

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

FLORA DAS ALGAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS  
(Corallinales, Rhodophyta) DA ILHA DESERTA, LITORAL SUL DO  
BRASIL - UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA E  
MOLECULAR

João Lucas de Siqueira Rosa

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Jr.  
Co-orientadora: Marina Nasri Sissini

Florianópolis 2014.  
João Lucas de Siqueira Rosa

FLORA DAS ALGAS CALCÁRIAS NÃO ARTICULADAS  
(Corallinales, Rhodophyta) DA ILHA DESERTA, LITORAL SUL DO  
BRASIL - UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA E  
MOLECULAR

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Jr.  
Co-orientadora: Marina Nasri Sissini

Florianópolis 2014.

## **Agradecimentos**

A toda minha família pelo suporte durante esses anos de curso e por não ficar perguntando se eu já não devia ter me formado há alguns semestres atrás.

À minha namorada, Letícia, pela ajuda imprescindível com o Corel e por ter aguentado minha chatice (além do normal) nessas últimas semanas. Sem você esse trabalho com certeza não teria saído a tempo, te amo!

Ao meu orientador, Paulo Horta, por todo o apoio, conhecimento e por não ter me cortado do laboratório quando eu sumia por alguns dias, haha.

Agradeço a todo o pessoal do LAFIC: Allan, Cintia Martins, Cintia Lhullier, Debora, Dudu, Ellie, Lidi, Manu, Mateus Reck, Thaís, Vanessa Freire e Vanessa Poletto, por fazerem de lá um ambiente de trabalho agradável e divertido.

Ao pessoal do LAM, que me recebeu em São Paulo por alguns dias e me auxiliou na biologia molecular, em especial a Talita Vieira, que parou suas obrigações por alguns dias e me ajudou muito.

Um obrigado especial a Marina Sissini, por todas as dicas, revisões e ensinamentos.

Obrigado aos professores Fred Gurgel, Leonardo Rorig e José Barufi, por terem aceitado participar da minha banca.

Um abraço para todos os amigos que fiz durante a faculdade: Alceu, Brunão, outro Brunão, Cris e Jana, Coala e Vi, Bruninho e Gi, Drica e Forró, Tino Marcos, Otávio, Pedrão, Pedronha, Hugão e muitos outros! E aos amigos antigos de Jacareí: Bola, Carlão, Potter, Will, Vitoxa e Leozinho.

Por fim, deixo aqui meus agradecimentos aos seguintes estabelecimentos: Meu Escritório, Container Bar e aos finados Pida e Bar da Nina por fazerem da minha graduação um período muito mais prazeroso.

## Resumo

Dentro do filo Rhodophyta estão inclusas as algas calcárias, que depositam carbonato de cálcio em suas paredes celulares. A taxonomia desse grupo ainda é bastante complicada devido ao tratamento necessário para a análise das estruturas morfoanatômicas e a frequente ausência de estruturas reprodutivas que guardam as características que segregam gêneros e delimitam espécies. Por esse motivo, procurou-se por alternativas que auxiliem no estudo do grupo, sendo uma delas a utilização de ferramentas moleculares aliada às análises. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as espécies de algas calcárias do litoral sul do Brasil, especificamente do banco de rodolitos da Ilha Deserta na Reserva Biológica (ReBio) Marinha do Arvoredo, Santa Catarina. As identificações foram realizadas com base na taxonomia clássica, utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura juntamente com os estudos moleculares baseados em sequências de DNA dos marcadores UPA, *psbA* e *cox1*. Foram identificadas três espécies: *Mesophyllum erubescens*, *Lithothamnion heteromorphum* e *Lithophyllum margaritae*, e os dados moleculares corroboraram com a identificação desses táxons. Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho são os primeiros que registram a ocorrência de um novo banco de rodolitos para o sul do Brasil.

## Lista de figuras

Figura 1. Características morfológicas para a determinação das ordens Corallinales e Sporolithales, adaptado de Farr et al. (2009). .	10
Figura 2. Vista aérea da Ilha Deserta. ....	13
Figura 3. Banco de rodolitos da Ilha Deserta. ....	13
Figura 4. Mapa com localização da Reserva do Arvoredo e da Ilha Deserta.....	14
Figuras 5-6 Aspectos vegetativos de <i>Mesophyllum erubescens</i> . ....	21
Figuras 7-11 Aspectos reprodutivos de <i>Mesophyllum erubescens</i> . ...	21
Figuras 12-13 Aspectos vegetativos de <i>Lithothamnion heteromorphum</i> .....	23
Figuras 14-19 Aspectos reprodutivos de <i>Lithothamnion heteromorphum</i> . ....	23
Figuras 20-21 Aspectos vegetativos de <i>Lithophyllum margaritae</i> . ...	26
Figuras 22-25 Aspectos reprodutivos de <i>Lithophyllum margaritae</i> . .	26
Figuras 26-28 Aspectos vegetativos de Melobesioideae sp. ....	28
Figuras 29-30 Aspectos reprodutivos de Melobesioideae sp. ....	28
Figura 31. Filograma de distância de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) para as sequências do marcador UPA. ....	30
Figura 32. Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador <i>psbA</i> . ....	32
Figura 33. Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador <i>cox1</i> . ....	33

## Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para PCR e sequenciamento.....	17
Tabela 2. Comparação entre populações distintas de <i>Mesophyllum erubescens</i> mais o <i>Melobesioideae</i> sp.1 deste estudo. ....	36
Tabela 3. Comparação entre populações distintas de <i>Lithothamnion</i> . ..	40
Tabela 4. Comparação entre <i>Lithophyllum margaritae</i> do presente estudo e México. ....	43
Tabela 5. Divergência genética intraespecífica para os marcadores utilizados. ....	45
Tabela 6. Divergência genética interespecífica para os marcadores utilizados. ....	45

## Sumário

1. Introdução .....	9
2. Objetivos .....	12
2.1. Objetivos Gerais.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. Materiais e métodos .....	12
3.1. Área de estudo e coleta das algas .....	12
3.2. Preparo das amostras.....	14
3.3. Análise morfológica.....	14
3.3.1. Análise em microscopia óptica .....	15
3.3.2. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)....	16
3.4. Análise Molecular .....	16
3.4.1. Extração de DNA.....	16
3.4.2. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 16	
3.4.3. Purificação e quantificação do produto de PCR.....	18
3.4.4. Sequenciamento e Precipitação.....	18
3.4.5. Montagem e análise de sequências .....	18
3.4.6. Análises filogenéticas .....	19
4. Resultados .....	19
4.1. Estudo morfológico.....	19
4.2. Estudo molecular.....	28
5. Discussão.....	34
6. Conclusão.....	46





## 1. Introdução

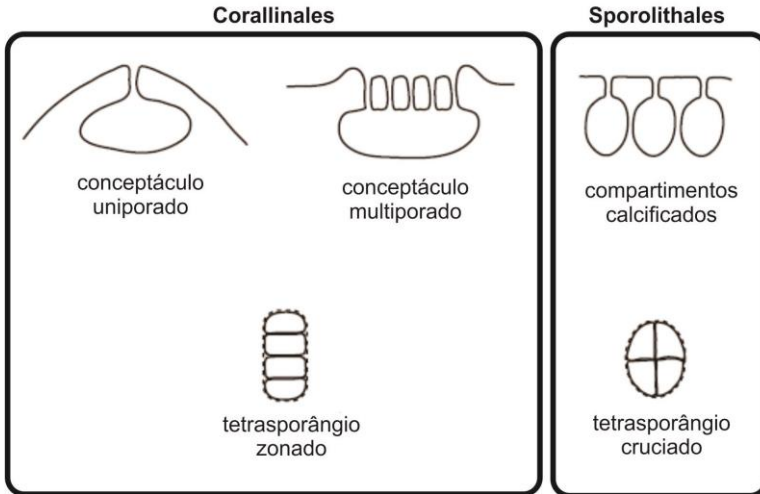
Também conhecidas como algas vermelhas, as Rhodophyta são organismos fotossintetizantes que possuem em seus cloroplastos os pigmentos clorofila *a*, ficobiliproteínas, e carotenoides, tendo como substância de reserva o amido das florideas, um polissacarídeo semelhante ao glicogênio. Podem ser encontradas tanto em regiões de águas tropicais como de água fria, e atualmente se tem conhecimento de aproximadamente 6000 espécies, sendo a maior parte de ambientes marinhos. Dentro desse grupo, existem algumas algas vermelhas que depositam carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em suas paredes celulares e são conhecidas como algas calcárias.

De acordo com Joly (1967), morfologicamente, as algas calcárias podem ser divididas em: a) articuladas ou geniculadas – onde apresentam uma parte do talo onde não há calcificação (genículos) o que proporciona flexibilidade ao talo; e b) não articuladas ou não geniculadas – onde todo o talo da alga apresenta calcificação. Entre as algas calcárias não articuladas, existem aquelas que crescem aderidas/incrustadas ao substrato e outras que não são fixas, ou seja, possuem hábito livre e podem ser chamadas de rodolitos, nódulos ou maërl (Woelkerling, 1988). Por não serem fixas ao substrato, elas podem se acumular e formar os conhecidos bancos de rodolitos, que agregam uma grande biodiversidade associada (Steller *et al.* 2003; Riul *et al.* 2009).

Durante o início século XVIII, as algas calcárias não articuladas eram consideradas estalactites inorgânicas, sendo posteriormente classificadas como corais da classe Hydrozoa por Linnaeus em 1767 (Horta, 2002). Somente em 1837 foram definidas de forma clara como plantas por Philip (*apud* Horta, 2002), o qual propôs os gêneros *Lithothamnion* e *Lithophyllum*.

