15
Figura 2 – Classificação Atual segundo Nelson et al. (2015)	17
Figura 3 – Árvore de distância de Neighbor-Joining para o marcador UPA. Os valores de bootstraps estão indicados nos nós (10.000 réplicas).	26
Figura 4 – Árvore de Neighbor-Joining para psbA, com 10.000 réplicas de bootstraps. Em vermelho estão a sequências do presente trabalho.	27
Figura 5 – Árvore Neighbor-Joining para o marcador rbcL. Foram utilizadas 10.000 réplicas de bootstraps, os valores estão indicados nos nós.	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Espécimes de Coralinaceae coletados no CE e PI para as quais foram obtidas sequências de UPA, <i>psbA</i> e <i>rbcL</i> (+ presença, - ausência).	20
Tabela 2	- Volumes dos reagentes utilizados para amplificação dos marcadores moleculares.	22
Tabela 3	- Condições de PCR para cada marcador molecular.	23
Tabela 4	- <i>Primers</i> utilizados para PCR e sequenciamento.	23
Tabela 5	- Lista de táxon e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador UPA.	25
Tabela 6	- Lista de táxon e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador <i>psbA</i> .	26
Tabela 7	- Lista de táxons e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador <i>rbcL</i> .	27

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

UPA	Universal Plastidal Amplicon
psbA	Photosystem II protein D1
UFC	Universidade Federal do Ceará
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
CEDECAM	Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Organismos Aquáticos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE E OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Hipótese.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Área de estudo.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Amostragem.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise molecular.....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise do marcador UPA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise do marcador psbA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise do marcador rbcL.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Sinopse dos táxons identificados.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das macroalgas marinhas estão classificadas em verdes (Filo Chlorophyta), vermelhas (Filo Rhodophyta) e pardas (Filo Ochrophyta), que se diferenciam pelo tipo de pigmento fotossintetizante, substância de armazenamento, etc. Mas que possuem algumas características em comum: eucariontes, autotróficas fotossintetizantes, a presença de clorofila *a* e combinações de outros pigmentos, podendo ser uni ou pluricelulares e com ausência de tecidos verdadeiros (GRAHAM; WILCOX, 2000).

As algas são importantes na cadeia trófica, uma vez que constituem a base da produtividade primária nos oceanos, através da fotossíntese, além de ser a principal fonte de alimentação para os consumidores primários (LEE, 2008). A sua importância também está ligada ao seu potencial uso para os humanos, como fonte de alimentação, suplementação, ração para animais e corretivos de solo na agricultura (SANTIAGO, 2016).

As algas vermelhas são o grupo mais diverso e um dos mais antigos entre as macroalgas. Possuem ampla distribuição em todo o globo e podem ser encontradas tanto em águas tropicais quanto em águas temperadas (NUNES et al., 2008). É um grupo que possui cerca de 7.000 espécies distribuídas em aproximadamente 830 gêneros, habitando tanto ambientes de água doce quanto marinhos (GRAHAM; WILCOX, 2000). O grupo apresenta cloroplastos com clorofila *a* e pigmentos acessórios, como as ficobilinas e parede celular de celulose, com matriz mucilaginosa de polissacarídeos que são denominados de ágar ou carragenanas. Outra característica das algas vermelhas são as ligações presentes entre as células conhecidas como “pit connections” (SANTIAGO, 2016).

Em algumas algas vermelhas, há a deposição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) sendo por isso denominadas de algas calcárias. O acúmulo de carbonato de cálcio se dá na forma de cristais de calcita (DIAS, 2001). Segundo Foster (2001), estas algas podem ser classificadas em dois grupos: as articuladas e as não articuladas. As algas calcárias articuladas apresentam juntas não calcificadas, os genículos, intercaladas por regiões com presença de carbonato de cálcio, conhecidos como os intergenículos. Já as algas não articuladas são inteiramente calcificadas, com hábitos variáveis (Figura 01), podendo se apresentar de forma aderida ao substrato (incrustações) ou de forma livre (SISSINI, 2013).

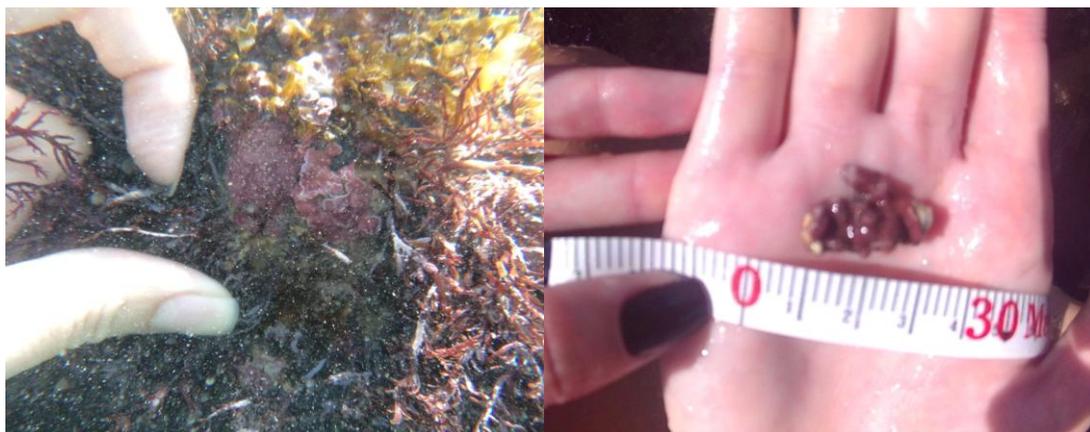


Figura 1 – A) Algas calcárias não articuladas incrustantes. B) Algas calcárias de vida livre. Fonte: o Autor.

As algas calcárias possuem grande importância ecológica. Elas formam, por exemplo, rodolitos, que são estruturas em formas de nódulos de vida livre capazes de ocupar áreas extensas da plataforma continental de todos os oceanos (FOSTER, 2001). Devido à grande extensão de seus depósitos, o banco existente na região de Abrolhos vem sendo apontado como um dos maiores bancos existentes no mundo (AMADO-FILHO et al., 2010). Estes bancos são conhecidos mundialmente devido a sua importância no meio marinho, servindo como berçários e habitats para várias espécies, uma vez que podem abrigar uma alta diversidade (VERAS, 2011), sendo essenciais também para a construção de recifes de corais, atuando como bioconstrutores. Além de proteger o ecossistema da ação de ondas (FOSTER, 2001).

