

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Pós-Graduação em Biologia Vegetal

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, REPRODUTIVOS E
MOLECULARES DO GÊNERO *Lithophyllum* (LITHOPHYLLOIDEAE,
CORALLINALES, RHODOPHYTA) PARA O SUL DO BRASIL



Talita Vieira Pinto

Florianópolis
Abril 2011

Talita Vieira Pinto

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, REPRODUTIVOS E MOLECULARES DO
GÊNERO *Lithophyllum* (LITHOPHYLLOIDEAE, CORALLINALES,
RHODOPHYTA) DO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Departamento
de Botânica da Universidade Federal de
Santa Catarina, para a obtenção de Título
de Mestre em Biologia Vegetal
Orientador: Dr. Paulo Antunes Horta Junior
Co-Orientadora: Dra. Mariana C. de Oliveira

Florianópolis

Abril 2011

Talita Vieira Pinto

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, REPRODUTIVOS E MOLECULARES DO
GÊNERO *Lithophyllum* (LITHOPHYLLOIDEAE, CORALLINALES,
RHODOPHYTA) DO SUL DO BRASIL

Banca examinadora

Dr. Paulo Antunes Horta Junior
Orientador – UFSC

Dr. José Marcos de Castro Nunes
Examinador Externo – UFBA

Dra. Valéria Cassano
Examinador Externo – USP

Dra. Zenilda Laurita Bouzon
Examinador Interno – UFSC

Dra. Maria Alice Neves
Suplente – UFSC

**Pelo amor e apoio incondicional,
dedico à minha família
e ao Ivan.**

Agradecimentos

Agradeço sobretudo a Deus, pelo Dom da vida.

Ao meu orientador, Professor Paulo Horta, a quem devo estes dois anos de aprendizado. Agradeço imensamente pela orientação, oportunidade, paciência e por acreditar em mim tão gratuitamente.

À minha co-orientadora, Professora Mariana Cabral de Oliveira, por todo o apoio, paciência e atenção que recebi durante minha empreitada biomolecular na USP, pela orientação e disposição em me ajudar mesmo à distância e pelas valiosas contribuições com este trabalho.

À minha família, pelo imenso amor, incentivo e sacrifício. Sei o quanto batalham por mim, pela minha felicidade e para que eu tenha todas as oportunidades que não tiveram. Mãe, Pai, Irmã, Irmão, Cyro, meus amores, por tudo e por TANTO, eu os agradeço!

À minha irmã, por não medir esforços para estar ‘perto’ todos os dias, me apoiando e me dando força para continuar.

Ao Ivan Martins, meu amor, amigo, companheiro, fonte segura e inesgotável de compreensão. Agradeço por me apoiar tanto quanto eu precise e por não deixar que nenhum dia passe sem um sorriso (ou uma gargalhada).

Agradeço também ao meu sogro e sogra, pessoas maravilhosas, que sempre têm uma palavra de conforto e carinho.

Aos amigos que permanecem em minha vida por todos estes anos, por assim fazerem. Em especial agradeço à Karen, à Ana Brígida, à Ana Maria e à Aldi. Às duas últimas, agradeço (e muito) por me acolherem com tanta generosidade em São Paulo por dois longos meses de trabalhos na USP.

Aos queridos Marina Sissini, Carolina Franco, Natália Guimarães, Bia Torrano e Fábio Nauer, agradeço por toda disposição em ajudar sempre e em qualquer que fosse a situação. Nada do que apresento aqui seria possível sem o empenho e as valiosas colaborações de vocês. Muito obrigada!

Aos queridos colegas de laboratório, de cá (LAFIC e LAMAR-UFSC) e de lá (LAM-USP), por contribuírem direta ou indiretamente para que esta dissertação virasse uma realidade. Agradeço em especial à Douglas Burgos, Manuela Batista, Ticiane Rover, Eduardo Bastos, Emmanuelle Costa, Amanda Medeiros, Cecília Pascelli, João Carraro, Caroline Faveri, Cintia Martins, Cintia Lhullier, Noele Arantes, Paola Sanches, Julyana Farias, Débora Cabral, Alejandro Donnangelo e Fernando Scherner.

