



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR**  
**CURSO DE OCEANOGRÁFIA**

**RHAYAN ROCHA RAMALHO**

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE MACROALGAS  
MARINHAS DO FILO RHODOPHYTA NO LITORAL CEARENSE**

**FORTALEZA**

**2014**

**RHAYAN ROCHA RAMALHO**

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE MACROALGAS  
MARINHAS DO FILO RHODOPHYTA NO LITORAL CEARENSE**

Monografia apresentada ao Curso de Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

**FORTALEZA**

**2014**

**RHAYAN ROCHA RAMALHO**

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE MACROALGAS  
MARINHAS DO FILO RHODOPHYTA NO LITORAL CEARENSE**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia. Área de concentração: Genética de Organismos Marinhos.

Aprovada em: \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. MSc. Janaína de Araújo Sousa Santiago  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

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

Aos meus pais, de grande coragem, sabedoria e amor.

Aos grandes mestres da ciência, que iluminam minha vida com seus feitos e exemplos.

A Morequinha, que me acompanhou em cada passo dessa aventura.

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais, pelo suporte financeiro e emocional que sempre me permitiu seguir meus sonhos e ter uma vida maravilhosa.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, pela excelente orientação. À Profa. MSc. Janaína Araújo, pelo apoio integral e inestimável. Ao MSc. João Mafaldo, pelo papel definitivo para a realização desse trabalho.

Aos grandes pesquisadores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos e colegas do laboratório que ajudaram no foco, na aprendizagem e no desenvolvimento de habilidades na área de bioinformática e genética.

Aos amigos de fora do laboratório, pela paciência e compreensão inesgotáveis para comigo no decurso dessa realização.

À dúzia de pessoas extremamente especiais que não deverei citar aqui, mas que conhecem bem o valor que têm em minha vida.

A morequinha, que me motivou até o último segundo e não acreditou em mim quando apenas não acreditar era preciso.

“Finding truth is difficult and the road to it is rough.  
As seekers after truth, you will be wise to withhold judgment and not simply put your trust in  
the writings of the ancients.

You must question and critically examine those writings from every side.  
You must submit only to argument and experiment and not to the sayings of any person.  
For every human being is vulnerable to all kinds of imperfection.  
As seekers after truth, we must also suspect and question our own ideas as we perform our  
investigations, to avoid falling into prejudice or careless thinking.  
Take this course, and truth will be revealed to you.”

**Ibn al-Hazen (965-1040 EC)**

“With insufficient data it is easy to go wrong”

**Carl Sagan (1934 – 1996)**

## RESUMO

As algas vermelhas são organismos essencialmente marinhos, ocorrendo desde regiões tropicais até regiões polares. Dados moleculares empregados no estudo dessas algas são obtidos tanto do genoma do cloroplasto como da mitocôndria e núcleo, mostrando-se úteis na distinção das espécies e na filogenia do grupo. Neste trabalho foram sequenciados marcadores moleculares de macroalgas vermelhas para fins de identificação e avaliação das diferenças populacionais intraespecíficas. Foram realizadas coletas em Fortaleza (praia do Farol e praia do Meireles), em Caucaia (praia do Pacheco) e em Paracuru (praia da Pedra Rachada). Os indivíduos amostrados foram preservados em CTAB e sílica gel, formalina e como exsiccatas. O DNA extraído das amostras foi submetido a PCR com *primers* específicos para cada um de três marcadores moleculares (UPA, *rbcL* e *COI*). Produtos de PCR foram sequenciados e as sequências processadas no MEGA, alinhadas por MAFFT e árvores filogenéticas por Neighbor-Joining foram geradas. 13 táxons foram identificados: *Agardhiella subulata*, *Dichotomaria obtusata*, *Gelidium coarctatum*, *Gracilaria cornea*, *G. cervicornis*, *G. cuneata*, *G. hayi*, *G. intermedia*, *G. yoneshigueana*, *Gracilariopsis silvana*, *Hypnea musciformis*, *Meristotheca* sp. e *Solieria* sp. A máxima divergência intraespecífica observada foi de 1,8%, na espécie *H. musciformis*. O presente trabalho permitiu a aprendizagem da aquisição e manipulação de dados moleculares para macroalgas vermelhas marinhas no Ceará. Entretanto, observa-se a necessidade da complementação deste trabalho com metodologias de identificação tradicional (morfológica) e do contínuo aprofundamento nos levantamentos florísticos, especialmente na zona infralitoral.

**Palavras-chave:** Sequenciamento. Taxonomia. Rhodophyta. UPA. *rbcL*. *COI*.

## ABSTRACT

Red algae are essentially marine organisms that occur from tropical regions all the way to polar regions. Molecular data applied to the study of these algae were obtained from the chloroplast genome, as well as from the mitochondria and the nucleus, and these data are very useful to establish distinction among species and phylogeny of the group. In this work, we sequenced red macroalgae molecular markers aiming the identification and assessment of the intraspecific populational differences. We collected algae from Fortaleza (Farol beach and Meireles beach), Caucaia (Pacheco beach) and Paracuru (Pedra Rachada beach). Sampled organisms were preserved in CTAB and silica gel, formaldehyde and as exsiccates. The DNA extracted from the samples was used in PCRs with specific *primers* for each of the three molecular markers (UPA, *rbcL* and COI). PCR products were sequenced and the sequences processed in MEGA, aligned with MAFFT and phylogenetic trees using Neighbor-Joining were generated. 13 taxa were identified: *Agardhiella subulata*, *Dichotomaria obtusata*, *Gelidium coarctatum*, *Gracilaria cornea*, *G. cervicornis*, *G. cuneata*, *G. hayi*, *G. intermedia*, *G. yoneshigueana*, *Gracilariopsis silvana*, *Hypnea musciformis*, *Meristotheca sp.* e *Solieria sp.* The max intraspecific divergence observed was of 1.8% in *H. musciformis*. This work provided grand learning about the processes of acquisition and manipulation of molecular data marine red algae. However, it is necessary to complement it with traditional (morphological) identification methodologies and the continuous deepening of the algal studies, especially in the near shore zone.

**Palavras-chave:** DNA Sequencing. Taxonomy. Rhodophyta. UPA. *rbcL*. COI.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Localização geográfica dos pontos de amostragem. ....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2 – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador UPA. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de bootstrap (2000 réplicas) estão indicados nos nós. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3 – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador rbcL. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de bootstrap (2000 réplicas) estão indicados nos nós. ....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4 – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador rbcL. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de bootstrap (2000 réplicas) estão indicados nos nós. ....</i>	<i>29</i>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Grupo de amostras, locais, datas de coletas e coletores. ....</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 2 – Volumes utilizados de cada reagente para a amplificação de cada marcador molecular. ....</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 3 – Condições de PCR utilizadas para cada marcador molecular. ....</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 4 – Primers utilizados para PCR e sequenciamento. ....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 5 – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências. ....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 6 – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências. ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 7 – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências. ....</i>	<i>28</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Área de estudo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Estudos moleculares.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Identificação e Herborização .....</b>	<b>19</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Sinopse dos táxons identificados.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Conjunto de dados do marcador UPA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3 Conjunto de dados do marcador rbcL.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Conjunto de dados do marcador COI.....</b>	<b>28</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>APÊNDICE A – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR UPA .....</b>	<b>35</b>
<b>APÊNDICE B – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR RBCL .....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE C – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR COI.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As macroalgas vermelhas são organismos fotossintetizantes, eucarióticos e multicelulares que fazem parte do Filo Rhodophyta. Este é, provavelmente, um dos mais antigos e numerosos grupos de macroalgas eucarióticas, uma vez que existem mais rodofíceas (aproximadamente 6.000 espécies) do que todos os outros grupos de macroalgas marinhas combinados (LEE, 2008; GRAHAM & WILCOX, 2009). No entanto, segundo Costa (2013) esse número vem sendo atualizado constantemente em virtude dos inúmeros trabalhos realizados com o grupo por diversos pesquisadores no Brasil e no mundo, os quais têm encontrado um grande número de espécies crípticas.

Com diferentes estratégias de reprodução, as macroalgas possuem alta habilidade de dispersão de estruturas reprodutivas e capacidade de regeneração, além dos aspectos de competição intra e interespecífica. Estas características muitas vezes favorecem a rápida colonização do substrato, seja orgânico ou inorgânico, tanto natural quanto artificial. Além disso, as macroalgas marinhas, especialmente aquelas do filo Rhodophyta, podem ser notoriamente difíceis de identificar devido à sua morfologia e anatomia relativamente simples, à convergência, à elevada plasticidade fenotípica e à alternância de gerações heteromórfica (SAUNDERS, 2005). O atual sistema de classificação das algas vermelhas cria a ilusão de que esta linhagem é relativamente limitada em sua diversidade quando comparada às clorofíceas e cromófitas; apesar da ampla diversidade morfológica entre as algas vermelhas e da riqueza de dados ultraestruturais e moleculares disponíveis atualmente (SAUNDERS; HOMMERSAND, 2004).

O uso de sequências de DNA ou marcadores de DNA como método para identificação de espécies tem sido o objetivo da sistemática molecular para diversos grupos de organismos de acordo com Spooner (2009). As algas vermelhas têm sido, desta forma e cada vez mais, candidatas frequentes para aplicação destas técnicas, uma vez que esta ausência de caracteres morfológicos diagnósticos acarreta constantes mudanças nomenclaturais. Para Costa (2013) o *DNA barcoding* é uma ferramenta que deve ser aliada à identificação taxonômica tradicional com o potencial de permitir uma discriminação superior entre espécies crípticas. Todavia, depois de construído um banco de dados confiável, a identificação torna-se rápida e prática.