Do ponto de vista ecológico também existem evidências abundantes sobre as contribuições de comunidades compostas por algas calcárias no ciclo do carbono em regiões de plataforma continental, devido às suas altas taxas de deposição e produção do carbonato de cálcio, atuando como sumidouros de carbono da atmosfera, processo que vem sendo prejudicado pelas mudanças globais aceleradas pela interferência antrópica. (AMADO-FILHO et al., 2012).

Além disso, as algas calcárias possuem importância econômica, uma vez que são a principal componente dos bioclastos marinhos, servindo de matéria-prima para agricultura, sendo utilizado como fertilizantes e corretores de pH do solo através da produção de cal; na indústria de cosméticos para a produção de sais de banho e cremes dentais; como fonte de calcário para a indústria da construção e até implantes ósseos; e na indústria alimentícia como complemento alimentar. Outro uso está ligado a potabilização das águas, através da filtração de água sobre uma camada de algas calcárias, gerando uma neutralização (DIAS, 2001).

## **MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE RODOLITOS**

Os bancos de rodolitos estão presentes em quase toda plataforma continental brasileira, indo do Maranhão até Santa Catarina (HORTA ET al., 2016). Suas comunidades desenvolvem-se preferencialmente na zona mesofótica, no topo de montes submarinos e próximos as ilhas oceânicas (AMADO-FILHO et al., 2012).

A morfologia, a abundância, a densidade e o tamanho dos rodolitos de um determinado banco, podem variar bastante, sendo influenciados pelas condições hidrodinâmicas do local (QUEIROZ et al. 2016). Cavidades, protuberâncias e outras modificações são capazes de determinar os morfotipos de rodolitos, podem também determinar a diversidade das comunidades que a eles estão associadas. (AMADO-FILHO et al., 2010; BELANDI et al., 2012; QUEIROZ et al., 2016). Por exemplo, a maior diversidade organismos marinhos da costa brasileira está no estado do Espírito Santo e isto tem sido associado à presença de grandes áreas de rodolitos. (AMADO-FILHO et al., 2007).

Horta et al. 2016 cita o registro de 48 espécies de algas calcárias não articuladas para a costa brasileira, onde 26 destas são conhecidas pela formação de rodolitos.

## **CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

Atualmente, as algas vermelhas que acumulam  $\text{CaCO}_3$  estão classificadas nas Ordens Corallinales, Sporolithales, Hapalidiales e Rhodogorgonales. Essas ordens integram a subclasse Corallinophycidae que constitui o terceiro grupo mais diverso entre as rodófitas, com cerca de 600 espécies conhecidas em nível mundial, onde 48 espécies não articuladas já foram descritas para o Brasil. (HORTA et al., 2016)

No entanto, ao longo da história, a classificação de algas calcárias mudou consideravelmente. A taxonomia dessas algas tradicionalmente foi baseada em dados morfológicos, anatômicos, bioquímicos, ultraestruturais e moleculares. Segundo a proposta de Harvey et al. (2003), essas algas calcárias seriam divididas em apenas três famílias, pertencentes à ordem Corallinales: Corallinaceae, Hapalidiaceae e Sporolithaceae. No entanto, a partir de observações ultra-estruturais da anatomia dos tampões proteicos e análises multigênicas (SSU, LSU e EF2), foi estabelecido o parentesco entre Corallinales e a ordem Rhodogorgonales, que foram por tanto, agrupadas na subclasse Corallinophycidae (LE GALL

E SAUNDERS 2007). Posteriormente, tanto a família Sporolithaceae quanto Hapalidiaceae foram elevadas para o nível de ordem (LE GALL et al. 2010; NELSON et al. 2015) chegando a classificação atualmente aceita (Figura 02).

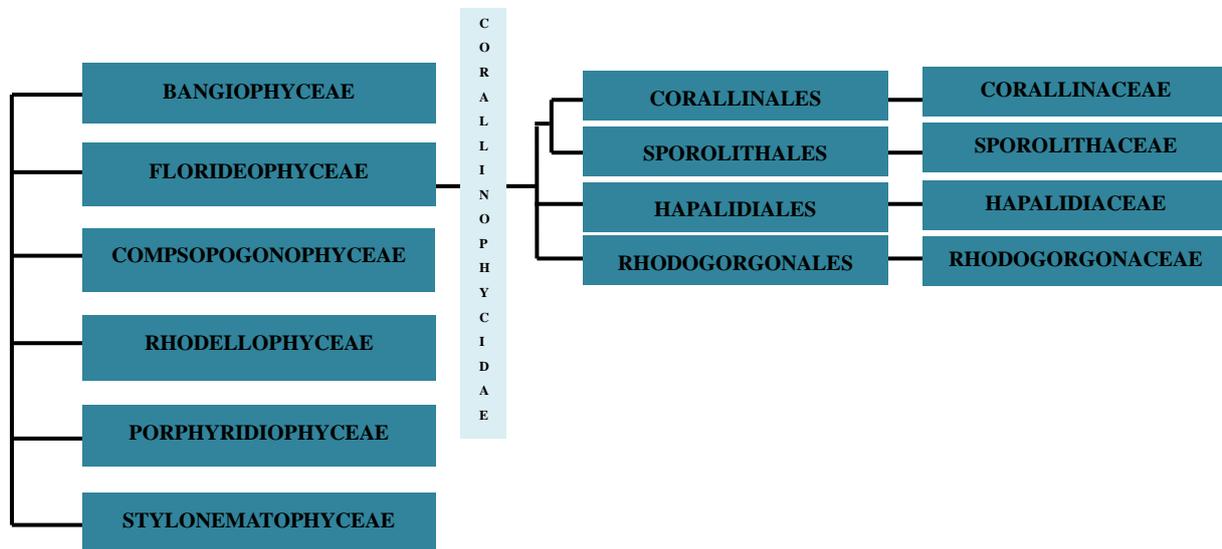


Figura 2 – Classificação atual de Rodophyta segundo Nelson et al., (2015). Elaborado pelo autor.

## TAXONOMIA MOLECULAR

Após a descoberta da estrutura química do DNA por Watson e Crick na década de 50 foi possível um maior entendimento dos seres vivos. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o estudo dos seres vivos a partir do seu código genético. Um dos avanços mais significativos foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (MULLIS; FALOONA, 1987), uma forma de replicação do DNA de forma mais simplificada, já que não há necessidade de clonagem (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007).

Com o advento do DNA *barcoding*; que corresponde a uma sequência genética muito curta de uma parte padrão do genoma, (HEBERT et al., 2003) vários estudos moleculares realizados nos últimos quinze anos fornecerem uma boa delimitação sobretudo de espécies complexas. (SAUNDERS, 2005; SHERWOOD et al, 2010a, b). Devido a sua morfologia simples, ampla convergência evolucionária e grande plasticidade fenotípica as macroalgas marinhas têm se tornado fortes candidatas para o uso de técnicas de genética molecular (SAUNDERS, 2005).