Até quatro anos atrás, a classificação de algas calcárias seguia a proposta por Harvey *et al.* (2003), que consistia na divisão da ordem Corallinales em três famílias: Hapalidiaceae, Corallinaceae e Sporolithaceae. Entretanto, com base em estudos filogenéticos e morfológicos Le Gall *et al.* (2010) elevou a família Sporolithaceae à ordem Sporolithales, esta com apenas uma família, Sporolithaceae. A proposta do estudo foi sustentada levando em conta a ausência de conceptáculos em Sporolithales e na presença de tetrasporângios cruciados, e não zonados, como observado nas Corallinaceae e Hapalidiaceae (Figura 1). Dentro dessa classificação, as algas calcárias

não articuladas abrangem cerca de 1000 espécies, contudo, estudos utilizando sequências de DNA vem mostrando que a diversidade deste grupo ainda é subestimada. Sissini *et al.* (*in press*) mostram através de análises filogenéticas que ao menos 12 taxa geneticamente distintos são posicionados sob o epíteto *Mesophyllum erubescens*.



**Figura 1.** Características morfológicas para a determinação das ordens Corallinales e Sporolithales, adaptado de Farr et al. (2009).

Apesar de ocuparem variados habitats marinhos, desde zonas tropicais até regiões polares e em diferentes profundidades, desde a zona das marés até 268 metros (Littler *et al.* 1986) e de possuírem uma enorme importância ecológica e econômica, as algas calcárias não articuladas são pouco conhecidas no mundo, e não diferentemente, no Brasil (Horta, 2002).

Além do valor econômico dessas algas, que são utilizadas na fabricação de fertilizantes, aditivos alimentícios e cal, há de se ressaltar que são uma das principais fixadoras de CO<sub>2</sub> na forma de carbonato de cálcio (Oliveira, 1996). Em relação à sua importância ecológica, destaca-se o fato de que os bancos de rodolitos servem de substrato para o crescimento de outras algas e em suas reentrâncias (formando uma estrutura tridimensional) promovem abrigo e proteção para diversas

espécies de invertebrados, crustáceos e peixes (Steller *et al.* 2003; Barbera *et al.* 2003; Riul *et al.* 2009).

A taxonomia de Corallinales ainda é bastante difícil e confusa, tanto devido ao tratamento necessário para a análise das estruturas morfoanatômicas (um processo longo de descalcificação, desidratação, infiltração e emblocamento) como a frequente ausência de estruturas reprodutivas que, até então, guardam as características que segregam gêneros e delimitam espécies.

Por causa dessas circunstâncias, procurou-se por alternativas que auxiliem no estudo do grupo, sendo uma delas a utilização de ferramentas moleculares. O uso de sequências de DNA vem sendo cada vez mais utilizadas na delimitação de gêneros e espécies (Vidal *et al.* 2003; Peña *et al.* 2011; Bahia *et al.* 2013; Sissini *et al. in press*). Visando padronizar a região do DNA utilizada para posteriores comparações, Saunders (2005), motivado pela obtenção dos ótimos resultados obtidos com outros grupos de organismos (Hebert *et al.* 2003), propôs a utilização da região que transcreve a subunidade 1 do gene citocromo oxidase (cox1, COI) para os estudos moleculares com algas vermelhas. O fato de ser uma região curta, de fácil amplificação e possuir *primers* universais faz dele um excelente candidato à *DNA Barcoding*. *DNA Barcoding* é uma proposta ambiciosa de conseguir “etiquetar” todos os organismos vivos, onde uma região curta de DNA guardaria a identidade da espécie, de forma análoga aos códigos de barras dos produtos manufaturados.

Outro marcador indicado como *DNA Barcoding* é o UPA (*Universal Plastid Amplicon*), uma região pequena (em torno de 410 pares de bases) do DNA plastidial e bastante conservada. Apesar de ter mostrado resultados positivos entre as Rhodophyta (Sherwood *et al.* 2010), não é utilizado para todos os grupos de algas, como as algas verdes (Presting, 2006).

O *psbA*, região que transcreve para proteína D1 da membrana do tilacóide do fotossistema II, possui cerca de 1050 pares de bases e é outro marcador que vem sendo utilizado com sucesso em estudos sobre algas vermelhas (Seo *et al.* 2003; Yang & Boo, 2004) e mais especificamente foi utilizado na reconstrução filogenética de algas calcárias da Nova Zelândia por Broom *et al.* (2008).

Levando em consideração todo o contexto explicitado acima, a ausência do conhecimento real da diversidade deste grupo de algas, tão importante ecologicamente quanto economicamente no litoral brasileiro, e as ameaças às quais este grupo está exposto diante da iminente

acidificação dos oceanos, a determinação das algas calcárias no litoral sul do Brasil é de grande relevância, uma vez que este é o limite sul de distribuição dos bancos de rodolitos no Atlântico Sul Ocidental.

Resultados obtidos por Martin & Gattuso (2009) mostraram que o aumento da temperatura e da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera diminuem consideravelmente a taxa de calcificação das algas calcárias, podendo acarretar na morte das mesmas e na diminuição dos habitats coralíneos afetando a biodiversidade e bioquímica da região.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Caracterizar as espécies de algas calcárias do litoral sul do Brasil, especificamente do banco de rodolitos da Ilha Deserta (REBio Arvoredo), Santa Catarina, Brasil.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Identificar espécimes com base nos aspectos morfoanatômicos, utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, buscando características diagnósticas para a determinação de gêneros e espécies.

2. Utilizar as sequências de DNA dos marcadores moleculares UPA, *psbA* e *cox1* como um caractere diagnóstico complementar.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Área de estudo e coleta das algas**

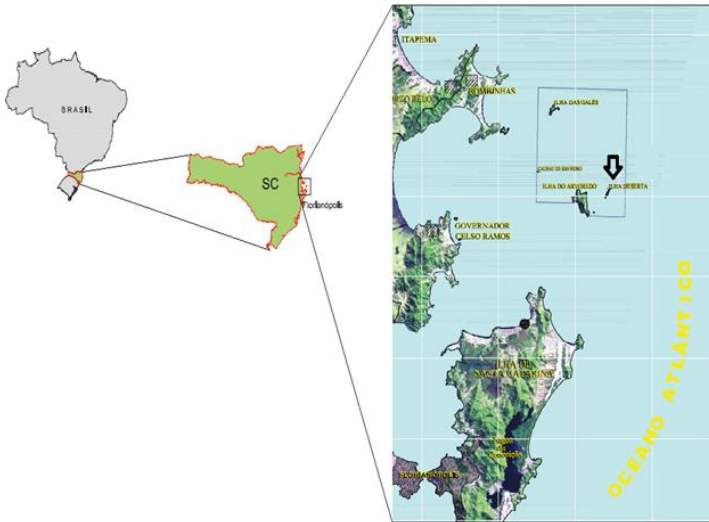
As algas foram coletadas através de mergulho autônomo no banco de rodolitos (Figura 3) da Ilha Deserta (Figura 2), pertencente à Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, no litoral de Santa Catarina, que se encontra nas coordenadas de 27°17'57''S e 48°21'23''O (Figura 4) no dia 05/03/2014. Todas as amostras foram coletadas a 10 metros de profundidade.



**Figura 2.** Vista aérea da ilha deserta (foto: Zig Koch).

**Figura 3.** Banco de rodolitos da Ilha Deserta (foto: Eduardo Bastos).

A Reserva Biológica Marinha do Arvoredo é a única reserva biológica federal que contém remanescentes de Mata Atlântica presentes em suas ilhas (Ilha do Arvoredo com 318,6 ha, Ilha das Galés com 39,7 ha e Ilha Deserta com 13,2 ha.). Ressalta-se, também, que é a única Reserva Biológica Marinha presente nas regiões sul e sudeste do país (IBAMA, 2004).



**Figura 4:** Mapa com a localização da Reserva do Arvoredo e da Ilha Deserta (seta). Fonte: (IBAMA, 2004).

### 3.2. Preparo das amostras

Em laboratório, foram selecionados 15 rodolitos e os mesmos foram separados em cinco grupos de três espécimes, de acordo com seus morfotipos. Então, armazenados em eppendorfs com sílica e em potes com formol durante um dia, sendo posteriormente movidos para o álcool glicerinado (70% álcool absoluto, 20% água destilada e 10% glicerina), para os estudos moleculares e morfoanatômicos, respectivamente. Todas as amostras devidamente identificadas com data e local de coleta.

### 3.3. Análise morfológica

As lâminas e os suportes de alumínio (*stubs*) utilizados para a observação em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente, foram preparados de acordo com os procedimentos de Horta (2000) e a terminologia morfológica e anatômica empregada estão de acordo com Woelkerling (1988).

### 3.3.1. Análise em microscopia óptica

Para a observação em microscopia óptica, foram selecionadas regiões dos rodolitos que continham conceptáculos e/ou margens de crescimento que passaram pelas seguintes etapas:

#### a) Descalcificação

Para a descalcificação do material, os espécimes selecionados ficaram submersos em uma solução de ácido clorídrico 5% até não se observar mais a liberação de bolhas, sendo realizada a troca do ácido quantas vezes fossem necessárias até que os fragmentos estivessem totalmente descalcificados. O tempo necessário variou dependendo do tamanho dos fragmentos selecionados.

#### b) Desidratação e infiltração

Após a descalcificação, o material foi desidratado em soluções de 30, 50, 70, 90 e 100% de etanol, com duração de 20 minutos em cada solução. Em seguida, o material foi infiltrado por, no mínimo, 12 horas em solução de metacrilatoglicol e emblocado segundo as instruções do fabricante (*Historesin embedding Kit* Leica, marca Reichert-Jung).

#### c) Cortes histológicos

Os cortes foram realizados em um micrótomo rotativo Leica RM 2125 RT, com navalha de aço, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC, organizados em lâminas e corados em azul de toluidina acidificado com ácido bórico (0,16g de toluidina: 1,6g de ácido bórico em 10mL de água destilada). Em um microscópio de luz Leica DM2500, conectado a um computador, foi realizada a análise das estruturas morfológicas pertinentes à identificação dos espécimes com auxílio do Leica Application Suite v.4.4. Foram observados caracteres vegetativos como cor e textura dos talos; forma, comprimento e diâmetro das células epiteliais e subepiteliais; presença de conexões secundárias entre as células com o filamento adjacente e presença/ausência de fusões celulares; assim como caracteres reprodutivos, sendo eles a forma, comprimento e diâmetro dos conceptáculos tetrasporangiais, tamanho dos tetrasporângios, presença ou ausência de columela central, número de células do teto do conceptáculo e do canal do poro.