A identificação de espécies através da utilização de *DNA barcoding* tem duas aplicações gerais conforme Freeland (2005): a confirmação de espécies previamente identificadas a partir da comparação de sequência de DNA existentes em bancos de dados, e a identificação de novas espécies com base em novas sequências de DNA. Segundo Freshwater, *et al.* (2006), a utilização desta técnica na identificação de espécies tem se tornado extremamente comum em estudos de macroalgas marinhas. Na realidade, o uso de marcadores de DNA oferece uma maneira rápida e confiável para determinação da identificação taxonômica de um determinado indivíduo por sequenciamento, a partir de uma pequena parte de seu genoma, através da comparação da sequência de nucleotídeos obtida com sequências existentes em bancos de dados de referência (HERBERT, *et al.*, 2003). Kim *et al.*, (2010), por exemplo, estudaram algas vermelhas da família Gracilariaceae, onde testaram a efetividade do *DNA barcoding* na identificação e descoberta de espécies de Gracilariaceae na Coreia. A análise das sequências do citocromo c oxidase 1 (COI) resultou na confirmação da sequência estudada na identificação de espécies deste grupo, concluindo os autores que o referido estudo demonstrou que o uso do *DNA barcoding* pode fornecer um método eficiente para identificações a nível de espécie, além de contribuir fortemente nas pesquisas taxonômicas e de biodiversidade. Amostras de 290 Rodofíceas foram igualmente estudadas no Havaí (Sherwood *et al.* 2010) revelando diversidade maior que a esperada.

A análise filogenética baseada em sequências de DNA tem sido amplamente utilizada para identificação de organismos nas últimas décadas. Dentre os métodos mais simples de reconstrução de árvores filogenéticas visando aumentar a confiabilidade da identificação de espécies está o de Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987).

Desta forma, no presente estudo foi realizado o processo de catalogação genético-molecular de espécies de macroalgas marinhas do Filo Rhodophyta do litoral cearense, através do sequenciamento de genes mitocondriais e cloroplásticos, e da comparação com sequências depositadas em bancos de dados online, visando obter sequências de DNA que permitam identificar pelo menos 10 (dez) espécies de algas vermelhas para o litoral cearense.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Utilizar marcadores moleculares para descrever as espécies conhecidas de macroalgas marinhas do Filo Rhodophyta, e adicionalmente avaliar a diversidade intraespecífica de cada espécie, quando possível.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter extrações de DNA para pelo menos três gêneros de rodofíceas do litoral cearense;
- Obter ampliações para o gene *cox1* (mitocondrial), *rbcL* e UPA (cloroplásticos) para pelo menos 10 espécies de algas vermelhas para o litoral cearense;
- Produzir sequências de DNA que permitam identificar e caracterizar pelo menos 10 (dez) espécies de algas vermelhas para o litoral cearense;
- Produzir árvores filogenéticas utilizando o algoritmo Neighbour-Joining para avaliar a identidade taxonômica de cada amostra, assim como a diversidade intra e interespecífica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

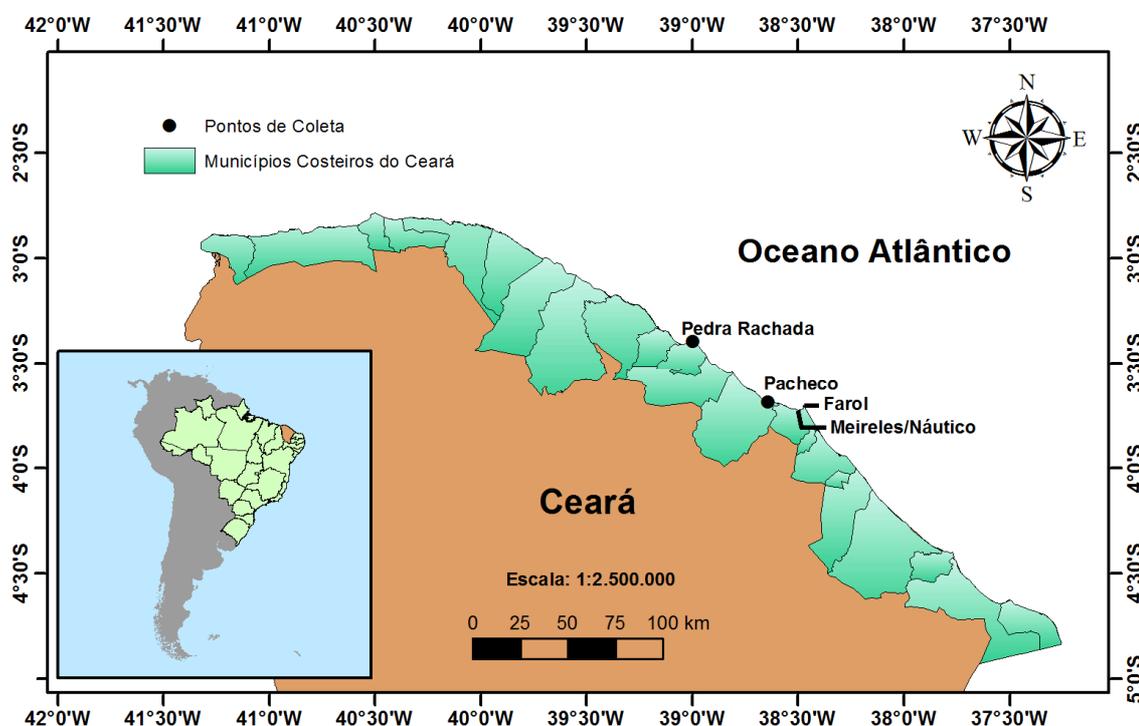
O material estudado neste trabalho se divide em dois grupos (Tabela 1), ambos provenientes de praias do litoral cearense: a parte que foi coletada em 2012, na praia do Pacheco, que gerou sequências para os genes *rbcL* e *COI*; e a parte que foi coletada nas praias do Meireles, Farol, Pacheco e Paracuru, entre setembro de 2014 e março de 2015, que gerou sequências para o gene *UPA* (Figura 1). Os bancos de algas foram visitados durante as marés baixas, e as coletas foram realizadas na faixa de mesolitoral médio e inferior, com a retirada de amostras nos diferentes locais em áreas semi-expostas, de forte impacto das ondas e em locais protegidos. As algas nestes locais foram coletadas com o auxílio de espátulas, acondicionadas em um balde plástico com água do mar e rapidamente levadas ao laboratório para triagem do material e realização de exsiccatas.

**Tabela 1** – Grupo de amostras, locais, datas de coletas e coletores.

Grupo	Município	Praia	Data de Coleta	Coletores
1	Caucaia	Pacheco	02-Ago-2012	A. R. Aquino
2	Fortaleza	Náutico (Piloto)	10-Set-2014	J. A. S. Santiago R. Rocha Ramalho
	Caucaia	Pacheco	19-Mar-2015	R. Rocha Ramalho J. M. Oliveira Neto
	Fortaleza	Farol	19-Mar-2015	R. Rocha Ramalho J. M. Oliveira Neto
	Fortaleza	Meireles	20-Mar-2015	R. Rocha Ramalho M. V. A. Pinheiro
	Paracuru	Pedra Rachada	22-Mar-2015	J. M. Oliveira Neto R. Rocha Ramalho

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 1** – Localização geográfica dos pontos de amostragem.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2 Estudos moleculares

As etapas do protocolo de extração, purificação e sequenciamento de DNA foram feitas segundo (BELLORIN *et al.* 2002), com alterações que serão descritas a seguir. Todas as amostras foram coletadas de ambiente natural. Exsiccatas produzidas a partir de cada um dos indivíduos coletados foram adicionada ao Herbário Ficológico do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

Para extração de DNA foram utilizadas pontas limpas dos talos, então armazenadas em duas formas: as amostras do grupo 1 (coletadas na praia do Pacheco, 2012) foram armazenadas em sílica gel para a preservação do DNA, enquanto as amostras do grupo 2 (coletadas nas praias do Meireles, Farol e Pacheco, 2014,2015) foram armazenadas a -20 °C em tubos Eppendorf de 2 mL imersas em solução de CTAB + NaCl (preservação), com a mesma finalidade. Os passos subsequentes foram aplicados a ambos os grupos.

Utilizando-se graus e pistilos esterilizados em autoclave, as pontas de talo (cerca de 50 mg) foram maceradas com nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados 2 mL de tampão de extração (CTAB 1,5%, NaCl 1 M, EDTA 50mM, Tris 0,1 M pH 8,0) e foram realizadas duas pipetagens de 1 mL da solução resultante no cadinho para dois tubos de 2 mL, identificados na tampa com código de replicata para cada amostra. Em seguida, 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% foram adicionados a cada microtubo.

As amostras foram agitadas para promover a mistura das fases e incubadas por 30 minutos em banho térmico a 65 °C. Adicionou-se 1 mL de Clorofil (solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1) a cada microtubo, em seguida agitando-os com as mãos por alguns minutos para misturar as fases.

Centrifugaram-se as amostras a 20111 g em temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos. Formaram-se duas fases líquidas e o sobrenadante em cada tubo (aproximadamente 600  $\mu$ L) foi pipetado para outro microtubo estéril, de 1,5 mL, atenciosamente para não pipetar próximo ao pellet discoide que se forma entre as duas fases. Cada tubo foi considerado como uma amostra independente, mesmo que se referissem a um mesmo indivíduo, de modo a evitar contaminação de amostras.

Em seguida, os microtubos com pellet e resíduo foram descartados adequadamente e o volume do novo microtubo foi completado a 1,5 mL com álcool isopropílico gelado. Os microtubos foram agitados para misturar as fases e se pôde observar formação de “nuvens” de DNA.

Em algumas das extrações foi utilizada a etapa de *overnight*, em que logo após o passo anterior os microtubos foram armazenados a -20 °C por 12 horas; em seguida retirados até alcançar a temperatura ambiente. Em outras, em vez do *overnight*, as amostras foram centrifugadas a 15000 g, por 20 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada.

Para qualquer uma das duas etapas, seguiu centrifugação por 5 minutos a 20111 g e temperatura ambiente. Formou-se um *pellet* de DNA no fundo do microtubo, o qual foi vertido para desprezar a fase líquida, sempre com atenção para não se perder o *pellet*.