No caso das macroalgas vários marcadores moleculares foram propostos para uso de *barcoding*, entre eles UPA, *rbcL* e *psbA*. O *Universal Plastid Amplicon* – (UPA) com uma

taxa de sucesso de 64,7% (Sherwood et. al., 2010b), corresponde a uma região do cloroplasto que transcreve o RNAr 23S, integrante da subunidade grande do ribossomo. Possui aproximadamente 362 pb rodeados por sequências bem conservadas podendo ser usadas como “primers” universais, além de serem de fácil amplificação. (SISSINI, 2013; SANTIAGO, 2016).

O gene *psbA* é responsável por transcrever a proteína D1 da membrana tilacoidal do fotossistema II, também de origem plastidial. Possui cerca de 1.050pb. Foram inicialmente desenvolvidos por Yoon et al., (2002), apresentam uma boa resolução filogenética para exemplares da Nova Zelândia, além de apresentar variação interespecífica em nível de espécies já conhecidas e identificação de novas espécies de Corallinophycidae (SISSINI, 2013).

O marcador molecular *rbcL* é corresponde ao gene que transcreve para a subunidade grande da ribulose-1,5-bifostato carboxilase/oxigenase e possui cerca de 1.350 pb. Apresentou sucesso em resolver questões como posicionamento de espécies e reconstruções filogenéticas (SISSINI, 2013).

## **2. OBEJTIVOS E HIPÓTESE:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo realizar o levantamento da flora ficológica de algas vermelhas não articuladas, através de uma revisão bibliográfica, amostragem exploratória e análises de sequências de DNA de exemplares coletados em praias dos estados do Ceará e Piauí.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a revisão bibliográfica para o Brasil;
- Obtenção e caracterização de sequências de DNA para os genes plastidiais UPA, *rbcL* e *psbA*.
- Identificação das amostras coletadas no meso e infralitoral de praias do Ceará e do Piauí com base nas sequencias descritas;
- Comparação dos resultados obtidos com aqueles já descritos para o Brasil;

### **2.3 HIPÓTESE**

A utilização de marcadores moleculares pode auxiliar na identificação das espécies de algas vermelhas calcárias não articuladas do litoral do Ceará e Piauí.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Área de Estudo

A região em que estão localizadas as praias do presente estudo faz parte do Nordeste do Brasil, apresentando clima semi-árido, com média pluviométrica baixa. A região tem sua margem continental interna composta por siliclásticos; é caracterizada por aporte fluvial atingindo apenas a plataforma interna, devido a baixa pluviosidade e vazão dos rios; apresenta sedimentos carbonáticos, principalmente pela sedimentação de algas calcárias e carapaças de animais. Sofrem influência direta de correntes de maré e oceânica (CARNEIRO & MORAIS, 2016).

#### 3.2 Amostragem

Na Tabela 1, são apresentados os dados dos exemplares analisados mostrando o código de identificação, o local da amostragem, localização geográfica e os marcadores amplificados e sequenciados.

Tabela 1 – Espécimes de Coralinaceae coletados no CE e PI para as quais foram obtidas sequências de UPA, *psbA* e *rbcL* (+ presença, - ausência).

CÓDIGO DA AMOSTRA	LOCAL DE COLETA	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	UPA	<i>rbcL</i>	<i>psbA</i>
MPA1	<i>Praia da Pedra Rachada, Paracuru – CE</i>	03° 23' 52,0" S 39° 00' 47,2" W	+	+	+
MPA2	<i>Praia da Pedra Rachada, Paracuru – CE</i>	03° 23' 52,0" S 39° 00' 47,2" W	+	+	+
MPA3	<i>Praia da Pedra Rachada, Paracuru – CE</i>	03° 23' 52,0" S 39° 00' 47,2" W	+	-	-
MPA4	<i>Praia da Pedra Rachada, Paracuru – CE</i>	03° 23' 52,0" S 39° 00' 47,2" W	-	-	-
PRA3	<i>Praia de Luis Correa- PI</i>	02° 55' 40" S 41° 20' 10" W	-	+	-
PRA4	<i>Praia de Luis Correa- PI</i>	02° 55' 40" S 41° 20' 10" W	-	+	-

Fonte: O autor.

As coletas foram realizadas de acordo com os horários da baixa-mar de sizígia nas regiões de mesolitoral, tendo como base os valores da tábua de maré. Já na região do infralitoral foram realizadas através de mergulho autônomo. As coletas de espécimes foram realizadas de forma aleatória, analisando a presença de material vivo nas amostras. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos com água do mar e levadas para o laboratório.

Em laboratório as amostras foram lavadas em água doce, para remoção manual de epífitas com ajuda de escova, e secas a sombra durante um período entre 24h e 48h.

Após isto, as amostras foram divididas em 02 fragmentos com ajuda de um martelo, onde um dos fragmentos foi armazenado em potes com sílica gel para desidratação rápida, para fins de conservação do DNA e utilização nas análises moleculares.

Todas as amostras obtidas foram analisadas no Laboratório de Genética Molecular do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) e Laboratório de Macroalgas, pertencentes ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará - UFC.

### **3.3 Análise Molecular**

As etapas do protocolo de extração, purificação e sequenciamento de DNA foram feitas segundo (BELLORIN et al. 2002), com ressalvas por se tratar de algas com presença de carbonato de cálcio.

Para extração de DNA foram utilizados os fragmentos armazenados em sílica gel a temperatura ambiente, protegidas de sol e calor. Com auxílio de grãos, pistilos e cadinhos esterilizados em autoclave, os fragmentos foram macerados até virar pó com nitrogênio líquido sendo posteriormente adicionadas 2mL de solução tampão de extração ((CTAB) 1,5%, NaCl 1M, EDTA 50mM, Tris 0,1 M pH 8,0), com pipetagens da solução restante para tubos de 2mL, onde cada tubo foi etiquetado conforme a identificação da amostra. Após foram adicionados 5uL de  $\beta$ -mercaptoeatanol 0,2% a cada tubo.

Para a mistura das fases, as amostras foram agitadas e incubadas por 30 minutos em banho-maria a 65°, onde foram adicionados 1mL de Clorofil (solução de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1) a cada microtubo e em seguida foi feita a agitação manual por cerca de dois minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm em temperatura ambiente (25°) durante 10 minutos. Foram formadas duas fases líquidas e uma interface em cada tubo, onde se pipetou apenas a parte aquosa (superior), com cuidado para não pipetar próximo ao

precipitado formado entre as duas fases, que foi transferida para um tubo de 1,5 mL. Em seguida o resíduo foi descartado de forma adequada, e foi completado o volume de 1,5 mL com álcool isopropílico gelado. Os microtubos foram agitados manualmente e pode-se observar a formação das “nuvens” de DNA.