### 3.3.2. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material utilizado no MEV foi observado na lupa para a seleção de espécimes contendo conceptáculos e/ou margem de crescimento. Foram feitas fraturas do material selecionado, tentando obter a orientação perpendicular à superfície. As fraturas foram alocadas sobre um suporte mecânico de alumínio cuja superfície é coberta por uma fita de carbono. Estas amostras foram metalizadas com ouro 95%, e analisadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

### 3.4. Análise Molecular

O processamento das amostras para o estudo molecular até a etapa de amplificação foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Botânica (LBM/ BOT) da UFSC e as demais etapas realizadas no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Profa. Mariana Cabral de Oliveira.

#### 3.4.1. Extração de DNA

Pequenos pedaços das algas calcárias, preferencialmente das regiões mais limpas e terminais, foram selecionados e quebrados com o auxílio de um alicate e macerados em nitrogênio líquido dentro de um almofariz previamente resfriado. A extração de DNA foi feita com o *kit* “NucleoSpin Plant II” (Macherey-Nagel), de acordo com o protocolo do fornecedor.

#### 3.4.2. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction*) consiste na replicação de fragmentos de DNA de interesse.

Foram utilizados três marcadores nesse estudo, sendo eles: UPA, *cox1* e *psbA*. Para a amplificação de UPA foram utilizados os *primers*



UPA-F e UPA-R (Presting, 2006). Os *primers* GAZ-F1 e GAZ-R1 foram utilizados para *cox1* e para *psbA* foram utilizados *psbA-F* e *psbA-R* (Yoon *et al.* 2002). As seqüências dos *primers* estão na tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para PCR e sequenciamento.

UPA F	5´- GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA - 3´
UPA R	5´- TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG - 3´
<i>psbA</i> F	5´- ATG ACT GCT ACT TTA GAA AGA CG - 3´
<i>psbA</i> R2	5´- TCATGCATWACTTCCATACCT - 3´
<i>psbA</i> 500F *	5´- CTC TGA TGG WAT GCC WYT AGG - 3´
<i>psbA</i> 550R*	5´- TTR TGT TCR GCY TGR AAT AC - 3´
GAZ-F1	5´- TCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3´
GAZ-R1	5´- ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA - 3´

\*Os *primers psbA* 500F e *psbA* 550R foram utilizados apenas no sequenciamento.

Para a preparação das reações de PCR foi utilizada a seguinte proporção de reagentes: 32,75µL de água, 1µL de DNA total, 10µL de tampão, 3µL de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de dNTP, 1µL de cada par de primer (“forward e reverse”) e 0,25µL de Taq Polimerase (Invitrogen), totalizando um volume final de 50mL. Com o propósito de conferir a pureza dos reagentes, também foram feitos controles negativos de PCR (todos os reagentes menos DNA).

A reação da PCR foi realizada em termociclador Techne TC-512 (Analítica) com

os seguintes ciclos para cada marcador:

- *psbA* - 94°C por 2 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 47°C por 1 min, 72°C por 2 min; e a extensão final a 72°C por 7 min.
- *cox 1* - 94°C por 4 min; 37 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min; e a extensão final a 72°C por 7 min.
- UPA - 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 20 s, 55°C por 30 s, and 72°C por 30 s; e a extensão final a 72°C por 10 min.

Para verificar se a amplificação havia sido bem sucedida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,7% em TBE e corado com *gel red*. O gel resultante foi observado em transluminador UV e fotografado com câmera digital.

#### 3.4.3. Purificação e quantificação do produto de PCR

Os produtos da PCR foram purificados em colunas “GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fornecedor.

A quantificação também foi realizada através de eletroforese em gel de agarose, comparando a banda de cada produto de DNA purificado com o marcador padrão “1Kb DNA ladder” (Invitrogen).

#### 3.4.4. Sequenciamento e Precipitação

A reação de sequenciamento foi feita com o kit “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” da Applied Biosystems segundo o protocolo do fornecedor.

Para cada reação, foram utilizados: 2µl de tampão, 2µl de BigDye, entre 1µl e 3µl de primer *forward* ou *reverse* (de acordo com a concentração), entre 2 e 4µl de produto de PCR purificado (dependendo da quantificação observada) e a quantidade de água para completar um volume total de 10µl.

O ciclo utilizado na reação de sequenciamento foi: 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

A precipitação foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pela Applied Biosystems, utilizando-se EDTA, acetato de sódio e etanol.

#### 3.4.5. Montagem e análise de sequências

A montagem e alinhamento das sequências foram realizadas no programa BioEdit (Hall, 1999) juntamente com o Geneious e comparadas com o banco de dados disponível no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do BLAST (Altschul *et al.* 1997).

### 3.4.6. Análises filogenéticas

As árvores foram construídas usando o método de distância *neighbour-joining* (NJ) para todos os marcadores e máxima verossimilhança (MV) para *psbA* e *cox1*. Os modelos evolutivos ótimos para as análises foram obtidos através do MEGA 6 e as árvores geradas no mesmo programa. Foram utilizadas 1000 réplicas (valor de *bootstrap*) para ambas as análises. Os valores de *bootstrap* referentes às análises de NJ estão acima dos ramos e em preto, e às de MV estão expressos abaixo e em laranja. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética.

Nas árvores descritas foram plotados apenas os valores maiores que 50% para *bootstrap* e considerou-se a seguinte escala arbitrária para descrever as porcentagens de suporte:

- 50-69 suporte baixo;
- 70-85 suporte moderado;
- 86-100 suporte alto.

Para a definição da variação genética entre as sequências foi gerada uma matriz de divergência com auxílio do BioEdit.

## 4. Resultados

### 4.1. Estudo morfológico

*Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine 1928:252

Basiônimo: *Lithothamnion erubescens* Foslie 1900:9-10, Taylor (1960)

Localidade Tipo: Arquipélago Fernando de Noronha, Brasil

Sinônimos Homotípicos:

*Lithothamnion erubescens* Foslie 1900

Sinônimos Heterotípicos:

*Lithothamnion erubescens* f. *madagascarensis* Foslie 1901

*Lithothamnion erubescens* f. *haingsisianum* Weber-van Bosse & Foslie 1901

*Lithothamnion erubescens* f. *subflabellatum* Foslie 1904

*Lithothamnion madagascarensis* (Foslie) Foslie 1906

*Lithothamnion patena* f. *incisa* Foslie 1906

*Lithothamnion incisum* (Foslie) Foslie 1907

*Mesophyllum incisum* (Foslie) Adey 1970

*Mesophyllum madagascarensis* (Foslie) Adey 1970

*Polyporilthon patena* var. *incisa* (Foslie) Chapman & Parkinsn (1974)

### Hábito

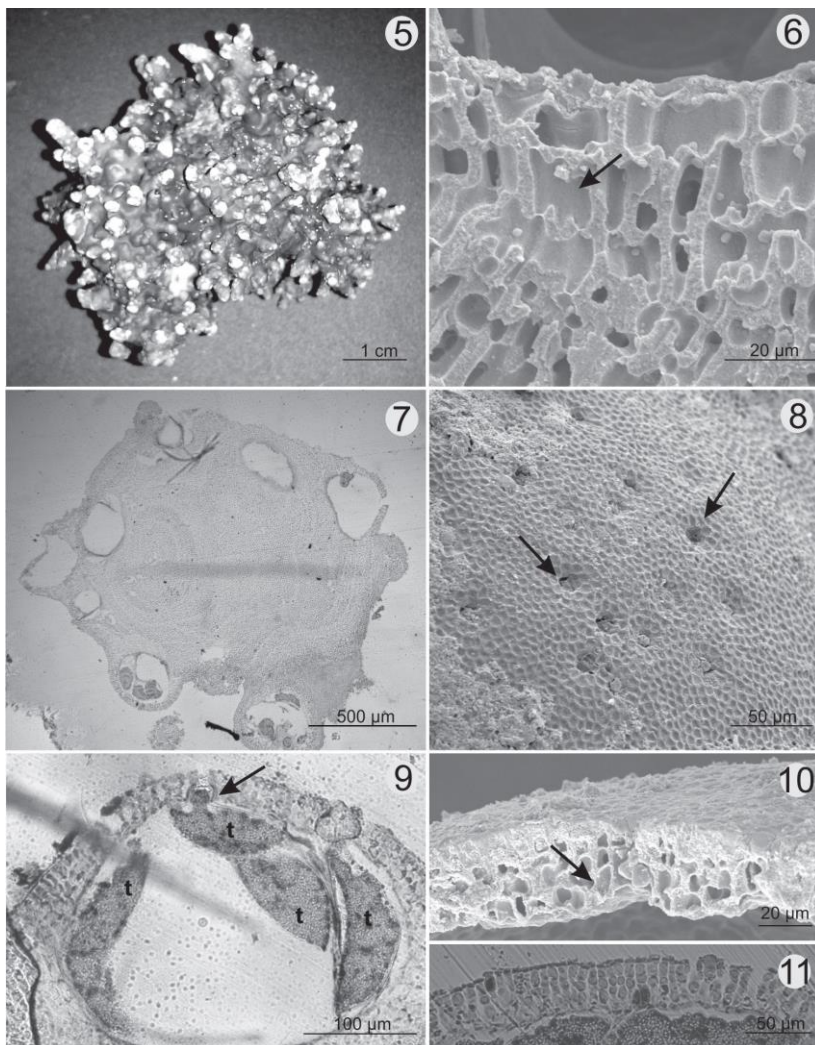
Ocorrendo sob forma de vida livre (rodolito), esta espécie foi encontrada no banco de algas calcárias da Ilha Deserta na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.