A lavagem foi feita pela repetição por três vezes das etapas seguintes: completou-se o volume do microtubo com álcool etílico 70% (Merck e água mili-Q); centrifugou-se por 5 minutos a 20111 g e temperatura ambiente; desprezou-se pelo menos 50% da fase líquida, caso o *pellet* não estivesse visível. Essas repetições tornaram os *pellets* bem claros e os tubos

foram deixados abertos sobre papel toalha para que o álcool evaporasse de 45 minutos a uma hora, ou até que estivessem secos.

Por último, foram pipetados 100 µL de tampão TE para cada microtubo, a fim de ressuspender o DNA, e foram levados ao freezer para preservação. Posteriormente foi realizada a quantificação do DNA através de um espectrofotômetro NanoDrop 2000c.

Após a obtenção do DNA purificado as ampliações das regiões de interesse foram realizadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ou reação em cadeia da polimerase) com *primers* específicos para o gene mitocondrial da citocromo oxidase I (*cox1*; SAUNDERS, 2005) (*GazF<sub>1</sub>* – *GazR<sub>1</sub>*), parte do gene ribossomal da subunidade maior (23S), *Universal Plastid Amplicon* (UPA; SHERWOOD, 2010) e o gene da rubisco celulase (*rbcL*) exon1 (OLIVEIRA-CARVALHO, 2008) (*F645* – *RrcblSstart*).

Os marcadores foram amplificados em tubos Eppendorf de 200 µL esterilizados e expostos à radiação ultravioleta em uma capela de fluxo laminar horizontal também estéril por 20 minutos. Para a preparação do mix de PCR foram utilizados os volumes e reagentes apresentados na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti de 96 poços da Applied Biosystems e os ciclos para cada marcador estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 2** – Volumes utilizados de cada reagente para a amplificação de cada marcador molecular.

Marcador	1 X PCR Buffer	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	0.2 mM de cada dNTP	0.2 mM de cada primer	1.25 U Taq DNA polimerase	Água Ultrapura	DNA extraído	Volume final
UPA	1,0 µL	0,6 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,11 µL	6,68 µL	1,0 µL	10 µL
<i>rbcL</i>	1,0 µL	0,6 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,11 µL	6,68 µL	1,0 µL	10 µL
COI	2,2 µL	0,7 µL	0,25 µL	0,2 µL	0,05 µL	5,35 µL	1,0 µL	10 µL

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 3** – Condições de PCR utilizadas para cada marcador molecular.

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos
UPA	94 °C por 2'	94 °C por 30''	51 °C por 30''	72 °C por 30''	72 °C por 10'	34
<i>rbcL</i>	94 °C por 4'	94 °C por 1'	45 °C por 1'	72 °C por 90''	72 °C por 8'	35
COI	94 °C por 5'	94 °C por 30''	47 °C por 1'	72 °C por 2'	72 °C por 7'	35

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%, com marcador de tamanho conhecido (1kb DNA Ladder, Invitrogen®). Para isso, preparou-se o gel

com agarose em pó dissolvida em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X, sob aquecimento, em Erlenmeyer, por forno micro-ondas. Quando a solução se tornou homogênea e transparente, passados alguns minutos de resfriamento, foi despejada com cuidado sobre a forma da cuba de eletroforese e os pentes foram posicionados para a modelagem dos poços.

Após gelificação da agarose, retirou-se as contenções da forma e se completou o volume da cuba com TAE 1X até cobrir o gel. Em seguida, 2  $\mu$ L de produto de PCR foram misturados a 4  $\mu$ L de GelRed sobre uma película de Parafilm M<sup>®</sup> e aplicados diretamente aos poços. Para o marcador da eletroforese, foram utilizados 4  $\mu$ L de GelRed, 0,5  $\mu$ L do Ladder e 3,5  $\mu$ L de TAE 1X. Pode-se, assim, verificar tamanho e quantidade de fragmentos amplificados, bem como ausência de contaminação.

As sequências para identificação foram obtidas através de sequenciamento por ciclagem dos produtos de PCR com o kit Big Dye Terminator (Life Technologies) e leitura em sequenciador capilar automático ABI 3500 (Applied Biosystems). Os amplicons foram completamente sequenciados com sucessos em ambas as direções, na maior parte das amostras, e os *primers* de sequenciamento foram os mesmos usados para amplificação.

As sequências foram reunidas manualmente através do software MEGA 6.0 (TAMURA *et al.* 2011), que também foi utilizado para sua posterior edição. Para isso, os eletroferogramas relativos ao *primer forward* de cada sequência foram abertos e comparados com o reverso complemento da sequência do *primer reverse*. Quando o sinal do nucleotídeo estava claro em uma das sequências e não na outra, foram feitas edições para gerar sequências consenso, que foram utilizadas para alinhamento múltiplo e comparadas a outras sequências disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Utilizou-se a ferramenta de BLAST múltiplo do NCBI, através da submissão de um alinhamento em fasta com as sequências de interesse. Através dela foi possível localizar as sequências já submetidas ao banco de dados que mais apresentam semelhança às geradas nesse trabalho. Essa semelhança foi avaliada em relação ao score total alcançado pelas primeiras três sequências, e elas foram adicionadas ao alinhamento múltiplo com identificação (*Nome da espécie*, Código de acesso do GenBank, Local de coleta do indivíduo) desde que o parâmetro Identidade da sequência fosse igual ou superior a 97% e que a sequência tivesse sido publicada em literatura específica.

Buscou-se contemplar diversidade geográfica, para fins de análise da distância genética entre populações. Foram adicionados também uma sequência para grupo externo em cada alinhamento, para enraizar as árvores filogenéticas. Estas foram produzidas através do algoritmo Neighbor-Joining, usando a distância de Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980), deleção em pares e 2.000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein 1985).

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

<i>Primer</i>	<i>Marcador</i>	<i>Sequência 5'-3'</i>	<i>Referências</i>
<b>P23SrV_F<sub>1</sub></b>	UPA	GGACAGAAAGACCCTATGAA	Sherwood & Presting (2007)
<b>P23SrV_R<sub>1</sub></b>	UPA	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	Sherwood & Presting (2007)
<b>F577</b>	rbcL	GTATATGAAGGTCTAAAAGGTGG	Freshwater & Rueness 1994
<b>R1381</b>	rbcL	ATCTTTCCATAGATCTAAAGC	Freshwater & Rueness 1994
<b>R-rbcS Start</b>	rbcL	TGTGTTGCGGCCCGCCCTTGTGTTAGTCTCAC	Freshwater & Rueness 1994
<b>GazF<sub>1</sub></b>	COI	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	Freshwater & Rueness 1994
<b>GazR<sub>1</sub></b>	COI	ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA	Freshwater & Rueness 1994

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3 Identificação e Herborização

As algas coletadas foram identificadas morfológicamente de acordo com a literatura disponível e herborizadas conforme o protocolo usual em macroalgas marinhas (FIDALGO & BONONI, 1984). Depois de herborizadas as exsicatas serão devidamente etiquetadas e incluídas no acervo do Herbário Profa. Francisca Pinheiro do Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, em Fortaleza, CE, Brasil.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram identificados 13 táxons, distribuídos em 4 ordens, 5 famílias e 7 gêneros.

### 4.1 Sinopse dos táxons identificados

#### Rhodophyta

##### Florideophyceae

##### Gelidiales

##### Gelidiaceae

*Gelidium coarctatum* Kützing

##### Gigartinales

##### Cystocloniaceae

*Hypnea musciformis* J.V.F. Lamouroux

##### Solieriaceae

*Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J.Wynne

*Meristotheca* sp.

*Solieria* sp.

##### Gracilariales

##### Gracilariaceae

*Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh

*Gracilaria cornea* J. Agardh

*Gracilaria cuneata* Areschoug

*Gracilaria hayi* Gurgel, Fredericq & J. N. Norris

*Gracilaria intermedia* J. Agardh

*Gracilaria yoneshigueana* Gurgel, Fredericq & J. N. Norris

*Gracilariopsis silvana* Gurgel, Fredericq & J. N. Norris

##### Nemaliales

##### Galaxauraceae

*Dichotomaria obtusata* (J.Ellis & Solander) Lamarck

## 4.2 Conjunto de dados do marcador UPA

Das 55 amostras coletadas do grupo 2, 12 foram sequenciadas com sucesso, produzindo sequências de 304 pb a 390 pb. O marcador plastidial UPA foi amplificado e utilizado para visualizar o agrupamento das espécies e suas respectivas distâncias intraespecíficas. A Tabela 5 organiza as amostras sequenciadas para esse marcador, bem como as sequências do GenBank e obtidas por Santiago (2015).