A incubação *overnight* foi utilizada apenas em algumas extrações, que consiste em armazenar os tubos a -20°C por 12 horas; após este período são retirados até alcançar a temperatura ambiente. Nas extrações que não houve o *overnight* as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm durante 20 minutos a 4° C.

Posteriormente, houve a centrifugação por 5 minutos a 13.400 rpm e temperatura ambiente, tanto em amostras *overnight* como não. Foi formado um pellet de DNA no fundo do microtubo que posteriormente foi vertido para desprezar a fase líquida, sem dispensar o pellet. Para a lavagem as etapas seguintes foram repetidas por três vezes: 1. Completar o volume do tubo com álcool etílico 70% (Merck e água mili-Q); 2. Centrifugar durante 05 minutos a 20111 rpm em temperatura ambiente; 3. Desprezou-se cerca de 50% da fase líquida, quando o pellet não era visível.

Os tubos foram deixados abertos até a evaporação do álcool. Por fim, foram pipetados 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,1 mM EDTA) em cada microtubo para ressuspender o DNA e guardados em freezer para preservação. Posteriormente foi realizada a etapa de quantificação do DNA através do uso de um espectrofotômetro NanoDrop 2000c.

A amplificação dos marcadores foi feita em tubos Eppendorf de 200 µL expostos a radiação UV durante 20 minutos e esterilizados. O mix de PCR foi preparado conforme os volumes e reagentes apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Volumes dos reagentes utilizados para amplificação dos marcadores moleculares.

<b>Marcador</b>	<b>1 X PCR Buffer</b>	<b>1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	<b>0,2 mM cada dNTP</b>	<b>0,2 mM de cada primer*</b>	<b>Taq DNA polimerase (5U/ µL)</b>	<b>Água ultrapura</b>	<b>DNA extraído</b>	<b>Volume final</b>
<b>UPA</b>	1,0 MI	0,6 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,11 µL	6,68 µL	1,0 µL	10 µL
<b><i>rbcL</i></b>	1,0 MI	0,6 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,11 µL	6,68 µL	1,0 µL	1,0 µL
<b><i>psbA</i></b>	1,0 MI	0,6 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,25 µL	6,55 µL	1,0 µL	10 µL

Fonte: O autor

As reações de PCR foram feitas no termociclador Veriti de 96 poços (Applied Biosystems) e os ciclos de cada marcador são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições de PCR para cada marcador molecular

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Ciclos
UPA	94°C / 2'	94°C / 30''	51°C / 30''	72°C / 30''	72°C / 10'	34
<i>rbcL</i>	94°C / 4'	94°C / 1'	45°C / 1'	72°C / 90''	72°C / 8'	35
<i>psbA</i>	94°C / 2'	94°C / 30''	47°C / 1'	72°C / 2'	72°C / 7'	30

Fonte: O autor.

As regiões de interesse foram amplificadas com iniciadores (*primers*) descritos previamente para micro e macroalgas (BELLORIN et al. 2002; SHERWOOD & PRESTING, 2007; SHERWOOD, 2010). As respectivas sequências são apresentadas na Tabela 4.

Para identificação em nível de espécie, as sequências foram obtidas através do sequenciamento por ciclagem dos produtos da PCR com uso do kit Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) e leitura no sequenciador capilar automático ABI 3500.

Tabela 4 – *Primers* utilizados para PCR e sequenciamento.

Primer	Marcador	Sequência
UPA F	UPA	5'- GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA - 3'
UPA R	UPA	5'- TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG - 3'
<i>psbA</i> F	<i>PsbA</i>	5'- ATG ACT GCT ACT TTA GAA AGA CG - 3'
<i>psbA</i> R2	<i>PsbA</i>	5'- TCA TGC ATW ACT TCC ATA CCT A - 3'
<i>psbA</i> 500F	<i>PsbA</i>	5'- CTC TGA TGG WAT GCC WYT AGG - 3'
<i>psbA</i> 600R	<i>PsbA</i>	5'- CCA AAT ACA CCA GCA ACA CC - 3'
<i>psbA</i> 550R	<i>PsbA</i>	5'- TTR TGT TCR GCY TGR AAT AC - 3'
F577	<i>RbcL</i>	5' – GTATATGAAGGTCTAAAAGGTGG – 3'
R1381	<i>RbcL</i>	5' - ATCTTTCCATAGATCTAAAGC - 3'

Fonte: O autor.

As sequências obtidas foram alinhadas com MAFFT v7.017 (KATO et al. 2002) implementado com Geneious 8.1.8, e as inconsistências nas sequências foram revisadas pela checagem dos cromatogramas, as sequências obtidas foram comparadas com aquelas já

disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Para as sequências dos marcadores UPA, *psbA* e *rbcL*, foram construídas árvores por Neighbor-Joining (NJ). O algoritmo NJ (SAITOU & NEI, 1987) foi implementado com o auxílio do "Geneious Tree Builder" através do modelo de distância genética de Tamura-Nei, com 10.000 réplicas de bootstraps.

#### 4. RESULTADOS

O presente estudo gerou 09 novas sequências onde 03 são de UPA, 04 são de rbcL e 02 de psbA. O marcador UPA, dada sua facilidade de amplificação em algas, foi utilizado para gerar os dados iniciais de diversidade através do agrupamento das espécies.

##### 4.1 Análise de dados do marcador UPA

A matriz de sequências-consenso para o marcador UPA é composta por 370 pb. Foram geradas 03 sequências com sucessos para o marcador. A Tabela 5 mostra número de acesso no GenBank e referências para as sequências utilizadas na análise.

Tabela 5 – Lista de táxon e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador UPA

<b>Amostra</b>	<b>Melhor Homologia</b>	<b>Acesso</b>	<b>Similaridade (Blast)</b>	<b>Valor E (Blast)</b>	<b>Cobertura (Blast)</b>
<b>MPA1</b>	<i>Sporolithon</i> sp.	KP192382.1	100%	0.0	99%
<b>MPA2</b>	<i>Phymatolithon</i> sp	HQ421548.1	96%	1e-173	99%
<b>MPA3</b>	<i>Phymatolithon</i> sp	HQ421548.1	95%	7e-172	99%

Fonte: O autor.

No dendograma resultante é possível observar um agrupamento consistente dos gêneros, com forte suporte de bootstraps. Através da análise de Neighbor-Joining representada na figura 03, é possível identificar que as amostras aparecem divididas em 03 clados diferentes, agrupados por gêneros, onde a espécie *Gracilaria caudata* aparece como sequência externa ao grupo alvo.