### Estrutura vegetativa

Talo rosa amarronzado, com protuberâncias entre 2-3 mm em diâmetro e 4-7 mm em altura (figura 5); talo pseudoparenquimatoso com organização monômera. Células subepiteliais mais altas do que as subseqüentes, com 9,4-11,6  $\mu\text{m}$  de altura e 5,8-7,9  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Apresentam uma única camada de células epiteliais cilíndricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça (figura 11), com 1,6-3 $\mu\text{m}$  de altura e 4,7-7,5 $\mu\text{m}$  de diâmetro. Células de filamentos adjacentes ligadas por fusões celulares (figura 6); conexões secundárias e haustórios ausentes; tricocitos não foram observados.

### Estrutura reprodutiva

Conceptáculos tetrasporângiais multiporados (figuras 7-8), elevados em relação à superfície do talo. Câmaras dos conceptáculos em forma elíptica (figuras 7-9), com 240-325 $\mu\text{m}$  de diâmetro e 120-219 $\mu\text{m}$  de altura; teto composto por filamentos com 4-5 células, com 32-41 $\mu\text{m}$  de espessura; poro delimitado por filamento de quatro células, sendo a célula basal mais alongada do que as demais células (figuras 9-10). Tetrasporângios com 31-72 $\mu\text{m}$  de diâmetro e 93-140 $\mu\text{m}$  de altura, formado por quatro tetrásporos zonados (figura 9). Não foram observadas plantas gametangiais.



**Figuras 5-6.** Aspectos vegetativos de *Mesophyllum erubescens*.

**Fig. 5.** Exemplar coletado na Ilha Deserta, SC.

**Fig. 6.** Imagem obtida no MEV evidenciando as fusões celulares (seta).

**Figuras 7-11.** Aspectos reprodutivos de *Mesophyllum erubescens*.

**Fig. 7.** Visão geral dos conceptáculos multiporados.

**Fig. 8.** Detalhe de um conceptáculo multiporado no MEV e seus poros (setas).

**Fig. 9.** Corte obtido em MO evidenciando os tetrasporângios zonados (t) e a última célula do canal do poro mais alongada (seta).

**Fig. 10.** Corte obtido em MEV evidenciando a célula basal do canal do poro mais alongada do que as anteriores (seta).

**Fig. 11.** Teto do conceptáculo evidenciando as células epiteliais e subepiteliais.

*Lithothamnion heteromorphum* (Foslie) Foslie 1907: 10

Basiônimo: *Lithothamnion erubescens* Foslie 1900:9-10, Taylor (1960)

Localidade Tipo: São Sebastião, Brasil

Hábito

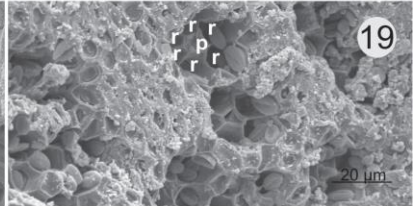
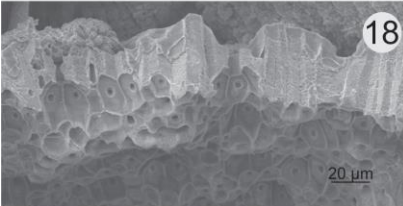
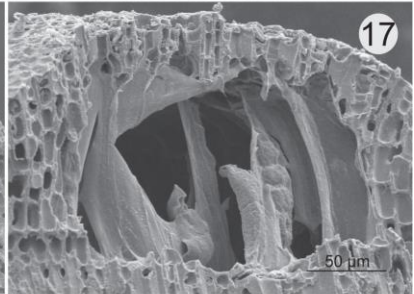
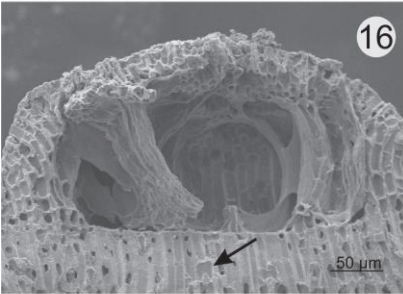
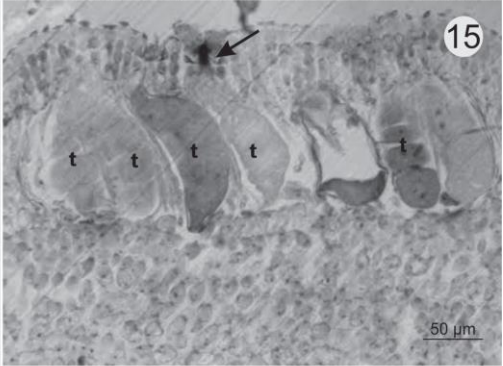
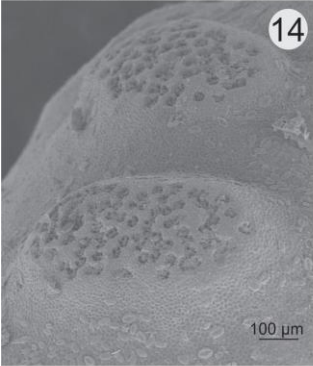
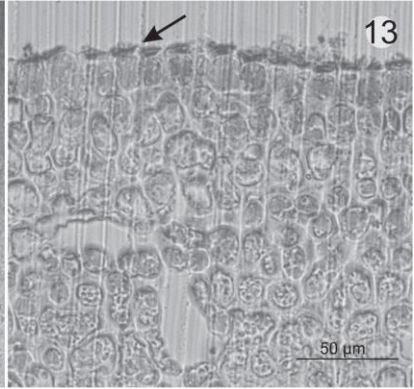
Ocorrendo sob forma de vida livre (rodolito), esta espécie foi encontrada no banco de algas calcárias da Ilha Deserta na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.

Estrutura vegetativa

Rodolito com morfologia fruticosa e de coloração vermelha amarronzada, com protuberâncias entre 4-7 µm de altura e 3-3,5 de diâmetro (figura 12). Talo de organização monômera. Apresenta uma única camada de células epiteliais em forma de taça com 2-4,5µm de altura e 7,8-11µm diâmetro (figura 13). Células subepiteliais com 11,5-14-9 µm de altura e 7,3-10 µm de diâmetro, podendo ser mais altas ou do mesmo tamanho que as subseqüentes. Filamentos ligados entre si por fusões celulares (figura 16). Tricocitos e conexões celulares secundárias não foram observados.

Estrutura reprodutiva

Conceptáculos tetrasporângiais multiporados (figura 14), elevados em relação à superfície do talo com câmara com 223-296 µm de diâmetro e 119-174 µm de altura, teto apresentando filamentos com 4-5 células e espessura de 38-59 µm (figura 17-18). Os poros são delimitados por filamentos de 4 células e circundados por 6 células de roseta (figura 19). Tetrasporângios zonados com 72-133 µm de altura e 30-65 µm de diâmetro (figura 15). Não foram observados conceptáculos femininos, masculinos e bisporangiais.



**Figuras 12-13.** Aspectos vegetativos de *Lithothamnion heteromorphum*.

**Fig. 12.** Exemplar coletado na Ilha Deserta, SC.

**Fig. 13.** Corte observado em MO evidenciando as células epiteliais em forma de taça (seta) e subepiteliais.

**Figuras 14-19.** Aspectos reprodutivos de *Lithothamnion heteromorphum*.

**Fig. 14.** Detalhe de um conceptáculo multiporado observado no MEV, mostrando a superfície do teto do conceptáculo tetrasporangial.

**Fig. 15.** Corte observado em MO de um conceptáculo multiporado evidenciando o canal do poro (seta) e os tetrasporângios zonados (t).

**Fig. 16-17.** Conceptáculos e fusões celulares (seta).

**Fig. 18-19.** Detalhe do poro (p) circundado por células de roseta (r).

### *Lithophyllum margaritae* (Hariot) Heydrich 1901: 530

Basiônimo: *Lithothamnion margaritae* Hariot, J. Bot. 9, p. 167. 1895.

Localidade Tipo: Baía de La Paz – Golfo da Califórnia (México)

Sinônimos Homotípicos:

*Pseudolithophyllum margaritae* (Hariot) Me.Lemoine

Sinônimos Heterotípicos:

*Lithothamnion diguetti* Hariot

*Lithophyllum diguetti* (Hariot) Heydrich

*Lithophyllum dentatum* f. *diguetti* (Hariot) Foslie

*Lithothamnion elegans* Foslie

*Lithothamnion elegans* Foslie f. *angulata* Foslie

*Goniolithon elegans* (Foslie) Foslie

*Lithophyllum elegans* (Foslie) Foslie

*Lithophyllum elegans* f. *angulata* (Foslie) Foslie

*Lithophyllum elegans* f. *complanata* (Foslie) Foslie

*Lithothamnion pallescens* Foslie

*Goniolithon pallescens* (Foslie) Foslie

*Lithophyllum pallescens* (Foslie) Foslie

*Lithophyllum lithophylloides* Heydrich

*Lithothamnion lithophylloides* (Heydrich) Foslie

*Lithophyllum veleroae* Dawson

Hábito

Ocorrendo sob forma de vida livre (rodolito) e também incrustada em uma concha de molusco, esta espécie foi encontrada no