**Tabela 5** – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências.

Táxon (código a ser substituído)	Dados de coleta	Número de acesso no GenBank	Referência
<i>Caulacanthus ustulatus</i>	Havaí	HQ421619	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>C. ustulatus</i>	Havaí	HQ421620	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Dichotomaria marginata</i>	Havaí	HQ421635	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>D. marginata</i>	Havaí	EF426656	Sherwood <i>et al.</i> , 2007
<i>D. obtusata (FAR 01)</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Farol	-	Presente no trabalho
<i>Gelidium coarctatum</i>	Ceará, Paracuru, Pedra Rachada	-	Presente no trabalho
<i>G. crinale</i>	Piauí, Parnaíba, Praia da Pedra do Sal	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>G. pusillum</i>	Havaí	HQ421033	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>G. reediae</i>	Havaí	HQ421048	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilaria caudata</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	KP403169	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. cervicornis</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>G. cornea</i>	Ceará, Trairi, Guajiru	KP403191	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. cornea</i>	Rio Grande do Norte, Rio do Fogo	KP403170	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. cornea</i>	Ceará, Guajiru, Trairi	JQ952649	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>G. cornea</i>	Piauí, Luís Correia, Praia da Carnaubinha	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>G. cornea</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>G. cornea</i>	Ceará, Paracuru, Pedra Rachada	-	Presente no trabalho
<i>G. cornea</i>	Ceará, Paracuru, Pedra	-	Presente no trabalho

Continua

Táxon (código a ser substituído)	Dados de coleta	Número de acesso no GenBank	Referência
	Rachada		
<i>G. coronopifolia</i>	Havaí	HQ421253	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>G. coronopifolia</i>	Havaí	HQ420928	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>G. cuneata</i>	Ceará, Caucaia, Praia de Dois Coqueiros	KP403194	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. domingensis</i>	São Paulo, São Sebastião, Saco de São Francisco	JQ907438	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>G. domingensis</i>	Praia do Coqueiro, Luís Correia, Piauí	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>G. hayi</i>	Praia da Barrinha, Cajueiro da Praia, Piauí	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>G. hayi</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>G. hayi</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>G. isabellana</i>	Rio de Janeiro, Cabo Frio	JQ952653	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>G. parvispora</i>	Havaí	HQ421255	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	Equador	JQ907465	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>Gp. longissima</i>	Inglaterra	JQ907467	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>Gp. silvana</i>	Piauí, Cajueiro da Praia, Praia da Barrinha	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>Gp. silvana</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>Gp. silvana</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>Hypnea musciformis</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	-	Presente no trabalho
<i>H. musciformis</i>	São Paulo, São Sebastião, Cigarras	KP725303	Jesus <i>et al.</i> , 2015
<i>H. musciformis</i>	Paraíba, João Pessoa, Ponta do Seixas	KP725302	Jesus <i>et al.</i> , 2015
<i>H. musciformis</i>	Rio Grande do Norte, Rio do Fogo, Praia do Fogo	KP725303	Jesus <i>et al.</i> , 2015
<i>H. musciformis</i>	Havaí	HQ421453	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypnea sp.</i>	Piauí, Cajueiro da Praia, Praia da Barra Grande	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>Porphyra vietnamensis</i>	Piauí, Parnaíba, Praia da Pedra do Sal	JN222787	Milstein <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhodomeniales sp.</i>	Havaí	HQ421452	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Solieria filiformis</i>	Piauí, Parnaíba, Praia da	-	Santiago, 2015

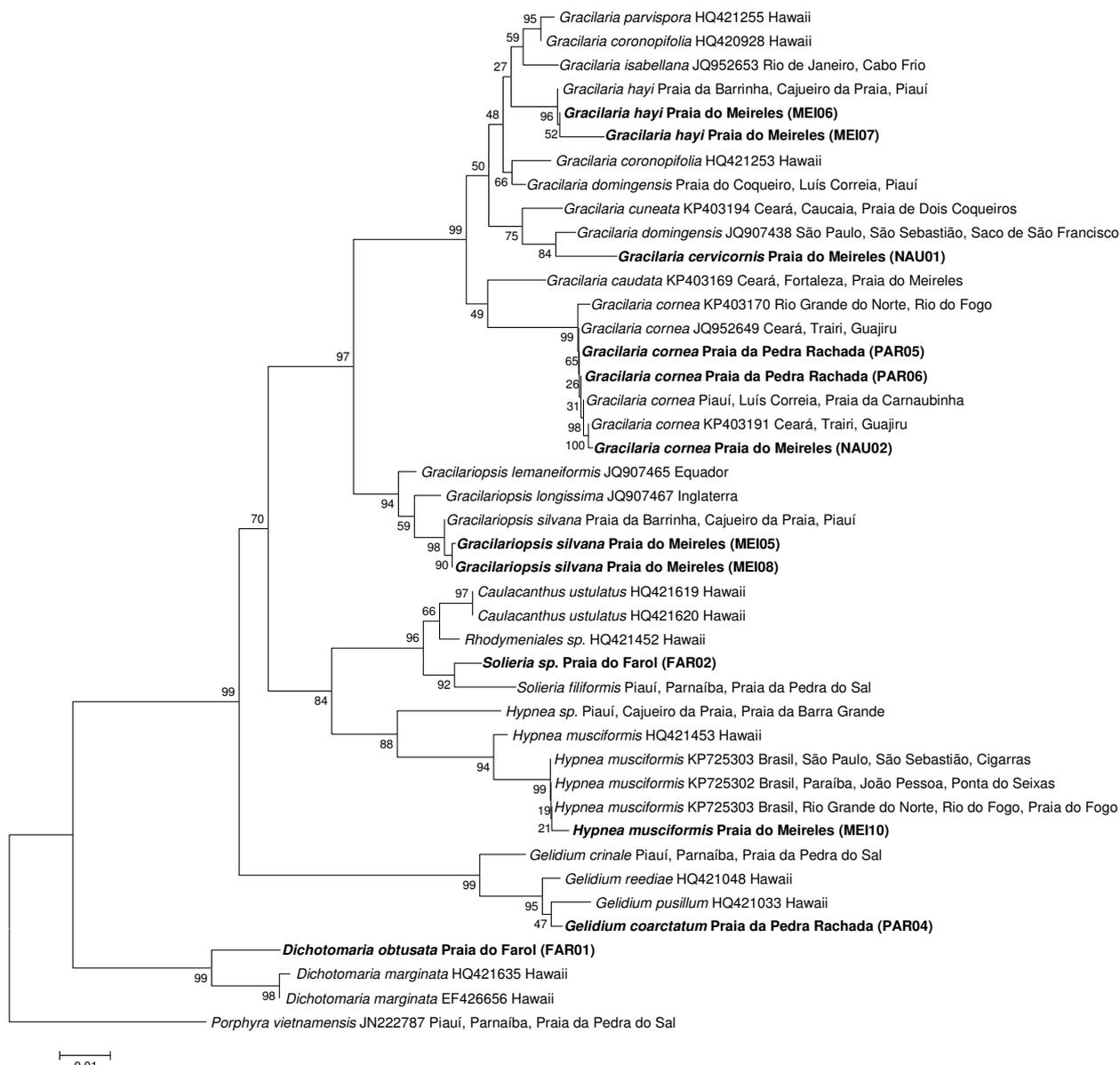
Táxon (código a ser substituído)	Dados de coleta	Número de acesso no GenBank	Referência
	Pedra do Sal		Dados não publicados
<i>Solieria sp. (FAR 02)</i>	Ceará, Fortaleza, Praia do Farol	-	Presente no trabalho

Fonte: Elaborada pelo autor.

Conclusão

As sequências listadas foram alinhadas por MAFFT (KATOH *et al*, 2002) e a análise por Neighbor-Joining produziu a Fig. 2. Das sequências produzidas foram obtidas 8 espécies em 6 gêneros: *Gracilaria hayi*, *G. cornea*, *G. cervicornis*, *Gracilariopsis silvana*, *Hypnea musciformis*, *Solieria sp*, *Gelidium coarctatum*, *Dichotomaria obtusata*.

**Figura 2** – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador UPA. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão indicados nos nós.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No dendrograma pode-se observar um agrupamento consistente dos gêneros, com forte suporte de *bootstrap*.

As divergências observadas entre as *Gracilaria hayi* do Meireles foram de 0,9% – sem diferença significativa com a coletada no Piauí. A menor diferença da *G. cervicornis* da praia

do Meireles em relação às demais sequências do gênero *Gracilaria* foi com a *G. dominguensis* de São Paulo, com valor de 1,6%.

As sequências de *G. cornea* e de *Gracilariopsis silvana* não apresentaram diferenças significativas entre si, em seus respectivos grupos.

A sequência de *Gelidium coarctatum* da praia da Pedra Rachada apresentou 2,7% de diferença com *G. crinale* do Piauí e 1% de diferença com ambas as sequências havaianas de *G. pussilum* e *G. reediae*.

As sequências de *Solieria sp. cearense* e *Solieria filiformis* do Piauí apresentaram divergência de 1,7%.

A *Hypnea musciformis* coletada na praia do Meireles apresentou-se dentro do grupo para a espécie, com divergência de 0,3% para a população sequenciada ao longo da costa brasileira e 1,8% para a sequenciada no Havaí.

A *Dichotomaria obtusata* da praia do Farol apresentou 2,7% de diferença em relação às *Dichotomaria marginata* do Havaí, o que aponta para a consistência da classificação como espécies diferentes.

### 4.3 Conjunto de dados do marcador rbcL

Das amostras do grupo 1, 9 foram sequenciadas com sucesso para o marcador plastidial rbcL, produzindo sequências de 439 pb a 671 pb. A Tabela 3 apresenta as sequências utilizadas no alinhamento, bem como a identificação e referência de cada uma.

**Tabela 6** – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências.

Táxon	Dados de coleta	Número de acesso (GenBank)	Referência
<i>Gracilaria intermedia</i> (i01)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>G. cuneata</i> (i08)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>G. curtissiae</i>	Rio Grande do Norte, Diogo Lopes	KP252956	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. intermedia</i>	Venezuela, Puerto Escondido	AY049336	Gurgel <i>et al.</i> , 2004
<i>G. intermedia</i> (i04)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>G. intermedia</i> (i09)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho