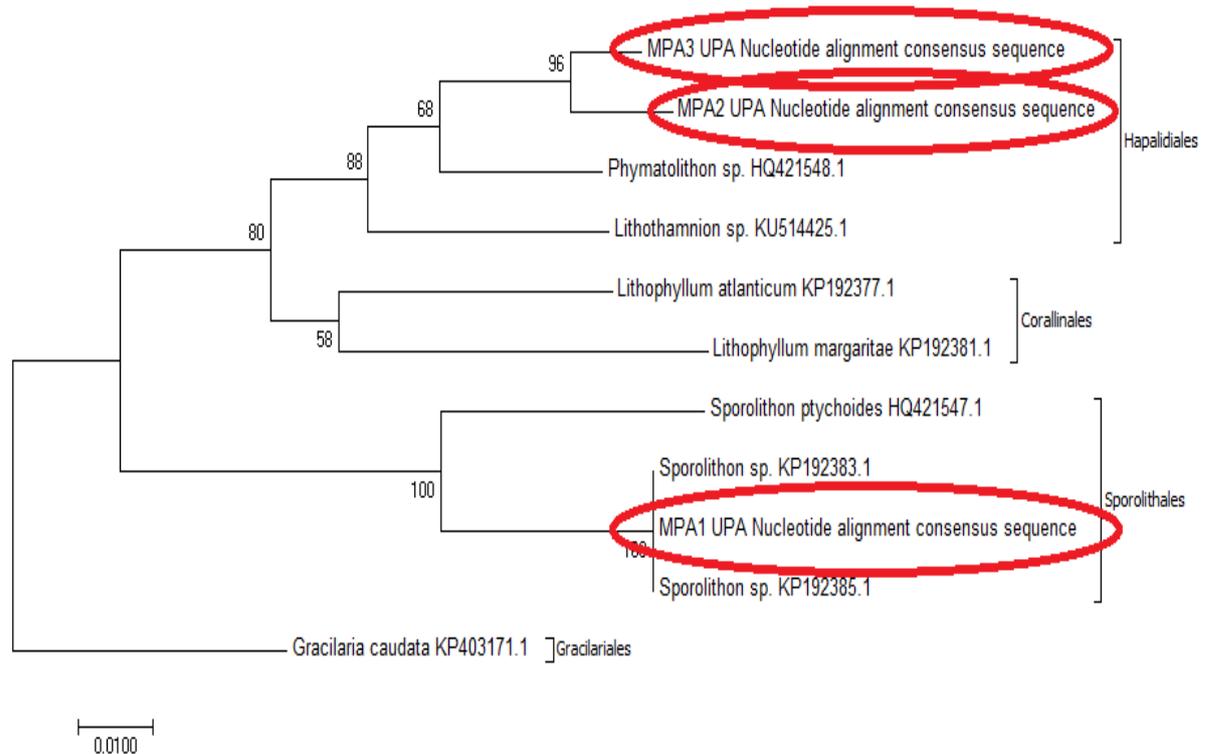


Figura 3 - Árvore de distância de Neighbor-Joining para o marcador UPA. Os valores de bootstraps estão indicados nos nós (10.000 réplicas). Fonte: O autor.

#### 4.2 Análise de dados do marcador *psbA*

A matriz de sequências-consenso para o marcador *psbA* contém 700 pb. 02 amostras foram sequenciadas para o seguinte marcador. O número de acesso ao GenBank para as sequências utilizadas nas análises são mostradas na tabela 06.

Tabela 6 – Lista de táxon e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador *psbA*.

Amostra	Melhor Homologia	Acesso	Similaridade (Blast)	Valor E (Blast)	Cobertura (Blast)
MPA1	<i>Sporolithon episorum</i>	KC870925.2	99%	0.0	100%
MPA2	<i>Pneophyllum fragile</i>	KT78347.1	93%	0.0	100%

Fonte: o Autor.

No dendograma abaixo há um agrupamento consistente dos gêneros, suportados por altos valores de bootstraps presentes nos nós. Através da análise da figura 4, é possível inferir que as amostras estão divididas em 02 clados diferentes, referentes aos gêneros em que se

agrupam, a sequência *Ceramium tenerrimum* aparece como sequência externa ao grupo alvo.

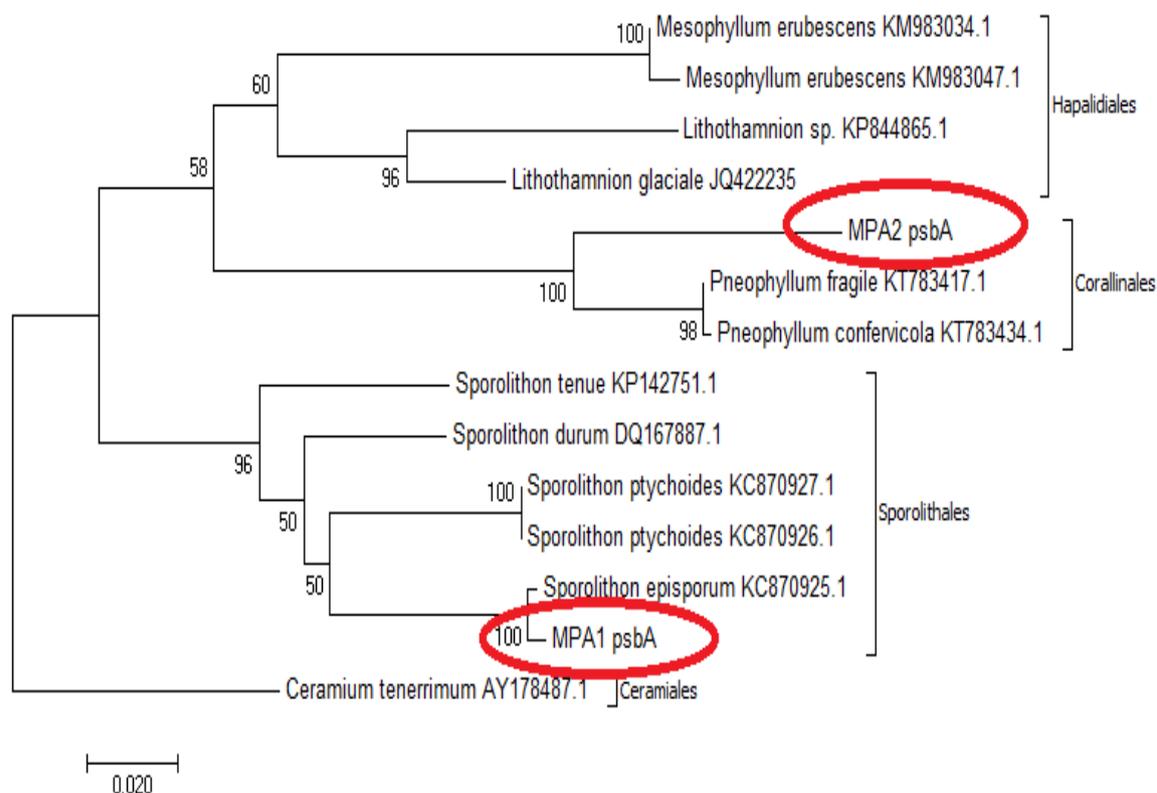


Figura 4 - Árvore de Neighbour-Joining para *psbA*, com 10.000 réplicas de bootstraps. Em vermelho estão a sequências do presente trabalho. Fonte: o Autor.