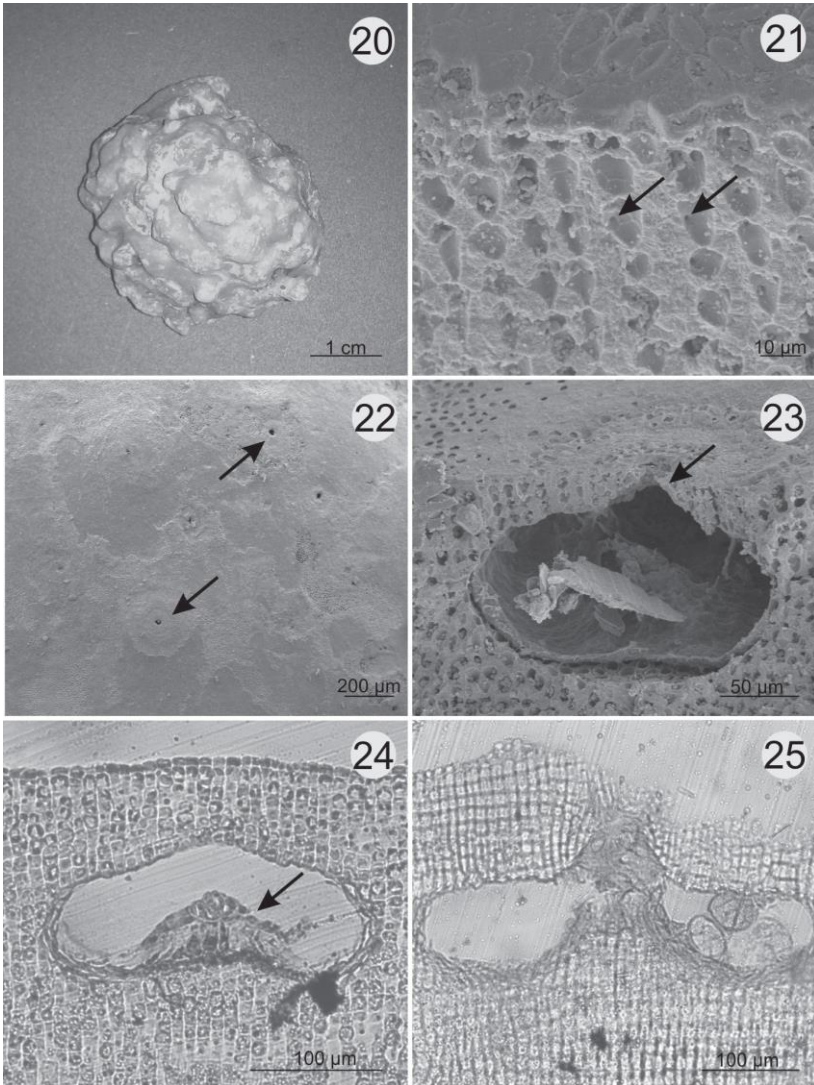
banco de algas calcárias da Ilha Deserta na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.

#### Estrutura vegetativa

Superfície do talo lisa de coloração rosa claro (figura 20), com suaves protuberâncias. Talo de organização monômera. Apresenta uma camada de células epiteliais cilíndricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça, com 3,1-4  $\mu\text{m}$  de altura e 8,5-10 $\mu\text{m}$  diâmetro. Células subepiteliais do mesmo tamanho que as subsequentes com 7,5-12,8  $\mu\text{m}$  de altura e 6,8-9,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Filamentos ligados entre si por conexões celulares secundárias (figura 21). Tricocitos não foram observados.

#### Estrutura reprodutiva

Conceptáculos tetrasporângiais uniporados (figura 23), no mesmo plano ou ligeiramente afundado em relação à superfície do talo (figura 22) com câmara com 185-230 $\mu\text{m}$  de diâmetro e 62-88  $\mu\text{m}$  de altura, teto apresentando 3-4 células de espessura e apresenta frequentemente columela central calcificada (figura 24). Conceptáculos enterrados foram observados (figuras 24-25). Tetrasporângios zonados com 42-54 $\mu\text{m}$  de altura e 20-28 $\mu\text{m}$  de diâmetro (figura 25). Não foram observados conceptáculos femininos, masculinos e bisporangiais.



**Figuras 20-21.** Aspectos vegetativos de *Lithophyllum margaritae*

**Fig. 20.** Exemplar coletado na Ilha Deserta, SC.

**Fig. 21.** Imagem em MEV evidenciando as células epiteliais, subepiteliais e conexões celulares secundárias (setas).

**Figuras 22-25.** Aspectos reprodutivos de *Lithophyllum margaritae*

**Fig. 22.** Conceptáculos uniporados no MEV (setas).

**Fig. 23.** Câmara do conceptáculo tetrasporangial uniporado; canal do poro

(seta).

**Fig. 24.** Câmara do conceptáculo tetrasporangial uniporado enterrado evidenciando a columela central (seta).

**Fig. 25.** Câmara do conceptáculo tetrasporangial uniporado enterrado.

## Melobesioideae sp.

### Hábito

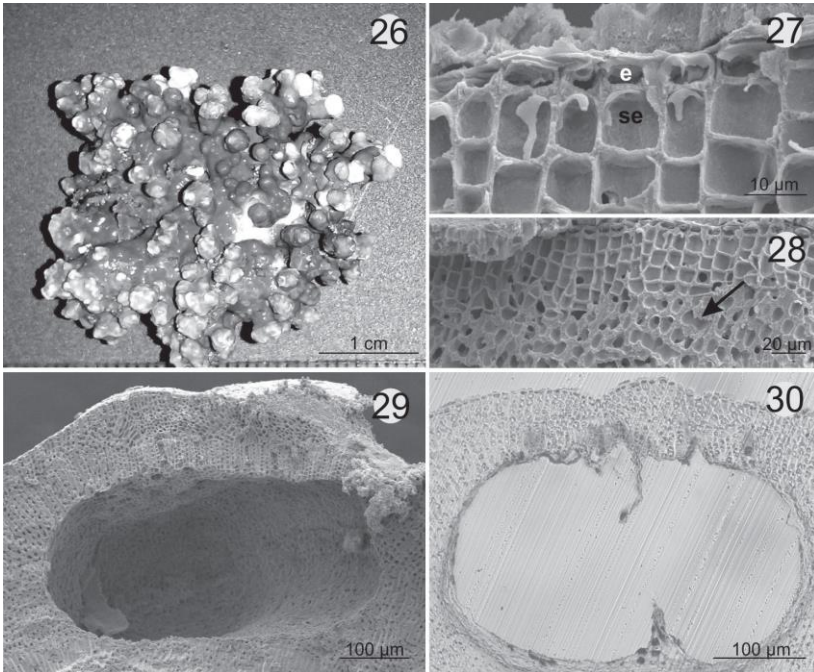
Ocorrendo sob forma de vida livre (rodolito), esta espécie foi encontrada no banco de algas calcárias da Ilha Deserta na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.

### Estrutura vegetativa

Talo rosa amarronzado, com protuberâncias entre 3-4 mm em diâmetro e 5,8-7,5 mm em altura (figura 26); talo pseudoparenquimatoso com organização monômera. Células subepiteliais da mesma altura ou mais altas que as subsequentes, com 9,3-11,2  $\mu\text{m}$  de altura e 5,0-8,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Apresentam uma única camada de células epiteliais cilíndricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça (figura 27), com 2,6-5,7  $\mu\text{m}$  de altura e 6,1-8,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Células de filamentos adjacentes ligadas por fusões celulares (figura 28); conexões secundárias e haustórios ausentes; tricocitos não foram observados.

### Estrutura reprodutiva

Conceptáculos tetrasporângiais multiporados (figura 29-30) com 205-369  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 191-226  $\mu\text{m}$  de altura. Não foram observados conceptáculos femininos, masculinos e bisporangiais.



**Figuras 26-28.** Aspectos vegetativos de **Melobesioideae sp.**

**Fig. 26.** Exemplar coletado na Ilha Deserta, SC.

**Fig. 27-28.** Imagem em MEV evidenciando as células epiteliais (e), subepiteliais (se) e fusões celulares (seta).

**Figuras 29-30.** Aspectos reprodutivos de **Melobesioideae sp.**

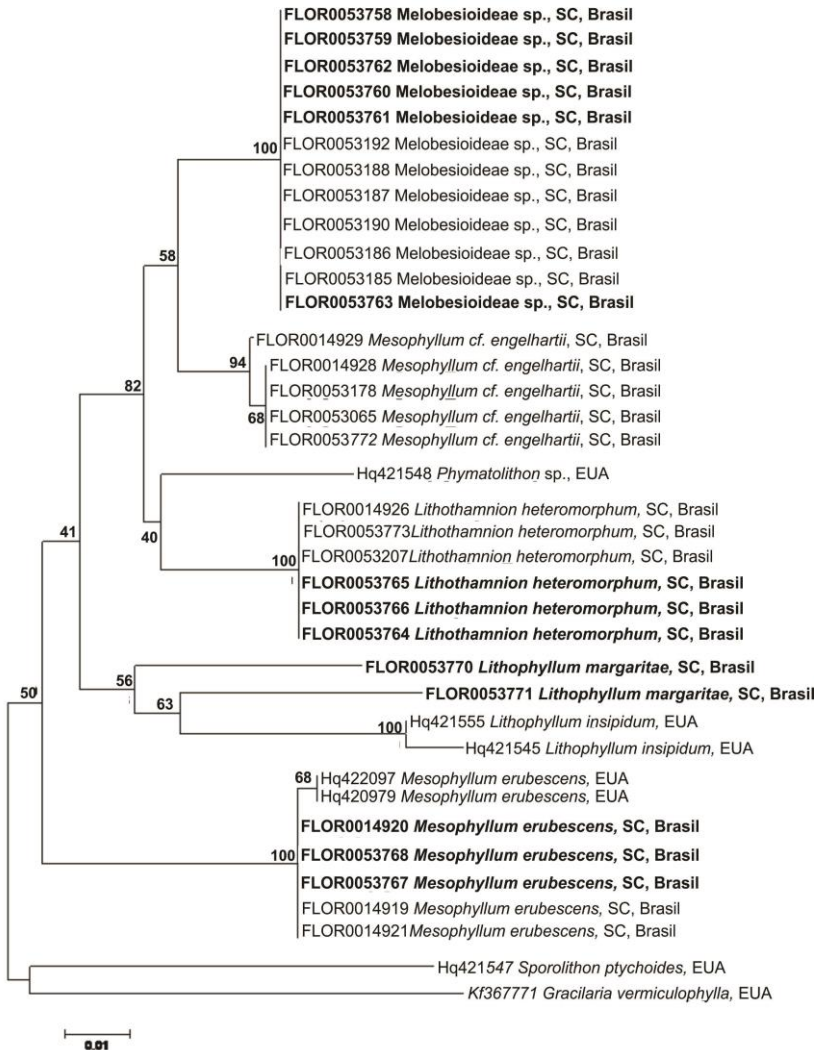
**Fig. 29-30.** Câmaras dos conceptáculos multiporados.