Aos colegas de mestrado, turma de 2009, pelas conversas de corredor, incentivos e discussões produtivas. Em especial agradeço à Carmen Zitta e Carolina Delgado pela amizade e companheirismo.

À Professora Ana Claudia Rodrigues, pelas ajudas com o micrótomo, afiador de navalhas e corantes, e claro pela acolhida sempre gentil na sua casa. Estendo o agradecimento ao João, Iara e Isabel, por dividirem o pai com os vários filhos da ciência que ele vem ‘acumulando’.

À Professora Roselane Laudares, pelas conversas sempre encorajadoras e por permitir o desenvolvimento das atividades REUNI nas disciplinas por ela ministradas.

Aos técnicos do LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC), pelo auxílio com o microscópio eletrônico de varredura e à Prof^a Zenilda Bouzon, por coordenar esse laboratório com tanta competência, trazendo avanços para a pesquisa nesta Universidade.

Aos Professores do LAM, em especial à Estela Plastino e Fungyi Cho, coordenadoras do Laboratório de Algas Marinhas “Édson José de Paula” por me receberem com gentileza e permitirem o desenvolvimento de parte do meu trabalho nas dependências deste laboratório.

Ao Professor Rafael Trevisan, pela ajuda com o latim.

À Vera, secretária do PPG Biologia Vegetal, por toda a presteza e eficiência em auxiliar a todos os discentes e docentes deste programa.

À Juliane Bernardi e Professora Franciane Pellizari, pelas amostras do Arquipélago de Currais.

À CAPES-REUNI, pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1. Revisão Histórica das metodologias aplicadas às algas calcárias.....	6
1.2. Estudos do gênero <i>Lithophyllum</i> no Brasil e no mundo.....	9
1.3. Biologia Molecular.....	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1. Área de estudo.....	15
3.2. Coleta e Preservação do Material.....	18
3.3. Estudo Morfológico.....	18
3.4. Estudo Molecular.....	20
4. Resultados.....	26
4.1. Estudo Morfológico.....	26
4.2. Estudo Molecular.....	39
5. Discussão	47
5.1. Aspectos relacionados ao gênero <i>Lithophyllum</i>	47
5.2. <i>Lithophyllum margaritae</i>	49
5.3. <i>Lithophyllum</i> sp.1.....	53
5.4. Divergência entre as sequências dos marcadores estudados.....	58
5.5. Análise crítica das metodologias utilizadas.....	59
6. Conclusões.....	62
7. Referências.....	64
Anexos.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Características para delimitação das ordens Corallinales e Sporolithales.	3
Figura 2. Mapa da região Sul do Brasil detalhando as áreas de estudo.	17
Figuras 3-5. Aspecto geral dos diferentes tipos morfológicos do talo de <i>L. margaritae</i> .	27
Figura 6. Células epiteliais – vista superficial.	27
Figura 7. Fratura transversal da região superficial do talo, mostrando as células epiteliais de contorno poligonal com paredes distais achatadas ou côncavas e células subepiteliais maiores em relação às epiteliais.	27
Figura 8. Detalhe de uma célula epitelial.	27
Figura 9. Fratura longitudinal evidenciando talo com organização monômera, destacando-se a presença de conceptáculo uniporado.	27
Figura 10. Fratura longitudinal na margem de crescimento do talo, evidenciando organização dímera.	27
Figura 11. Vista superficial do conceptáculo uniporado.	30
Figura 12. Fratura transversal no talo evidenciando um conceptáculo no mesmo plano do talo e um conceptáculo com canal do poro sutilmente afundado.	30
Figura 13. Conceptáculo tetrasporangial com columela central calcificada.	30
Figura 14. Conceptáculo com tetrasporângios zonados.	30
Figura 15-17. Aspecto geral de diferentes tipos morfológicos de <i>Lithophyllum</i> sp.1.	34
Figura 18. Fratura longitudinal evidenciando margem de crescimento monômera.	34
Figura 19. Fratura transversal mostrando as células epiteliais achatadas.	34
Figura 20. Secção transversal mostrando células epiteliais achatadas.	34
Figura 21. Fratura transversal mostrando as células do peritalo.	34
Figura 22. Detalhe das conexões intercelulares primárias com células do filamento e conexões secundárias com filamentos adjacentes.	34
Figura 23. Vista superficial dos conceptáculos uniporados, no mesmo plano do talo à direita e pouco protuberante em relação ao plano do talo à esquerda.	37
Figura 24. Câmara do conceptáculo tetrasporangial uniporado; canal do poro.	37
Figura 25. Detalhe do canal do poro, mostrando células delimitando o canal, mas não o ocluindo.	37
Figura 26. Câmara do conceptáculo tetrasporangial com tetrasporângios zonados e columela central não-calcificada.	37
Figura 27. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelo grupo externo <i>Gracilaria dotyi</i> construído para as seqüências do UPA.	40
Figura 28. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelos grupos externos <i>Gracilaria tikvahiae</i> e <i>Neodilsea borealis</i> , construído para o <i>cox1</i> .	42