### 4.3 Análise de dados do marcador *rbcL*

Das amostras iniciais deste trabalho, 04 foram sequenciadas com sucesso para o marcador *rbcL*, a matriz de sequências-consenso para o marcador contém 612 pb. O Número de acesso ao GenBank para as sequências utilizadas nas análises são mostradas na tabela 07.

Tabela 07 – Lista de táxons e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para o marcador *rbcL*.

Amostra	Melhor Homologia	Acesso	Similaridade (Blast)	Valor E (Blast)	Cobertura (Blast)
MPA1	<i>Sporolithon</i> sp	KP142786	91%	0.0	100%
MPA2	<i>Pneophyllum fragile</i>	KM369155.1	85%	1e-170	100%
PRA3	<i>Sporolithon</i> sp.1	KP142786.1	93%	0.0	99%
PRA4	<i>Sporolithon</i> sp.2	KP142786	92%	0.0	100%

Fonte: O autor.

A figura 5 nos traz a representação da árvore de neighbor-joining para o marcador *rbcL*. Na figura é possível observar as amostras distribuídas em 02 cladogramas diferentes, divididas por gênero, com a sequência *Gelidium crinale* sendo indicada como a sequência externa ao grupo. Ao analisar os valores dos nós, as amostras PRA3 e PRA4, mesmo sendo do mesmo local de coleta, apresentam uma distância genética significativa entre si e entre a sequência de comparação.

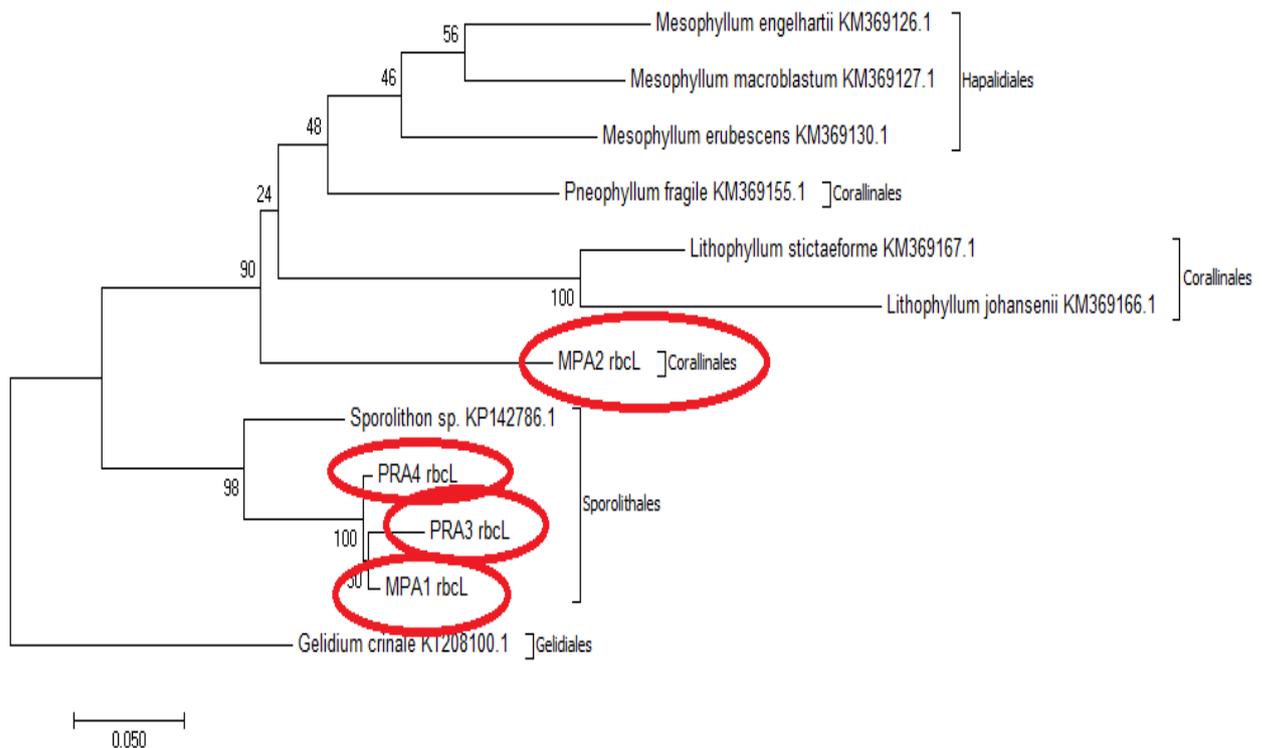


Figura 5 – Árvore Neighbor-Joining para o marcador *rbcL*. Foram utilizadas 10.00 réplicas de bootstraps, os valores estão indicados nos nós. Fonte: o Autor.

#### 5.4 Sinopse dos táxons identificados

A partir das sequências obtidas foram obtidas 05 espécies pertencentes a 02 gêneros: *Sporolithon episporum*, *Sporolithon sp1*, *Sporolithon sp.2.*, *Pneophyllum fragile* e *Phymatolithon sp.*

#### Rhodophyta

##### Florideophyceae

##### Coralinophycideae

##### Coralinales

**Corallinaceae***Pneophyllum fragile* Kützing**Lithothamniaceae***Phymatolithon* sp.**Sporolithales****Sporolithaceae***Sporolithon* sp. 1*Sporolithon* sp.2*Sporolithon episporum* (M. Howe) E.Y. Dawson

A sequência MPA1 foi similar a *Sporolithon episporum* de acordo com o marcador *psbA*.

A sequência MPA2 apresentou uma maior afinidade com a espécie *Pneophyllum fragile* sustentado pelos marcadores *psbA* e *rbcL*.

A sequência MPA3, de acordo com o marcador UPA, apresentou afinidade com a espécie *Phymatolithon* sp.