#### 4.2. Estudo molecular

Foram geradas no presente trabalho um total de 26 sequências a partir dos marcadores UPA, *psbA* e *cox1*. Para o marcador UPA, foram geradas 13 sequências, para *psbA* 10 e para o *cox1* três sequências. As sequências geradas foram utilizadas para análises de agrupamento e filogenéticas e foram enriquecidas com outras do banco de dados *Genbank* assim como outras obtidas em um trabalho realizado no mesmo laboratório por Sissini *et al.* (*in press*). Todas as sequências geradas nesse trabalho estão exibidas em negrito nos filogramas.

### Análise do marcador UPA

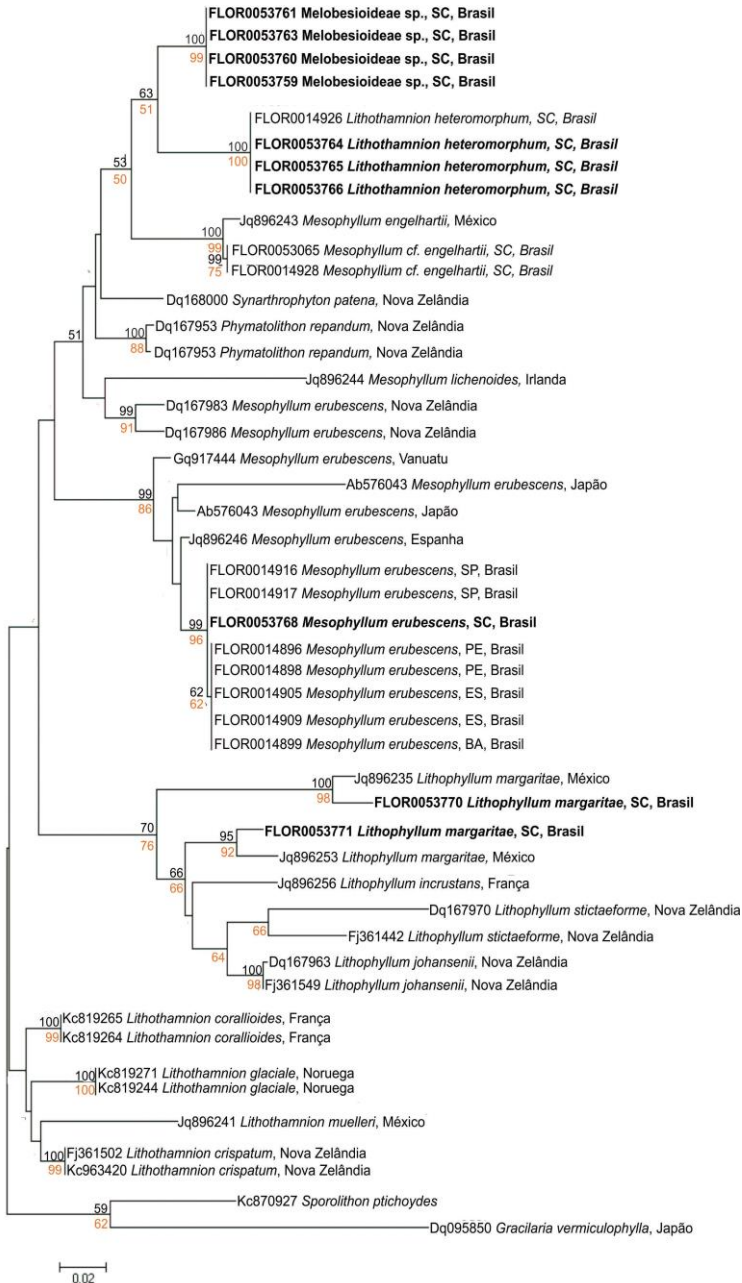
Na matriz de UPA foram analisadas 37 sequências e 346 posições, sendo 13 sequências geradas neste trabalho para formar uma árvore de distância (NJ). Uma espécie de *Gracilaria* e outra de *Sporolithon* foram utilizadas como grupos externos. A figura 31 mostra a árvore consenso de distância (NJ), com valores de *bootstrap* representados nos ramos.



**Figura 31.** Filograma de distância de *Neighbor-Joining* (NJ) para as sequências do marcador UPA. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 50 foram plotados. As sequências disponíveis na *Genbank* e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso e localidade. Foram utilizadas as sequências de *Gracilaria vermiculophylla* e *Sporolithon ptychoides* como grupos externos. A escala presente no canto inferior esquerdo representa o número de substituições.

### Análise do marcador *psbA*

A matriz do marcador *psbA* possui 47 sequências, sendo 10 dessas geradas no presente estudo, e 445 posições analisadas para formar uma árvore de distância (NJ) e uma de máxima verossimilhança (MV). Uma espécie de *Gracilaria* e uma de *Sporolithon* foram utilizadas como grupos externos. A figura 32 mostra a árvore consenso de máxima verossimilhança (MV), com valores de *bootstrap* para NJ (número acima, em preto) e MV (número abaixo, em laranja) representados nos ramos.

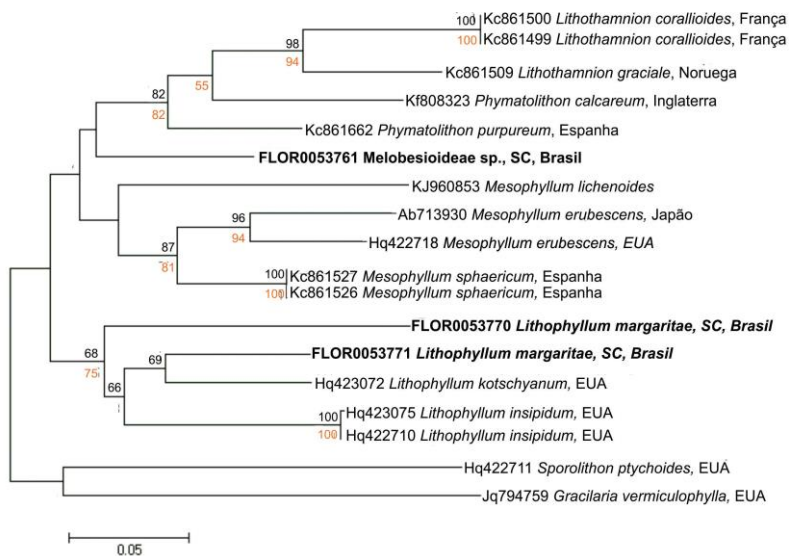




**Figura 32.** Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador *psbA*. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 50 foram plotados. Os valores acima dos ramos em preto são referentes à análise de *Neighbor-Joining* (NJ) e abaixo em laranja referentes à MV. Foram utilizadas as sequências de *Gracilaria vermiculophylla* e *Sporolithon ptychoides* como grupos externos. A escala presente no canto inferior esquerdo representa o número de substituições.

### Análise do marcador *cox1*

A matriz do marcador *cox1* possui 18 sequências, sendo três dessas geradas no presente estudo, e 568 posições analisadas para formar uma árvore de distância (NJ) e uma de máxima verossimilhança (MV). Uma espécie de *Gracilaria* e uma de *Sporolithon* foram utilizadas como grupos externos. A figura 33 mostra a árvore consenso de máxima verossimilhança (MV), com valores de *bootstrap* para NJ (número acima, em preto) e MV (número abaixo, em laranja) representados nos ramos.



**Figura 33.** Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador *cox1*. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 50 foram plotados. Os valores acima dos ramos

em preto são referentes à análise de *Neighbor-Joining* (NJ) e abaixo em laranja referentes à MV. Foram utilizadas as sequências de *Gracilaria vermiculophylla* e *Sporolithon ptychoides* como grupos externos. A escala presente no canto inferior esquerdo representa o número de substituições.

## 5. Discussão

### HAPALIDIACEAE

Dentro das algas calcárias não articuladas, os membros da família Hapalidiaceae tem como características básicas tetrasporângios zonados em conceptáculos multiporados e presença de plugues apicais, enquanto a família Corallinaceae apresenta tetrasporângios zonados em conceptáculos uniporados e não apresentam plugues apicais (Harvey et al. 2003).

De acordo com Woelkerling e Harvey (1993), todos os gêneros da subfamília Melobesioideae são formados por indivíduos não geniculados, com conceptáculos multiporados, filamentos adjacentes ligados por fusão celular e sem conexões celulares secundárias. O gênero *Mesophyllum*, por sua vez, é delimitado pelas seguintes características: (1) talo monômero; (2) haustório ausente; (3) células epiteliais cilíndricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça; (4) células subepiteliais tão longas quanto ou mais alongadas que as subsequentes; (5) células subepiteliais dos filamentos espermatangiais formadas diretamente por células meristemáticas; (6) células subepiteliais dos filamentos espermatangiais sob células protetoras; (7) teto dos conceptáculos espermatangiais formados centripetamente pelos filamentos periféricos; (8) filamentos espermatangiais simples. São reconhecidas 64 espécies de *Mesophyllum* taxonomicamente aceitas atualmente, entre elas *Mesophyllum engelhartii* e *Mesophyllum erubescens* ocorrem no litoral brasileiro (Guiry & Guiry 2014).

Os espécimes identificados como *Mesophyllum erubescens* apresentam as características supracitadas, com exceção daquelas relativas aos conceptáculos masculinos, devido à ausência dos mesmos nos indivíduos estudados. Dessa forma, levou-se em conta os aspectos dos filamentos que delimitam o canal do poro, uma vez que os espécimes estudados no litoral brasileiro apresentam a última célula desse filamento mais alongada em relação as anteriores (Nunes et al. 2008; Horta et al. 2011), sendo essa a característica diagnóstica utilizada

por Harvey *et al.* (2003) para diferenciar os gêneros *Mesophyllum* e *Synarthrophyton* na ausência de filamentos espermatangiais. Na tabela 2 são listadas as medidas das estruturas observadas em comparação com as de outras populações.

Ainda, o posicionamento do material da Ilha Deserta em *M. erubescens* é suportado pelas análises moleculares dos marcadores UPA e *psbA*, que formam, em ambas análises, um clado altamente suportado com outras sequências da mesma espécie que são idênticas à sequência da localidade tipo (FLOR0014896-Fernando de Noronha).