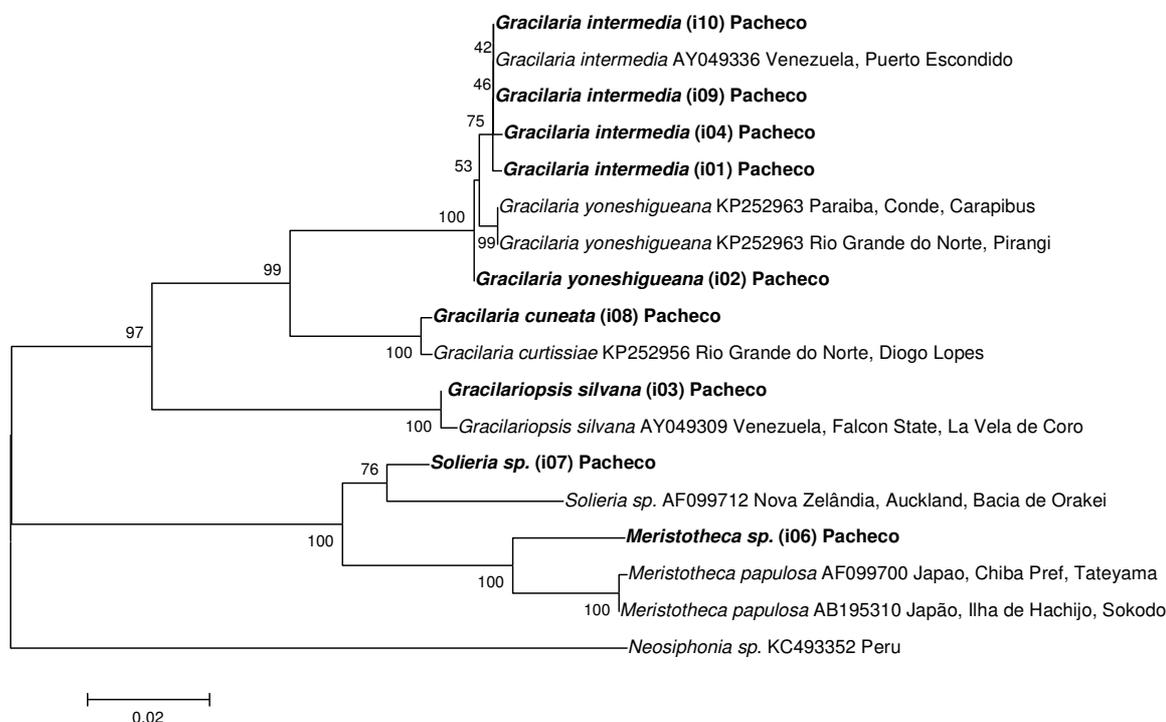
Continua

<b>Táxon</b>	<b>Dados de coleta</b>	<b>Número de acesso (GenBank)</b>	<b>Referência</b>
<i>G. intermedia</i> (i10)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>G. yoneshigueana</i>	Paraíba, Conde, Carapibus	KP252963	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. yoneshigueana</i>	Rio Grande do Norte, Pirangi	KP252963	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. yoneshigueana</i> (i02)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Venezuela, Falcon State, La Vela de Coro	AY049309	Gurgel <i>et al.</i> , 2003
<i>Gracilariopsis silvana</i> (i03)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Meristotheca papulosa</i>	Japão, Chiba Pref, Tateyama	AF099700	Fredericq <i>et al.</i> , 1999
<i>Meristotheca papulosa</i>	Japão, Ilha de Hachijo, Sokodo	AB195310	Faye <i>et al.</i> , 2005
<i>Meristotheca sp.</i> (i06)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Neosiphonia ramirezii</i>	Peru	KC493352	Bustamante <i>et al.</i> , 2013
<i>Solieria sp.</i>	Bacia Orakei, Auckland, New Zealand	AF099712	Fredericq <i>et al.</i> , 1998
<i>Solieria sp.</i> (i07)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho

Fonte: Elaborada pelo autor. Conclusão

Das sequências produzidas foram identificadas 6 espécies em 4 gêneros: *Gracilaria yoneshigueana*, *G. intermedia*, *G. cuneata*, *Gracilariopsis silvana*, *Meristotheca sp.*, *Solieria sp.*

**Figura 3** – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador *rbcL*. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão indicados nos nós.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observou-se novamente a formação de grupos definidos em ordens: o ramo superior compreendendo as *Gracilariaceae* (família *Gracilariaceae*) e o ramo inferior, *Gelidiales* (família *Solieriaceae*).

Não foi observada diferença significativa entre a sequência de *Gracilaria yoneshigueana* da praia do Pacheco e as da Paraíba e do Rio Grande do Norte, bem como não foi observada diferença significativa entre as amostras de *G. intermedia* cearenses e as da Venezuela. Este trabalho apresenta o primeiro registro dessa espécie no Ceará.

A divergência entre o indivíduo classificado morfologicamente como *G. cuneata* e a *G. curtissiae* do RN são de apenas 0,3%, o que aponta para a necessidade de revisão da identificação morfológica.

Não houve diferença significativa entre a *Gracilariopsis silvana* do Pacheco e a venezuelana. Neste trabalho é feito o segundo registro da espécie no Ceará.

Entre a *Solieria sp.* cearense e a da Nova Zelândia foi calculada divergência de 3,6%, o que indica espécies diferentes, bem como entre as *Meristotheca sp.* amostrada e a *M. papulosa* do Japão, cuja diferença foi de 3,3%.

#### 4.4 Conjunto de dados do marcador COI

Das amostras do grupo 2, 4 foram sequenciadas com sucesso para o marcador COI, produzindo sequências de 615 pb a 690 pb. As sequências listadas foram alinhadas por MAFFT (KATOHI *et al.*, 2002) e a análise por Neighbor-Joining produziu a Fig. 4.

**Tabela 7** – Lista de táxons, informações de coleta, número de acesso ao GenBank e referências.

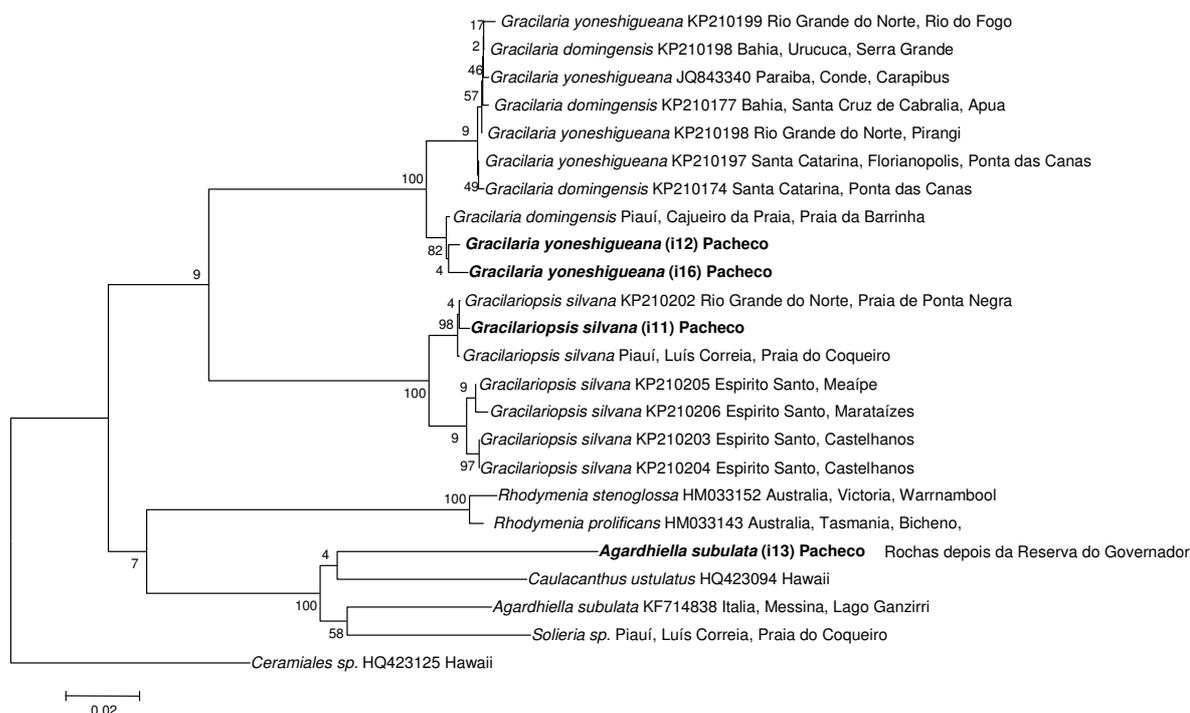
Táxon	Dados de coleta	Número de acesso no GenBank	Referência
<i>Agardhiella subulata</i>	Itália, Messina, Lago Ganzirri	KF714838	Manghisi <i>et al.</i> , 2010
<i>A. subulata</i> (i13)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Caulacanthus ustulatus</i>	Havaí	HQ423094	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Ceramiales sp.</i>	Havaí	HQ423125	Sherwood <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilaria domingensis</i>	Santa Catarina, Ponta das Canas	KP210174	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. domingensis</i>	Bahia, Santa Cruz de Cabrália, Apua	KP210177	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. domingensis</i>	Bahia, Urucuca, Serra Grande	KP210198	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. domingensis</i>	Piauí, Cajueiro da Praia, Praia da Barrinha	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>G. yoneshigueana</i>	Santa Catarina, Florianópolis, Ponta das Canas	KP210197	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. yoneshigueana</i>	Rio Grande do Norte, Pirangi	KP210198	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. yoneshigueana</i>	Paraíba, Conde, Carapibus	JQ843340	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>G. yoneshigueana</i>	Rio Grande do Norte, Rio do Fogo	KP210199	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>G. yoneshigueana</i> (i12)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>G. yoneshigueana</i> (i16)	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Piauí, Luís Correia, Praia do Coqueiro	-	Santiago, 2015 Dados não publicados
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Rio Grande do Norte, Praia de Ponta Negra	KP210202	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Espirito Santo, Meaípe	KP210205	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Espirito Santo, Castelhanos	KP210203	Lyra <i>et al.</i> , 2015

Táxon	Dados de coleta	Número de acesso no GenBank	Referência
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Espirito Santo, Castelhanos	KP210204	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<i>Gracilariopsis silvana</i>	Espirito Santo, Marataízes	KP210206	Lyra <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Gracilariopsis silvana</i> (i11)</b>	Ceará, Caucaia, Praia do Pacheco	-	Presente no trabalho
<i>Rhodymenia prolifcans</i>	Australia, Tasmania, Bicheno, Rocky front past Governor-s Reserve	HM033143	Saunders <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodymenia stenoglossa</i>	Austrália, Victoria, Warrnambool	HM033152	Saunders <i>et al.</i> , 2010
<i>Solieria sp.</i>	Piauí, Luís Correia, Praia do Coqueiro	-	Santiago, 2015 Dados não publicados

Fonte: Elaborada pelo autor. Conclusão

Das sequências produzidas foram obtidas 3 espécies em 3 gêneros: *Agardhiella subulata*, *Gracilaria yoneshigueana*, *Gracilariopsis silvana*.