O marcador *rbcL* identificou PRA3 e PRA4 como *Sporolithon* sp.1 e *Sporolithon* sp.2, respectivamente.

*Sporolithon episporum* (M.Howe) E.Y.Dawson

LOCALIDADE TIPO: Point Toro, Panamá (Silva, Basson & Moe 1996: 276).

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e São Paulo.

OCORRÊNCIA NO PRESENTE TRABALHO: Praia da Pedra Rachada, Paracuru – Ceará.

*Pneophyllum fragile*

LOCALIDADE TIPO: Mar Mediterrâneo (Silva, Basson & Moe 1996: 268).

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: Ceará; Espírito Santo; Paraíba; Pernambuco; Paraná; Rio de Janeiro; Rio Grande do Sul; Sergipe; São Paulo.

OCORRÊNCIA NO PRESENTE TRABALHO: Praia da Pedra Rachada, Paracuru – Ceará.

## 5. DISCUSSÃO

Poucos estudos abordaram as algas calcárias no estado do Ceará, sobretudo das espécies não articuladas. As espécies *Mesophyllum erubescens*, *Lithothamnion* sp. e *Sporolithon* sp. já haviam sido registradas por Sissini (2013) para o Parque da Pedra da Risca do Meio. Já o trabalho de Menezes et. al. (2015) registra a ocorrência *Sporolithon episporum* e *Pneophyllum fragile* no estado do Ceará.

No presente trabalho foram registradas espécies *Sporolithon episporum*, *Pneophyllum fragile* para o Ceará, confirmando os dados de Menezes et al. (2015). Porém a identidade da amostra MPA2 apresentou diferenças entre os marcadores. Segundo UPA essa amostra apresenta grande similaridade com *Phymatolithon* sp. Por outro lado, tanto *psbA* quanto *rbcL* apontaram maior semelhança com *Pneophyllum fragile*. Como UPA é menos específico que os demais marcadores, sobretudo que o *psbA* (SHERWOOD et. al. 2010a), que foi desenvolvido visando o *barcoding* de algas, optou-se por seguir a identificação desse último. Com isto, e considerando os resultados de Sissini (2013) foi confirmada a ocorrência das ordens Sporolithales, Coralinales e Hapalidiales no Ceará.

No entanto, a amostra MPA3 com indicativo de *Phymatolithon* sp. pelo marcador *rbcL*, marca o primeiro registro do gênero *Phymatolithon* para o estado do Ceará. No entanto, os dados moleculares apresentam uma leve confusão do gênero *Phymatolithon* com *Pneophyllum*, isto pode ser explicado pelas relações filogenéticas dos gêneros, uma vez que estão agrupados na mesma ordem.

O presente estudo é o primeiro a registrar a ocorrência de algas calcárias não articuladas para o estado do Piauí, possivelmente tendo sido encontradas duas espécies do gênero *Sporolithon*. A amostra identificada como *Sporolithon* sp.2 (PRA4) apresentou uma grande afinidade com a sequência de *Sporolithon episporum* identificado na praia do Paracuru, indicando a possibilidade de registro da espécie para ambos os estados. Já a amostra identificada como *Sporolithon* sp.1 (PRA3) apresentou uma divergência considerável quando comparada tanto com *Sporolithon* sp.2 quanto com *Sporolithon episporum*, o que sugere a presença de mais de uma espécie do gênero para o Piauí.

Sissini (2013) identificou um *Sporolithon* sp. que aparenta se tratar de uma espécie nova ainda não nomeada. Essa espécie, porém, apresenta diferenças genéticas consideráveis com as espécies encontradas no Piauí. O mesmo vale para *Sporolithon* sp. registrado por Vieira-Pinto et al. (2014) na Paraíba. Portanto novos estudos são necessários para refinar a taxonomia das espécies piauienses, sobretudo de *Sporolithon* sp.1.

No que tange a morfologia, *Sporolithon episporum* é identificada como formadora de rodolitos (HORTA et al. 2016) apresentando um talo fortemente calcificado que dá origem à crostas de até 5mm de espessura e diâmetro indeterminado (LITTLER & LITTLER 2000). No Brasil, a espécie foi registrada, sobretudo na região Nordeste do Brasil, porém também foi encontrada no estado de São Paulo (MENEZES et al. 2015), indicando uma tolerância as variações de temperatura com preferência por águas tropicais.

A espécie *Pneophyllum fragile* também é formadora de rodolito (HORTA et al. 2016), porém sua morfologia é mais delicada que a de *Sporolithon episporum*, com a espécie assumindo formas prostradas, com no máximo 20 µm de espessura e até 2.0mm diâmetro, formando pequenas e finas crostas sobre o substrato (LITTLER & LITTLER 2000). Além das características morfológicas, *P. fragile* tem uma distribuição mais ampla que *S. episporum*, tendo sido registrada ao longo de toda a costa brasileira, desde o Ceará até o Rio Grande do Sul (MENEZES et al. 2015), o que sugere uma maior plasticidade dessa alga em colonizar desde águas tropicais até águas subtropicais. Evidencia também, a sua capacidade de habitar toda a plataforma continental brasileira, passando por todas as características oceanográficas que agem sobre a sua extensão. Isso indica que é possível distinguir ambas as espécies encontradas para o Ceará tanto visualmente quanto por características ecológicas.

Estudos anteriores sugeriram uma diversidade composta por uma maior variedade de espécies do que as encontradas no presente trabalho (SISSINI, 2013), isto pode indicar uma diversidade ainda não revelada para o litoral do Piauí e do Ceará, porém, é necessário uma maior abrangência de locais de amostragem e um maior número de amostras.

O presente trabalho registra a primeira ocorrência de algas calcárias não articuladas para o estado do Piauí. Já para o estado do Ceará, marca o primeiro registro do gênero *Phymatolithon*, até então registrado apenas para São Paulo e Santa Catarina (MENEZES et al., 2015). Este resultado pode ser um indicador de baixa diversidade para o táxon no Ceará. No entanto, é preciso levar em consideração o número baixo de sequências consideradas no presente estudo. Novos levantamentos são necessários para então haver confirmação a respeito da diversidade dos estados.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram identificados 04 espécies de algas vermelhas não articuladas, pertencentes a 03 gêneros: *Sporolithon episporum*, *Pneophyllum fragile* e *Phymatolithon* sp. (CE) e *Sporolithon episporum* e *Sporolithon* sp.1 (PI).

As sequências de *Sporolithon episporum* e *Pneophyllum fragile* apresentaram bons alinhamentos com sequências disponíveis do GenBank.