Tabela 2. Comparação entre populações distintas de *Mesophyllum erubescens* mais o *Melobesioideae* sp.1 deste estudo.

	<i>M. erubescens</i> – presente estudo	<i>M. erubescens</i> - Nunes <i>et al.</i> (2008)	<i>M.</i> <i>erubescens</i> - Horta <i>et al.</i> (2011)	<i>Melobesioideae</i> sp.1 - presente estudo
<b>CARACTERES VEGETATIVOS</b>				
protuberâncias diâmetro	2-3	2-5	1-3	3-4
protuberâncias altura	4-7	20	2-7	5,8-7,5
tricocitos(+/-)	Não	não	-	não
diâmetro (µm)	-	-	-	-
altura (µm)	-	-	-	-
células epiteliais				
diâmetro (µm)	4,7-7,5	5-8	4-9	6,1-8,2
altura (µm)	1,6-3	aprox. 5	2-4	2,6-5,7
células subepiteliais				
diâmetro (µm)	5,8-7,9	4-8	3-6	5,0-8,3
altura (µm)	9,4-11,6	7-16	8-15	9,3-11,2
conexões secundárias (+/-)	não	não	Não	não
fusões celulares (+/-)	sim	sim	Sim	sim
<b>CARACTERES REPRODUTIVOS</b>				
Conceptáculo				
diâmetro (µm)	240-325	195-310	254-251	205-369
altura (µm)	120-219	até 150	84-153	191-226
bis/tetrasporângio diâmetro (µm)	31-72	65-80	33-76	não observado
bis/tetrasporângio altura (µm)	93-140	90-110	33-118	não observado

espessura do teto do conceptáculo				
número de células	4-5	4-5	5-7	7-8
espessura ( $\mu\text{m}$ )	32-41	-	35-45	58-105
filamentos canal do poro				
número de células	4	-	3-4	não observado
células iguais as demais do teto(+/-)	não	não	não	-
células basais alongadas(+/-)	sim	sim	sim	-

Ainda dentro da subfamília Melobesioideae, o gênero *Lithothamnion* pode ser determinado pela presença de talo monômero, filamentos adjacentes ligados por fusões celulares, células epiteliais achatadas ou em forma de taça e conceptáculos tetrasporangiais multiporados com tetrasporângios zonados (Woelkerling 1988; Woelkerling 1996; Harvey *et al.* 2003).

No que diz respeito à *Lithothamnion crispatum*, Basso *et al.* (2011) definiu como características diagnósticas da espécie os poros afundados em relação a superfície do conceptáculo e rodeados por entre 5 e 7 células de roseta; ambas encontradas nos espécimes analisados. As células de roseta circundando o poro foram de grande importância para definição de *Lithothamnion indicum* por Wilks & Woelkerling (1995), que posteriormente foi unificado em *L. superpositum* por Keats *et al.* (2000), assim como ocorreu com *L. heteromorphum* (Farias *et al.* 2010). Por fim Basso *et al.* (2011) propôs a coespecificidade entre *L. superpositum* e *L. crispatum*, sendo essa a nomenclatura atualmente aceita da espécie. Na tabela 3 são listadas as medidas das estruturas observadas em comparação com as de outras populações.

Entretanto, as sequências de *psbA* geradas para o material da Ilha Deserta, SC apresentam 11,7%, ou 52 pb, de divergência em relação ao material da Nova Zelândia classificado como *L. crispatum* e ainda não há sequência de espécimes sob esta morfologia da localidade tipo de *L. crispatum* (Mar Adriático). Considerando a grande distância geográfica entre o Mar Adriático e o Atlântico Sul, bem como as diferentes condições ambientais, é possível que se tratem de espécies distintas.

Dessa maneira, considerou-se resgatar o nome *L. heteromorphum* para os espécimes estudados, uma vez que a localidade tipo referente a essa espécie encontra-se a 800 km, em São Sebastião, SP, onde foi coletado e identificado por Foslie como *Lithothamnion brasiliense* f. *heteromorfa* e elevado a nível de espécie como *Lithothamnion heteromorphum* pelo mesmo autor, sete anos depois (Farias, 2009).

Observa-se também, nas análises moleculares do marcador *psbA*, que a monofilia dos espécimes morfoanatomicamente posicionadas em *Lithothamnion* não foi sustentada evidenciando ao menos três espécies do “verdadeiro” *Lithothamnion* uma vez que agruparam-se com a espécie que tipifica o gênero, *L. muelleri*, são elas: *L. corallioides*, *L. glaciale*, *L. crispatum* (proveniente da Nova Zelândia). Levando em consideração que o material foi corretamente identificado, pelas características citadas anteriormente, e que a divergência genética interespecífica encontrada foi de 12,4%, é possível que se trate de um

novo gênero. São necessários, portanto, estudos mais aprofundados para elucidar a questão, especialmente na delimitação de características morfoanatômicas que suportem os dados moleculares

Tabela 3. Comparação entre populações distintas de *Lithothamnion*.

	<i>L.</i> <i>heteromorphum</i> - presente estudo	<i>L. crispatum</i> - Basso <i>et al.</i> (2011)	<i>L.</i> <i>heteromorphum</i> - Holótipo - Farias <i>et al.</i> (2010)	<i>L.</i> <i>superpositum</i> - Farias <i>et al.</i> (2010)
<b>Caracteres Vegetativos</b>				
protuberâncias diâmetro	3-3,5	não informado	não informado	não informado
protuberâncias altura	4-7	não informado	não informado	não informado
células epiteliais	forma de taça	forma de taça	forma de taça	forma de taça
diâmetro (µm)	7,8-11	7-14,5	7-11	6-12
altura (µm)	2-4,5	2-5,5	3-4	2-5
células subepiteliais				
diâmetro (µm)	7,3-10	7-16	10-15	7-13
altura (µm)	11,5-14,9	7-25	6-22	13-24
conexões secundárias (+/-)	não observados	não observados	não observados	não observados
fusões celulares (+/-)	Sim	sim	sim	sim
<b>Caracteres reprodutivos</b>				
Conceptáculo				
diâmetro (µm)	223-296	270-720	270-525	250-525
altura (µm)	119-174	100-315	112-162	150-230
bis/tetrasporângio diâmetro (µm)	30-65	não informado	não informado	não informado
bis/tetrasporângio altura (µm)	72-133	não informado	não informado	não informado
espessura do teto do conceptáculo				
número de células	4 -5	4-6	3-5	3-5



espessura ( $\mu\text{m}$ )	38-59	20-45	36-44	27-50
filamentos canal do poro				
número de células	4	3 -4	3-4	3-4
células de roseta ao redor do poro	Sim	Sim	sim	sim
número de células	6	5-7	não informado	não informado

---

## CORALLINACEAE

Dentro das Corallinaceae, a subfamília Lithophylloideae é definida pela presença de conexões celulares secundárias entre filamentos adjacentes. Por sua vez, os caracteres que definem o gênero *Lithophyllum* são: presença de conceptáculos tetrasporangiais uniporados, conexões secundárias entre filamentos adjacentes e talo monômero e/ou dímero. (Woelkerling & Campbell 1992, Irvine & Chamberlain 1994). Tais aspectos foram observados nos espécimes estudados assim como a presença de columela central calcificada, um aspecto que distingue *Lithophyllum margaritae* das outras espécies do gênero (Riosmena-Rodriguez *et al.* 1999).

*Lithophyllum margaritae* se assemelha com *Lithophyllum incrustans*, pois ambas apresentam columela central calcificada (Chamberlain *et al.* 1991), entretanto, *L. margaritae* apresenta organização monômera do talo, enquanto *L. incrustans* apresenta organização dímera. Além disso, *L. margaritae* apresenta apenas 4 células no teto do conceptáculo, *L. incrustans* por sua vez apresenta 10 células (Athanasiadis 1999). Na tabela 4 são listadas as medidas das estruturas observadas em comparação com a de outra população.

Ambas as sequências geradas nesse trabalho classificadas como *L. margaritae* agruparam com sequências para a mesma espécie adquiridas no *Genbank*, corroborando a identificação.

Tabela 4. Comparação entre *Lithophyllum margaritae* do presente estudo e México.

	<i>Lithophyllum margaritae</i> - presente estudo	<i>Lithophyllum margaritae</i> - Riosmena-Rodriguez <i>et al.</i> (1999)
<b>Caracteres Vegetativos</b>		
células epiteliais		
diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	8,5-10	6-10
altura ( $\mu\text{m}$ )	3,1-4	2-4
células subepiteliais		
diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	6,8-9,7	5-10
altura ( $\mu\text{m}$ )	7,5-12,8	6-18
conexões secundárias (+/-)	sim	Sim
fusões celulares (+/-)	não	Não
<b>Caracteres reprodutivos</b>		
Conceptáculo		
diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	185-230	150-450
altura ( $\mu\text{m}$ )	62-88	50-150
bis/tetrasporângio diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	20-28	não informado
bis/tetrasporângio altura ( $\mu\text{m}$ )	42-54	não informado
espessura do teto do conceptáculo		
número de células	3-4	3-4
espessura ( $\mu\text{m}$ )	26-35	não informado

Os indivíduos identificados como *Melobesioideae* sp. apresentaram todas as características necessárias para a classificação nessa subfamília, no entanto, não foi possível observar as características necessárias para a classificação a nível de gênero que os definiriam entre *Mesophyllum* e *Synarthrophyton*.

Em relação aos marcadores utilizados, *cox1* se mostrou muito difícil de amplificar, sendo obtidas apenas três sequências de quinze possíveis. Em contrapartida, UPA foi amplificado e sequenciado com sucesso para catorze amostras e agrupou com eficiência os gênero

analisados, *psbA* foi amplificado e sequenciado para treze amostras e foi de grande ajuda na definição das espécies. Tanto para UPA quanto *cox1*, são escassas as sequências disponíveis no *Genbank*, o mesmo não ocorre com o terceiro marcador utilizado.