**Figura 4** – Árvore gerada a partir da análise de Neighbor-Joining baseada em sequências do marcador COI. As amostras sequenciadas no presente trabalho estão destacadas em negrito. Valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão indicados nos nós.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A sequência para *Gracilaria yoneshigueana* (i12) amostrada no Pacheco apresenta divergência de 2,8% em relação à sequência para a *G. yoneshigueana* (i16). As sequências do RN (Pirangi), Santa Catarina e Paraíba apontam que a classificação da (i16) está correta. Observou-se, contudo, divergência de 14,3% dessa sequência em relação à *G. yoneshigueana* do RN (Rio do Fogo).

A sequência produzida de *Gracilariopsis silvana* apresentou diferença máxima de 2,6% em relação às sequências do Espírito Santo (Castelhanos, Meaípe, Marataízes) para a espécie. A menor diferença foi com a sequência do RN (Praia da Ponta Negra), de apenas 0,3%.

A diferença mínima apresentada pela sequência de *Agardhiella subulata* (i13) foi em relação à *Caulacanthus ustulatus* do Haváí, de 12,2%, o que aponta para a necessidade de revisão da classificação da sequência, embora esteja bem agrupada na ordem Gigartinales.

## 5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram identificados 13 táxons de rodófitas marinhas bentônicas, sendo 11 em nível infragenérico e 2 em nível genérico, distribuídos em 4 ordens, 5 famílias e 8 gêneros.

As espécies *Dichotomaria obtusata*, *Gelidium coarctatum*, *G. cornea*, *G. hayi*, *G. intermedia*, *G. yoneshigueana*, *Gracilariopsis silvana* e *Hypnea musciformis* apresentaram bons alinhamentos com as sequências do GenBank e do Piauí.

*Hypnea musciformis* da praia do Meireles apresentou divergência intraespecífica de 0,3% para a população sequenciada ao longo da costa brasileira e 1,8% para a sequenciada no Haváí.

Este trabalho apresenta o primeiro registro da espécie *G. intermedia* para o Ceará e o segundo registro da espécie *Gp. silvana*.

Já para as espécies *Agardhiella subulata*, *G. cervicornis*, *G. cuneata*, *Meristotheca sp.*, e *Solieria sp.*, identificou-se a necessidade de estudos complementares das exsicatas e cortes em lâminas para microscópio, a fim de melhor definir a classificação desses organismos, bem como de conferir a possibilidade de espécies novas para a ciência.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- BUSTAMANTE, D.E.; WON, B.Y. E CHO, T.O. *Neosiphonia ramirezii* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from Peru. *Algae* 28, 73-82 (2013)
- COSTA, E.S. 2013. Algas gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyceae) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 153p.
- COSTA, E.S.; PLASTINO, E.M.; PETTI, R.; OLIVEIRA, E.C. E OLIVEIRA, M.C. The Gracilariaceae germplasm bank of the University of São Paulo, Brazil: A DNA barcoding approach. *J. Appl. Phycol.* 24, 1643-1653 (2012).
- FAYE, E.J.; SHIMADA, S.; KAWAGUCHI, S. E MASUDA, M. Characterization of the edible red alga *Meristotheca papulosa* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan *Phycological Res.* 53, 234-245 (2005)
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-91.
- FIDALGO, O. & BONONI, V. L. 1984. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo. (Manual n. 4).
- FREDERICQ, S.; FRESHWATER, D.W. E HOMMERSAND, M.H. Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Rhodophyta, Gigartinales) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398,399, 25-38 (1999)
- FREELAND, J. R. 2005. *Molecular ecology*. Freeland, J.R. (Ed.) 1 ed. John Willey & Sons, 402p.
- FRESHWATER, D. W.; MONTGOMERY, F.; GREENE, J. K.; HAMNER, R.M.; WILLIAMS, M.; WHITFIELD, P. E. 2006. Distribution and identification of an invasive *Gracilaria* species that is hampering commercial fishing operations in southeastern North Carolina, USA. *Biological Invasions*, 8: 631-637.
- GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. 2009. *Algae*. Prentice Hall, USA, 640 pp.
- GURGEL, C.F.; FREDEIRCQ, S. E NORRIS, J.N. Two new flat species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *Gracilaria abyssalis* sp. nov. and *Gracilaria brasiliensis* sp. nov. *Phycologia* (2008) In press

- GURGEL, C.F.D.; FREDERICQ, S. E NORRIS, J.N. Molecular Systematics and Taxonomy of Flattened species of *Gracilaria* Greville (Gracilariaceae, Gracilariales, Rhodophyta) from the Western Atlantic (in) Abbott, I.A. and McDermid, K. (Eds.); TAXONOMY OF ECONOMIC SEAWEEDS IX: 159-199; Hawaii Sea Grant College Program, 2525 Correa Road, HIG 210, Honolulu, HI, USA (2004)
- GURGEL, C.F.D. E FREDERICQ, S. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on rbcL sequence analyses. *J. Phycol.* 40 (1), 138-159 (2004)
- GURGEL, C.F.D.; LIAO, L.M.; FREDERICQ, S. E HOMMERSAND, H.M. Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on rbcL sequence analyses and morphological evidence *J. Phycol.* 39 (1), 154-171 (2003)
- HERBERT, P. D. N.; A. CYWINSKA.; S. L. BALL.; J. R. DEWAARD. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*, 270: 313-321.
- JESUS, P.B.D. ; SILVA, M.S. ; LYRA, G.D.M.; NUNES, J.M.D.C. E SCHNADELBACH, A.S. Extension of the distribution range of *Hypnea stellulifera* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) to the South Atlantic: Morphological and molecular evidence. *Aquat. Bot.* 123, 26-36 (2015)
- KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; E MIYATAA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15; 30(14): 3059–3066.
- KIM, M.S.; YANG, M.Y.; CHO, G.Y. 2010. Applying DNA barcoding to Korean Gracilariaceae (Rhodophyta). *Cryptogamie, Algologie*, 31 (4): 387-401.
- LEE, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, 4rd ed. 561p.
- LYRA, G.M., COSTA, E.S., DE JESUS, P.B., DE MATOS, J.C.G., CAIRES, T.A., OLIVEIRA, M.C., OLIVEIRA, E.C., XI, Z., NUNES, J.M. E DAVIS, C.C. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *J. Phycol.* (2015).
- MANGHISI, A.; MORABITO, M.; BERTUCCIO, C.; LEGALL, L.; COULOUX, A.; CRUAUD, C. E GENOVESE, G. Is routine DNA barcoding an efficient tool to reveal introduction of alien macroalgae? A case study of *Agardhiella subulata* Solieriaceae, Rhodophyta) in Cape Peloro lagoon (Sicily, Italy). *Cryptogam.; Algol.* 31, 423-433 (2010)
- MILSTEIN, D.; MEDEIROS, A.S.; OLIVEIRA, E.C. E OLIVEIRA, M.C. Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? A case study with Brazilian taxa. *J. Appl. Phycol.* (2011) In press

OLIVEIRA-CARVALHO, M. de F. 2008. Taxonomia, distribuição geográfica e filogenia do gênero *Codium* Stackhouse (Bryopsidales - Chlorophyta) no litoral brasileiro. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 88 f.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425. 1987.

SAUNDERS, G. W.; HOMMERSAND, M. H. 2004. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Amer. J. Bot.* 91:1494-1507.

SAUNDERS, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences* 360: 1879-1888.

SAUNDERS, G.W. E MCDONALD, B. DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. nov. *Botany* 88, 639-667 (2010)

SHERWOOD, R. A.; SAUVAGE, T.; KURIHARA, A.; CONKLIN, K. Y.; PRESTING, G. G. 2010. A comparative analysis of COI, LSU and UPA marker data for the Hawaiian florideophyte Rhodophyta: implications for DNA barcoding of red algae. *Cryptogamie, Algologie*, 31 (4): 451-465.

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

SHERWOOD, A.R.; E PRESTING, G.G. Universal *primers* amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria *J. Phycol.* 43 (3), 605-608 (2007).

SPOONER, D. M. 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: an example in wild potatoes. *American Journal of Botany.* 96(6): 1177-1189.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

WISEMAN, D. R. 1976. Observations of the vegetative morphology of the red algal genus *Ochtodes* J. Agardh (Rhizophyllidaceae, Gigartinales). *Phycologia* 15:143-147.

WU, F. DNA barcoding of the red algae Ceramiales (Rhodophyta) in intertidal zone of Qingdao, China. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* (2015).