A espécie *Sporolithon* sp.1 da Praia de Luis Correia mostrou uma necessidade de estudos complementares para sanar as dúvidas em relação a sua classificação, e conferir a possibilidade de espécies novas, uma vez que há divergência entre a amostra de Paracuru e Luis Correia quando comparadas entre si e com outras amostras já registradas ao longo da costa brasileira.

O Nordeste semi-árido apresenta uma diversidade baixa em relação a estados como Bahia e Espírito Santo, responsáveis pela maior diversidade de algas marinhas no Brasil (Menezes et al. 2015). Porém, este é o primeiro estudo que identifica a possível ocorrência de *Sporolithon* sp. para o estado do Piauí.

Os dados moleculares se mostraram suficientes para identificação de espécies de algas calcárias vermelhas no Ceará e Piauí, porém a utilização de mais marcadores moleculares e estudos morfológicos pode auxiliar a refinar os dados de diversidade.

## REFERÊNCIAS

AMADO-FILHO, G. M. et al. Estructura de los mantos de rodolitos de 4 a 55 metros de profundidad en la costa sur del estado de Espírito Santo, Brasil. **Ciencias Marinas**. P. 399-410. 2007.

AMADO-FILHO, G. M. et al. **Rhodolith beds are major CaCO<sub>3</sub> bio-factories in the tropical South West Atlantic**. PloSone, v. 7, n. 4, p. e35171, jan. 2012.

BAHIA, Ricardo G. et al. *Sporolithon tenuesp.* nov. (Sporolithales, Corallinophycidae, Rhodophyta): A new rhodolith-forming species from the tropical southwestern Atlantic. **Phycological Research**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.44-54, 14 nov. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pre.12033>.

BELLORIN, A. M.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, E. 2002. **Phylogeny and systematics of the Marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small Subunit rDNA and its sequences of Atlantic and Pacific species**. *J. Phycol.* 38:551-563.

CARNEIRO, Pedro Bastos de Macêdo; MORAIS, Jader Onofre de. **Carbonate sediment production in the equatorial continental shelf of South America: Quantifying *Halimeda incrassata* (Chlorophyta) contributions**. *Journal Of South American Earth Science*. South America, p. 1-6. Julho, 2016.

CARVALHO, Hernandes F; RECCO-PIMENTEL, Shirlei Maria. **A célula**. 2. ed. Barueri: Editora Manole Ltda., 2007, 2007. 380 p.

DIAS, Gilberto T. M.. GRANULADOS BIOCLÁSTICOS – ALGAS CALCÁRIAS. **Brazilian Journal Of Geophysics**. Online, p. 307-318.2001.

FOSTER, Michael S.. RHODOLITHS: BETWEEN ROCKS AND SOFT PLACES. **Journal**

**Of Phycology**. Online, out. 2001. p. 659-667.

GRAHAM, Linda E.; WILCOX, Lee W.. **Algae**. [s.l]: Universidade da California, 2000. 616p.

HARVEY, A.S.; BROADWATER, S.T.; WOELKERLING W.J. & MITROVSKI, P.J. (2003) **Choreonema (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae**. *Journal of Phycology* 39: 988–998.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 270, n. 1512, p.313-321, 7 fev. 2003. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

HORTA, Paulo Antunes et al. Rhodoliths in Brazil: Current knowledge and potential impacts of climate change. **Brazilian Journal Of Oceanography**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.117-136, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-875920160870064sp2>.

KATO, K.. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 30, n. 14, p.3059-3066, 15 jul. 2002. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/nar/gkf436.

LEE, Robert Edward. **Phycology**. 4. ed. São Paulo: Cambridge University Press, 2008.

LE GALL, L. & SAUNDERS, G.W. (2007). **A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: Establishing the new red algal subclass Corallinophycidae**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1118-1130.

LE GALL, L.; PAYRI, C.E.; BITTNER, L. & SAUNDERS, G.W. (2010). **Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 302-305.

MENEZES, Mariângela et al. Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. **Rodriguésia**, [s.l.], v. 66, n. 4, p.1047-1062, 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566408>.

NELSON, W.A., SUTHERLAND, J.E., FARR, T.J., HART, D.R., NEILL, K.F., KIM, H.J. & YOON, H.S. (2015). **Multi-gene phylogenetic analyses of New Zealand coralline algae: *Corallinapetra novaezealandiae* gen. et sp. nov. and recognition of the Hapalidiales ord. nov.** *Journal of Phycology* 51(3): 454-468.

NUNES, José Marcos de Castro et al. ASPECTOS TAXONÔMICOS DE TRÊS ESPÉCIES DE CORALINÁCEAS NÃO ARTICULADAS DO LITORAL DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL. **Rodriguesia**. Rio de Janeiro, p. 75-86. jan. 2008.

PRESTING, Gernot G. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. **Canadian Journal Of Botany**, [s.l.], v. 84, n. 9, p.1434-1443, set. 2006. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/b06-117>.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** 4:406-425, 1987.

SANTIAGO, Janaína de Araújo Sousa. **LEVANTAMENTO FLORÍSTICO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE MACROALGAS MARINHAS DA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO DELTA DO PARNAÍBA - BRASIL.** 2016. 182 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SHERWOOD, A.R.; KURIHARA, A.; CONKLIN, K.Y., SAUVAGE, T. & PRESTING, G.G. (2010a) **The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings.** *BMC Plant Biology*10: 258.

SHERWOOD, Alison R. et al. A comparative analysis of COI, LSU and UPA marker data for the Hawaiian florideophyte Rhodophyta: implications for DNA barcoding of red algae. **Cryptogamie, Algologie.** p. 451-465. 2010b.

SISSINI, Marina Nasri. **HAPALIDIACEAE (Corallinophycidae, Rhodophyta) no litoral brasileiro - diversidade e biogeografia.** 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação Biologia de Fungos, Algas e Plantas. **Repositório Institucional da UFSC.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

VERAS, Priscila de C et al. **OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS BANCOS DE RODOLITOS DO ARQUIPÉLAGO DE FERNANDO DE NORONHA, BRASIL.** In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 16 A 22 DE SETEMBRO DE 2011, SÃO LOURENÇO - MG, 2011, São Lourenço - MG. **Anais de Congresso.** São Lourenço – MG: Set, 2011. P. 01 – 02.

VIEIRA-PINTO, Talita et al. Lithophyllum species from Brazilian coast: range extension of Lithophyllum margaritae and description of Lithophyllum atlanticum sp. nov. (Corallinales, Corallinophycidae, Rhodophyta). **Phytotaxa**, [s.l.], v. 190, n. 1, p.355-369, 24 dez. 2014. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.190.1.21>.

Wendy Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. **AlgaeBase.** World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 18 July 2017.