## DIVERGÊNCIA GENÉTICA

A comparação da variação genética entre as sequências de UPA, *psbA* e *cox1* está sintetizada nas tabelas 5 e 6. As variações intraespecíficas levam em conta as sequências da mesma espécie e as interespecíficas, sequências de todas as espécies dentro do gênero em questão. Os espaços que estão em branco se referem aos casos onde, ou não haviam sequências geradas neste trabalho para aquele marcador, ou não havia sequências no *Genbank* para que a análise fosse possível.

Tabela 5. Divergência genética intraespecífica para os marcadores utilizados.

	<b>VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA</b>								
	UPA			<i>PsbA</i>			<i>cox1</i>		
	seqs	%	pb	seqs	%	pb	seqs	%	Pb
<i>Mesophyllum erubescens</i>	9	0-0,3%	0-1pb	14	0-8,8%	0-39pb	-	-	-
<i>Lithothamnion heteromorphum</i>	6	0%	0pb	6	0-11,7%	0-52pb	-	-	-
<i>Lithophyllum margaritae</i>	2	7,3%	25pb	4	3,6-11,5%	16-51pb	2	13,1%	74pb

Tabela 6. Divergência genética interespecífica para os marcadores utilizados.

	<b>VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA</b>								
	UPA			<i>psbA</i>			<i>cox1</i>		
	seqs	%	pb	seqs	%	pb	seqs	%	Pb
<i>Mesophyllum erubescens</i>	26	7,3-7,9%	25-27pb	18	0-12,4%	0-55pb	-	-	-
<i>Lithothamnion heteromorphum</i>	-	-	-	10	0-12,4%	0-55pb	-	-	-
<i>Lithophyllum margaritae</i>	4	7,3-11,6%	25-40pb	8	4,1-14,9%	18-66pb	4	10,6-15%	60-85pb

## 6. Conclusão

As análises morfológicas e moleculares dos espécimes coletados na Ilha Deserta permitiram a identificação de três espécies: *Mesophyllum erubescens*, *Lithothamnion heteromorphum* e *Lithophyllum margaritae*. Os indivíduos classificados em Melobesioideae sp. possivelmente se tratam de uma espécie nova para a região e até mesmo para a ciência.

Tanto as imagens observadas em microscopia eletrônica de varredura quanto as observadas em microscopia de luz, juntamente com os resultados moleculares obtidos, foram fundamentais nas identificações e apresentaram grande sinergia, corroborando a importância da utilização das técnicas moleculares conjuntamente com as análises morfoanatômicas, especialmente em grupos de difícil identificação, como as algas calcárias não articuladas.

Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho são os primeiros que registram a ocorrência de um novo banco de rodolitos para o sul do Brasil, e limite de distribuição no Atlântico Sul Ocidental, alertando sobre a importância em suprir a demanda de conhecimento em uma era na qual o homem destrói e altera o ambiente em uma velocidade muito maior do que consegue estudá-lo.

## Referências

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhanh, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Athanasiadis, A. 1999. The taxonomic status of *Lithophyllum stictaeforme* (Rhodophyta, Corallinales) and its generic position in light of phylogenetic considerations. *Nordic Journal of Botany* 19:735-745.
- Bahia, R.G.; Amado-Filho, G.M.; Maneveldt, G.W.; Adey, W.H.; Johnson, G.; Marins, B.V. & Longo, L.L. 2013. *Sporolithon tenue* sp. nov. (Sporolithales, Corallinophycidae, Rhodophyta): A new rhodolith-forming species from the tropical southwestern Atlantic. *Phycological Research* 62: 44–54
- Barbera, C.; Bordehore, C.; Borg, J.A.; Glémarec, M.; Grall, J.; Hall-Spencer, J.M.; de la Huz, Ch.; Lanfranco, E.; Lastra, M.; Moore, P.G.; Mora, J.; Pita, M.E.; Ramos-Esplá, A.A.; Rizzo, M.; Sánchez-Mata, A.; Seva, A.; Schembri, P.J. & Valle, C. 2003. Conservation and management of northeast Atlantic and Mediterranean maerl beds. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13 (Suppl.) 65–76.
- Basso, D.; Rodondi, G. & Bressan, G. 2011. A re-description of *Lithothamnion crispatum* and the status of *Lithothamnion superpositum* (Rhodophyta, Corallinales). *Phycologia* 50: 144-155.
- Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. 2008. Utility of psbA and nSSU for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958-973.
- Chamberlain, Y. M. 1991 . Historical and taxonomic studies in the genus *Titanoderma* (Rhodophyta, Corallinales) in the British Isles. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, Botany Series 21:1 - 80.
- Farias, J.N.; Riosmena-Rodríguez R.; Bouzon Z.; Oliveira E.C. & Horta P.A. 2010. *Lithothamnion superpositum* (Corallinales; Rhodophyta):

First description for the Western Atlantic or rediscovery of a species? *Phycological Research* 58: 210–216.

Farias, J.N. 2009. *Aspectos taxonômicos de Lithothamnion superpositum e Mesophyllum engelhartii (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Farr, T.; Broom, J.; Hart, D.; Neill, K. & Nelson, W. 2009. Common coralline algae of northern of New Zealand. *An identification guide. NIWA Information Ser. No. 70*. Wellington, New Zealand p. 125.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso em 26 de novembro 2014.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Harvey A.S.; Woelkerling W.J. & Millar A.J.K. 2003. An account of Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 16: 647-698.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321.

Horta, P. A. 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro - uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15(1): 7-44.

Horta, P. A. ; Scherner, F.; Bouzoun, Z. L.; Riosmena-Rodriguez, R. & Oliveira, E. C. 2011. Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lenoime (Corallinales, Rhodophyta) of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 125-134.

Horta, P.A. 2000. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

IBAMA, I. B. D. M. A. E. D. R. N. R. 2004. Plano de Manejo Reserva Biológica Marinha do Arvoredo. Diretoria de Ecossistemas – DIREC.



- Irvine, L. M.; Chamberlain, Y. M. 1994. Seaweeds of the British Isles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 74: 986-986.
- Joly, A. B. 1967. *Gêneros de algas marinhas da Costa Atlântica Latino-Americana*. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Keats D.W.; Maneveldt, G. & Chamberlain, Y.M. 2000. *Lithothamnion superpositum* Foslie: a common crustose red alga (Corallinaceae) in South Africa. *Cryptogamie Algologie* 21: 381-400.
- Le Gall, L.; Payri, C.; Bittner, L. & Saunders, G.W. 2009. Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 302-305.
- Littler, M.M.; Littler, D.S.; Blair, S.M. & Norris, J.N. 1986. Deep-water plant communities from an uncharted seamount off San Salvador Island, Bahamas: distribution, abundance, and primary productivity. *Deep-sea Research* 33: 881-892.
- Martin, S. & Gattuso, J.P. 2009. Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Glob. Change Biol.* 15: 2089–2100.
- Nunes, J.M.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Donangelo, A.; Farias, J.N. & Horta, P.A. 2008. Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59: 75-86.
- Oliveira, E.C. 1996. Is there a relation among the global warming, the missing carbon and the calcareous algae? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 68: 18-21.
- Peña, V.; Adey, W.H.; Riosmena-Rodriguez, R.; Jung, M.Y.; Afonso-Carrillo, J.; Choi, H.G. & Bárbara, I. 2011. *Mesophyllum sphaericum* sp. nov. (Corallinales, Rhodophyta): a new maërl-forming species from the Northeast Atlantic. *Journal of Phycology* 47: 911-927.
- Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome – implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84: 1434-43.

Riosmena-Rodriguez, R.; Woelkerling, W. J.; Foster, M. S. 1999. Taxonomic reassessment of rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales, Rhodophyta) in the Gulf of California, Mexico. *Phycologia* 38:401–417.

Riul, P.; Lacouth, P.; Pagliosa, P. R.; Christoffersen, M. L.; & Horta, P. A. 2009. Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90(4), 315–320.

Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 360: 1879-1888.

Seo, K.S.; Cho, T.O.; Park, J.S.; Yang, E.C.; Yoon, H.S.; Boo, S.M. 2003. Morphology, basiphyte range, and plastid DNA phylogeny of *Campylaephora borealis* stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Taxon* 52: 9–19.

Sherwood, A.; Kurihara, A.; Conklin, K.Y.; Sauvage, T. & Presting, G.G. 2010. The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings. *BMC Plant Biology* 10: 258.

Sissini, M.N.; Oliveira M.C.; Gabrielson, P.W.; Robinson, N.M.; Okolodkov, Y.B.; Riosmena-Rodríguez, R.; Horta, P.A. 2014. *Mesophyllum erubescens* (Corallinales, Rhodophyta) - so many species in one epithet. *Phytotaxa*, *In Press*.

Steller, D.L.; Riosmena-Rodríguez R.; Foster M.S. & Roberts C. 2003. Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: The importance of rhodolith structure and consequences of anthropogenic disturbances. *Aquatic Conservation Marine Freshwater. Ecosystems* 13: S5–S20.

Vidal, R.; Meneses, I. & Smith, M. 2003. Molecular genetic identification of crustose representatives of the order Corallinales (Rhodophyta) in Chile. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 404-419.

Wilks, K.M. e Woelkerling, W.J. 1995. An account of Southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 8: 549-583.

- Woelkerling, W.J. 1988. The Coralline red algae: an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. *Oxford University Press* 268.
- Woelkerling, W.J. 1996. The order Corallinales. *The Marine Benthic Flora of Southern Australia, Part IIIB*. (Ed. by H.B.S. Womersley) 146-323.
- Woelkerling, W.J.; Campbell, S. J. 1992. An account of southern Australian species of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bulletin of British Museum (Natural History): Botany Series* 22:1–107.
- Woelkerling, W.J. & Harvey, A. 1993. An account of southern Australian species of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 571-637.
- Yang, E.C. & Boo, S.M. 2004. Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on plastid protein-coding *psaA*, *psbA*, and *rbcl* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 680-688.
- Yoon, H.S; Hackett, J.D. & Bhattacharya, D. 2002. A single origin of the peridinin and fucoxanthin containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *PNAS* 99: 11724-11729.