## APÊNDICE A – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR UPA

Título da sequência (Nome da Espécie/Código GenBank/Localidade da amostra)	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Caulacanthus ustulatus</i> HQ421619 Havaí							
2 <i>Caulacanthus ustulatus</i> HQ421620 Havaí	0.000						
3 <i>Dichotomaria marginata</i> EF426656 Havaí	0.115	0.115					
4 <i>Dichotomaria marginata</i> HQ421635 Havaí	0.122	0.122	0.000				
5 <i>Dichotomaria obtusata</i> Praia do Farol (FAR01)	0.114	0.114	0.027	0.027			
6 <i>Gelidium coarctatum</i> Praia da Pedra Rachada (PAR04)	0.123	0.123	0.122	0.122	0.138		
7 <i>Gelidium crinale</i> Piauí, Parnaíba, Praia da Pedra do Sal	0.110	0.110	0.129	0.132	0.128	0.027	
8 <i>Gelidium pusillum</i> HQ421033 Havaí	0.122	0.122	0.140	0.149	0.154	0.010	0.030
9 <i>Gelidium reediae</i> HQ421048 Havaí	0.115	0.115	0.134	0.142	0.143	0.010	0.024
10 <i>Gracilaria caudata</i> KP403169 Ceará, Fortaleza, Praia do Meireles	0.091	0.091	0.126	0.134	0.127	0.130	0.115
11 <i>Gracilaria cervicornis</i> Praia do Meireles (NAU01)	0.121	0.121	0.151	0.151	0.142	0.138	0.136
12 <i>Gracilaria cornea</i> JQ952649 Ceará, Guajiru, Trairi	0.106	0.106	0.148	0.158	0.153	0.138	0.131
13 <i>Gracilaria cornea</i> KP403170 Rio Grande do Norte, Rio do Fogo	0.103	0.103	0.145	0.154	0.149	0.142	0.135
14 <i>Gracilaria cornea</i> KP403191 Ceará, Trairi, Guajiru	0.112	0.112	0.157	0.158	0.153	0.138	0.134
15 <i>Gracilaria cornea</i> Piauí, Luis Correia, Praia da Carnaubinha	0.107	0.107	0.150	0.158	0.153	0.138	0.131
16 <i>Gracilaria cornea</i> Praia da Pedra Rachada (PAR05)	0.106	0.106	0.148	0.158	0.153	0.138	0.131
17 <i>Gracilaria cornea</i> Praia da Pedra Rachada (PAR06)	0.106	0.106	0.148	0.158	0.153	0.138	0.131
18 <i>Gracilaria cornea</i> Praia do Meireles (NAU02)	0.116	0.116	0.160	0.172	0.167	0.157	0.146
19 <i>Gracilaria coronopifolia</i> HQ420928 Havaí	0.093	0.093	0.130	0.137	0.135	0.122	0.112
20 <i>Gracilaria coronopifolia</i> HQ421253 Havaí	0.090	0.090	0.123	0.131	0.138	0.122	0.118
21 <i>Gracilaria cuneata</i> KP403194 Ceará, Caucaia, Praia de Dois Coqueiros	0.092	0.092	0.127	0.128	0.127	0.114	0.115
22 <i>Gracilaria domingensis</i> JQ907438 São Paulo, São Sebastião, Saco de São Francisco	0.096	0.096	0.123	0.131	0.135	0.122	0.122
23 <i>Gracilaria domingensis</i> Praia do Coqueiro, Luís Correia, Piauí	0.090	0.090	0.123	0.131	0.135	0.126	0.115
24 <i>Gracilaria hayi</i> Praia da Barrinha, Cajueiro da Praia, Piauí	0.096	0.096	0.136	0.144	0.135	0.134	0.118
25 <i>Gracilaria hayi</i> Praia do Meireles (MEI06)	0.101	0.101	0.149	0.149	0.135	0.134	0.118
26 <i>Gracilaria hayi</i> Praia do Meireles (MEI07)	0.113	0.113	0.148	0.148	0.131	0.134	0.123
27 <i>Gracilaria isabellana</i> JQ952653 Rio de Janeiro, Cabo Frio	0.099	0.099	0.123	0.131	0.128	0.126	0.115
28 <i>Gracilaria parvispora</i> HQ421255 Havaí	0.096	0.096	0.133	0.141	0.138	0.126	0.115
29 <i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> JQ907465 Equador	0.070	0.070	0.099	0.105	0.107	0.103	0.091
30 <i>Gracilariopsis longissima</i> JQ907467 Inglaterra	0.070	0.070	0.099	0.105	0.107	0.103	0.091
31 <i>Gracilariopsis silvana</i> Praia da Barrinha, Cajueiro da Praia, Piauí	0.073	0.073	0.102	0.109	0.104	0.111	0.097
32 <i>Gracilariopsis silvana</i> Praia do Meireles (MEI05)	0.079	0.079	0.103	0.103	0.099	0.111	0.093
33 <i>Gracilariopsis silvana</i> Praia do Meireles (MEI08)	0.076	0.076	0.112	0.112	0.104	0.111	0.096
34 <i>Hypnea musciformis</i> HQ421453 Havaí	0.068	0.068	0.129	0.137	0.145	0.106	0.112
35 <i>Hypnea musciformis</i> KP725302 Brasil, Paraíba, João Pessoa, Ponta do Seixas	0.081	0.081	0.147	0.147	0.156	0.110	0.118
36 <i>Hypnea musciformis</i> KP725303 Brasil, Rio Grande do Norte, Rio do Fogo, Praia do Fogo	0.081	0.081	0.147	0.147	0.156	0.110	0.118
37 <i>Hypnea musciformis</i> KP725303 Brasil, São Paulo, São Sebastião, Cigarras	0.081	0.081	0.147	0.147	0.156	0.110	0.118
38 <i>Hypnea musciformis</i> Praia do Meireles (MEI10)	0.083	0.083	0.162	0.162	0.156	0.110	0.113
39 <i>Hypnea sp.</i> Piauí, Cajueiro da Praia, Praia da Barra Grande	0.059	0.059	0.139	0.131	0.124	0.110	0.103
40 <i>Porphyra vietnamensis</i> JN222787 Piauí, Parnaíba, Praia da Pedra do Sal	0.121	0.121	0.087	0.087	0.097	0.139	0.135
41 <i>Rhodymeniales sp.</i> HQ421452 Havaí	0.010	0.010	0.109	0.115	0.107	0.123	0.110
42 <i>Solieria filiformis</i> Piauí, Parnaíba, Praia da Pedra do Sal	0.029	0.029	0.124	0.115	0.114	0.111	0.106
43 <i>Solieria sp.</i> Praia do Farol (FAR02)	0.023	0.023	0.125	0.125	0.121	0.123	0.105

**Continua**

## APÊNDICE A – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR UPA

	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9	0.010																			
10	0.127	0.121																		
11	0.152	0.141	0.043																	
12	0.143	0.137	0.029	0.046																
13	0.146	0.140	0.032	0.049	0.003															
14	0.151	0.144	0.031	0.046	0.000	0.003														
15	0.144	0.138	0.029	0.046	0.000	0.003	0.000													
16	0.143	0.137	0.029	0.046	0.000	0.003	0.000	0.000												
17	0.143	0.137	0.029	0.046	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000											
18	0.158	0.151	0.032	0.046	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000										
19	0.124	0.118	0.029	0.036	0.037	0.040	0.039	0.037	0.037	0.037	0.041									
20	0.124	0.118	0.037	0.036	0.040	0.043	0.042	0.040	0.040	0.040	0.044	0.016								
21	0.128	0.121	0.036	0.026	0.039	0.042	0.039	0.039	0.039	0.039	0.043	0.028	0.025							
22	0.130	0.124	0.037	0.016	0.040	0.043	0.042	0.040	0.040	0.040	0.044	0.026	0.024	0.019						
23	0.127	0.121	0.032	0.032	0.035	0.037	0.036	0.035	0.035	0.035	0.038	0.010	0.010	0.019	0.021					
24	0.130	0.124	0.029	0.043	0.037	0.040	0.039	0.038	0.037	0.037	0.041	0.016	0.021	0.028	0.032	0.016				
25	0.136	0.129	0.032	0.043	0.035	0.038	0.035	0.035	0.035	0.035	0.039	0.017	0.020	0.026	0.032	0.014	0.000			
26	0.145	0.134	0.042	0.043	0.045	0.048	0.045	0.045	0.045	0.045	0.050	0.027	0.030	0.036	0.042	0.024	0.009	0.009		
27	0.127	0.121	0.032	0.043	0.040	0.043	0.042	0.040	0.040	0.040	0.044	0.010	0.021	0.033	0.032	0.016	0.016	0.017	0.027	
28	0.127	0.121	0.032	0.039	0.040	0.043	0.042	0.040	0.040	0.040	0.041	0.003	0.018	0.030	0.029	0.013	0.018	0.020	0.030	
29	0.103	0.097	0.039	0.077	0.064	0.062	0.068	0.065	0.064	0.064	0.071	0.045	0.053	0.059	0.059	0.051	0.048	0.053	0.064	
30	0.103	0.097	0.045	0.080	0.070	0.067	0.074	0.071	0.070	0.070	0.077	0.051	0.059	0.062	0.062	0.056	0.053	0.060	0.070	
31	0.109	0.103	0.045	0.081	0.064	0.062	0.068	0.065	0.064	0.064	0.071	0.053	0.059	0.065	0.059	0.059	0.053	0.060	0.070	
32	0.110	0.103	0.052	0.077	0.069	0.065	0.069	0.069	0.069	0.069	0.077	0.062	0.066	0.069	0.066	0.066	0.062	0.062	0.062	
33	0.113	0.106	0.050	0.081	0.066	0.063	0.066	0.066	0.066	0.066	0.073	0.060	0.063	0.066	0.063	0.063	0.060	0.060	0.070	
34	0.118	0.111	0.093	0.132	0.105	0.102	0.111	0.106	0.105	0.105	0.116	0.096	0.093	0.101	0.102	0.093	0.102	0.111	0.116	
35	0.121	0.121	0.105	0.140	0.118	0.115	0.118	0.118	0.118	0.118	0.131	0.108	0.105	0.108	0.114	0.105	0.115	0.118	0.123	
36	0.121	0.121	0.105	0.140	0.118	0.115	0.118	0.118	0.118	0.118	0.131	0.108	0.105	0.108	0.114	0.105	0.115	0.118	0.123	
37	0.121	0.121	0.105	0.140	0.118	0.115	0.118	0.118	0.118	0.118	0.131	0.108	0.105	0.108	0.114	0.105	0.115	0.118	0.123	
38	0.116	0.113	0.109	0.133	0.123	0.120	0.123	0.123	0.123	0.123	0.138	0.113	0.113	0.116	0.123	0.113	0.120	0.120	0.120	
39	0.124	0.124	0.102	0.124	0.117	0.114	0.108	0.109	0.117	0.117	0.129	0.105	0.102	0.089	0.105	0.102	0.108	0.101	0.113	
40	0.165	0.155	0.153	0.163	0.164	0.167	0.164	0.164	0.164	0.164	0.178	0.143	0.140	0.143	0.140	0.137	0.153	0.160	0.151	
41	0.122	0.115	0.091	0.113	0.106	0.103	0.112	0.107	0.106	0.106	0.116	0.090	0.085	0.086	0.090	0.085	0.090	0.095	0.106	
42	0.128	0.121	0.105	0.121	0.120	0.117	0.112	0.113	0.120	0.120	0.133	0.108	0.105	0.092	0.111	0.105	0.111	0.101	0.113	
43	0.122	0.115	0.088	0.121	0.104	0.101	0.104	0.104	0.104	0.104	0.116	0.104	0.104	0.101	0.111	0.104	0.101	0.101	0.113	

Continuação

## APÊNDICE A – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR UPA

	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	
22																	
23																	
24																	
25																	
26																	
27																	
28	0.013																
29	0.042	0.048															
30	0.048	0.053	0.008														
31	0.051	0.056	0.016	0.010													
32	0.059	0.065	0.018	0.012	0.000												
33	0.057	0.063	0.017	0.012	0.000	0.000											
34	0.102	0.099	0.079	0.088	0.091	0.092	0.098										
35	0.115	0.111	0.090	0.093	0.096	0.092	0.098	0.014									
36	0.115	0.111	0.090	0.093	0.096	0.092	0.098	0.014	0.000								
37	0.115	0.111	0.090	0.093	0.096	0.092	0.098	0.014	0.000	0.000							
38	0.120	0.116	0.093	0.096	0.099	0.092	0.099	0.018	0.003	0.003	0.003						
39	0.111	0.108	0.079	0.079	0.079	0.069	0.069	0.054	0.039	0.039	0.039	0.042					
40	0.144	0.146	0.128	0.121	0.115	0.106	0.119	0.151	0.154	0.154	0.154	0.162	0.128				
41	0.093	0.093	0.070	0.070	0.073	0.079	0.076	0.068	0.081	0.081	0.081	0.083	0.059	0.114			
42	0.114	0.111	0.084	0.084	0.087	0.079	0.076	0.082	0.081	0.081	0.081	0.083	0.051	0.121	0.024		
43	0.104	0.107	0.075	0.069	0.072	0.075	0.072	0.075	0.078	0.078	0.078	0.080	0.050	0.121	0.017	0.017	

**Conclusão**

## APÊNDICE B – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR RBCL

Título da sequência (Nome da Espécie/Código GenBank/Localidade da amostra)	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Gracilaria cuneata</i> (i08)							
2 <i>Gracilaria curtissiae</i> KP252956 Rio Grande do Norte, Diogo Lopes	0.003						
3 <i>Gracilaria intermedia</i> (i01)	0.059	0.059					
4 <i>Gracilaria intermedia</i> (i04)	0.059	0.059	0.003				
5 <i>Gracilaria intermedia</i> (i09)	0.058	0.058	0.001	0.001			
6 <i>Gracilaria intermedia</i> AY049336 Venezuela, Puerto Escondido	0.058	0.058	0.001	0.001	0.000	0.000	
7 <i>Gracilaria intermedia</i> (i10)	0.058	0.058	0.001	0.001	0.000	0.000	
8 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> KP252963 Paraíba, Conde, Carapibus	0.056	0.056	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005
9 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> KP252963 Rio Grande do Norte, Pirangi	0.056	0.056	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005
10 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> (i02)	0.045	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11 <i>Gracilariopsis silvana</i> (i03)	0.090	0.087	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099
12 <i>Gracilariopsis silvana</i> AY049309 Venezuela, Falcon State, La Vela de Coro	0.093	0.087	0.107	0.107	0.105	0.105	0.105
13 <i>Meristotheca papulosa</i> (i06)	0.176	0.184	0.176	0.176	0.175	0.175	0.175
14 <i>Meristotheca papulosa</i> AB195310 Japão, Ilha de Hachijo, Sokodo	0.173	0.173	0.181	0.181	0.178	0.178	0.178
15 <i>Meristotheca papulosa</i> AF099700 Japão, Chiba Pref, Tateyama	0.178	0.182	0.178	0.178	0.176	0.176	0.176
16 <i>Neosiphonia</i> sp. KC493352 Peru	0.171	0.171	0.180	0.182	0.180	0.180	0.180
17 <i>Solieria</i> sp. (i07)	0.144	0.145	0.141	0.141	0.139	0.139	0.139
18 <i>Solieria</i> sp. AF099712 Nova Zelândia, Auckland, Bacia de Orakei	0.157	0.156	0.172	0.172	0.170	0.170	0.170

Continua

	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9	0.000										
10	0.000	0.000									
11	0.105	0.105	0.105								
12	0.107	0.107	0.105	0.000							
13	0.185	0.185	0.180	0.157	0.161						
14	0.176	0.176	0.183	0.151	0.152	0.033					
15	0.182	0.182	0.183	0.157	0.156	0.038	0.000				
16	0.180	0.180	0.163	0.171	0.187	0.197	0.193	0.205			
17	0.150	0.150	0.140	0.132	0.141	0.064	0.065	0.067	0.181		
18	0.173	0.173	0.163	0.157	0.161	0.080	0.074	0.072	0.185	0.036	

Conclusão

## APÊNDICE C – TABELA DE DISTÂNCIAS PARA MARCADOR COI

Título da sequência (Nome da Espécie/Código GenBank/Localidade da amostra)	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Agardhiella subulata</i> (i13)							
2 <i>Agardhiella subulata</i> KF714838 Italia, Messina, Lago Ganzirri	0.115						
3 <i>Caulacanthus ustulatus</i> HQ423094 Hawaii	0.122	0.107					
4 <i>Ceramiales sp.</i> HQ423125 Hawaii	0.213	0.204	0.206				
5 <i>Gracilariopsis silvana</i> Piauí, Luís Correia, Praia do Coqueiro	0.233	0.205	0.222	0.192			
6 <i>Gracilaria domingensis</i> KP210174 Santa Catarina, Ponta das Canas	0.219	0.212	0.219	0.193	0.005		
7 <i>Gracilaria domingensis</i> KP210177 Bahia, Santa Cruz de Cabralia, Apua	0.223	0.216	0.223	0.197	0.003	0.002	
8 <i>Gracilaria domingensis</i> KP210198 Bahia, Uruçuca, Serra Grande	0.230	0.200	0.213	0.188	0.023	0.022	0.020
9 <i>Gracilaria domingensis</i> Piauí, Cajueiro da Praia, Praia da Barrinha	0.231	0.199	0.215	0.187	0.024	0.027	0.026
10 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> (i12)	0.220	0.209	0.214	0.186	0.030	0.027	0.026
11 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> (i16)	0.234	0.203	0.219	0.190	0.005	0.003	0.002
12 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> JQ843340 Paraíba, Conde, Carapibus	0.231	0.203	0.219	0.190	0.001	0.003	0.002
13 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> KP210197 Santa Catarina, Florianópolis, Ponta das Canas	0.231	0.203	0.219	0.192	0.003	0.002	0.000
14 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> KP210198 Rio Grande do Norte, Pirangi	0.236	0.213	0.224	0.196	0.006	0.005	0.003
15 <i>Gracilaria yoneshigueana</i> KP210199 Rio Grande do Norte, Rio do Fogo	0.224	0.186	0.194	0.191	0.142	0.145	0.148
16 <i>Gracilariopsis silvana</i> (i11)	0.223	0.187	0.194	0.191	0.148	0.145	0.148
17 <i>Gracilariopsis silvana</i> KP210202 Rio Grande do Norte, Praia de Ponta Negra	0.221	0.187	0.194	0.191	0.139	0.145	0.148
18 <i>Gracilariopsis silvana</i> KP210203 Espírito Santo, Castelhanos	0.233	0.187	0.194	0.198	0.146	0.153	0.152
19 <i>Gracilariopsis silvana</i> KP210204 Espírito Santo, Castelhanos	0.233	0.187	0.194	0.198	0.146	0.153	0.152
20 <i>Gracilariopsis silvana</i> KP210205 Espírito Santo, Meaípe	0.231	0.187	0.190	0.193	0.144	0.147	0.150
21 <i>Gracilariopsis silvana</i> KP210206 Espírito Santo, Marataizes	0.235	0.191	0.194	0.198	0.148	0.151	0.154
22 <i>Rhodymenia prolifcans</i> HM033143 Australia, Tasmania, Bicheno, Rocky front past Governor-s Reserve	0.217	0.185	0.187	0.202	0.204	0.200	0.202
23 <i>Rhodymenia stenoglossa</i> HM033152 Australia, Victoria, Warnambool	0.224	0.195	0.195	0.195	0.207	0.203	0.208
24 <i>Solieria sp.</i> Piauí, Luís Correia, Praia do Coqueiro	0.123	0.089	0.125	0.195	0.222	0.224	0.222

**Continua**

	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9	0.005																
10	0.007	0.008															
11	0.022	0.026	0.028														
12	0.022	0.022	0.028	0.003													
13	0.020	0.024	0.027	0.002	0.001												
14	0.024	0.029	0.030	0.005	0.005	0.003											
15	0.134	0.133	0.135	0.143	0.140	0.140	0.147										
16	0.140	0.139	0.133	0.148	0.146	0.146	0.151	0.003									
17	0.138	0.133	0.135	0.146	0.138	0.138	0.149	0.002	0.003								
18	0.144	0.138	0.135	0.153	0.144	0.144	0.157	0.022	0.019	0.019							
19	0.144	0.138	0.135	0.153	0.144	0.144	0.157	0.022	0.019	0.019	0.000						
20	0.142	0.136	0.133	0.152	0.143	0.143	0.155	0.025	0.022	0.022	0.006	0.006					
21	0.146	0.140	0.137	0.155	0.146	0.146	0.159	0.028	0.026	0.025	0.009	0.009	0.003				
22	0.194	0.193	0.194	0.204	0.202	0.204	0.208	0.201	0.206	0.206	0.210	0.210	0.208	0.212			
23	0.202	0.203	0.202	0.207	0.205	0.207	0.208	0.202	0.207	0.207	0.211	0.211	0.209	0.213	0.011		
24	0.208	0.207	0.211	0.220	0.220	0.220	0.229	0.196	0.199	0.199	0.197	0.197	0.199	0.203	0.191	0.203	

**Conclusão**