Figura 29. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelo grupo externo <i>Neodilsea borealis</i> construído para o <i>cox1</i> .	44
Figura 30. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelos grupos externos <i>Mesophyllum erubescens</i> e <i>Pneophyllum cf. conicum</i> , construído para o SSU rDNA.	46
Figura 31. Superfície do talo de <i>L. depressum</i> (BR 454263), evidenciando conceptáculos elevados.	56
Fig. 32. Superfície do talo de <i>L. depressum</i> (BR 454263), evidenciando conceptáculos em depressão.	56
Fig. 33. Superfície do talo de <i>Lithophyllum</i> sp.1, evidenciando conceptáculos em depressão.	56
Fig. 34. Superfície do talo de <i>L. margaritae</i> , evidenciando conceptáculo em depressão.	56
Fig. 35. Secção transversal de conceptáculo de <i>L. depressum</i> (BR 454263), evidenciando conceptáculo elevado em relação a superfície do talo.	56
Fig. 36. Fratura transversal de conceptáculo de <i>Lithophyllum</i> sp.1, evidenciando conceptáculo elevado em depressão em relação a superfície do talo.	56
Fig. 37. Fratura transversal de conceptáculo de <i>L. margaritae</i> , evidenciando conceptáculo elevado em depressão em relação a superfície do talo.	56

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1: Classificação da ordem Corallinales	2
Tabela 2. Novo esquema taxonômico das algas calcárias	3
Tabela 3. “Primers” utilizados para PCR e sequenciamento	22
Tabela 4. Resumo das características diagnósticas de <i>Lithophyllum margaritae</i> encontradas no Brasil e na população do Golfo da Califórnia.	52
Tabela 5. Tabela comparativa de <i>Lithophyllum</i> sp.1 com populações de <i>Lithophyllum stictaeforme</i> .	57

Resumo

As algas calcárias do Filo Rhodophyta, apresentam como principal característica a impregnação de carbonato nas paredes celulares, e por este motivo são necessárias técnicas diferenciadas para estudos anatômicos destas algas. Apesar do aprimoramento recente na caracterização do referido grupo, a ausência de um padrão metodológico que se observa nos estudos realizados para este grupo, demonstra que ainda existe demanda por metodologias alternativas que subsidiem a taxonomia do grupo. O uso de ferramentas moleculares é uma alternativa informativa dentro deste contexto, e vem sendo cada vez mais utilizada, aliada a características morfoanatômicas, para determinar a posição sistemática de gêneros, espécies e subespécies. Este trabalho teve por objetivo principal descrever os representantes do gênero *Lithophyllum* no meso e infralitoral do Sul do Brasil, com base em dados morfoanatômicos aliados a dados moleculares. As análises foram realizadas a partir de espécimes coletados em 5 pontos do litoral do Sul do Brasil. O estudo morfoanatômico foi realizado em microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Os estudos moleculares se basearam em sequências de DNA dos marcadores UPA, *cox1* e SSU rDNA, sendo que para cada marcador foram geradas análises de Distância e Máxima Parcimônia, e para o último foram realizadas além destas, a análise bayesiana. Através de estudo morfoanatômico comparativo, foram identificadas duas entidades taxonômicas, *Lithophyllum margaritae* (Hariot) Heydrich, e *Lithophyllum* sp.1, e os dados moleculares corroboraram com a identificação dos referidos táxons. Os marcadores moleculares UPA e *cox1* se mostraram eficientes na separação de entidades taxonômicas de um mesmo gênero, demonstrando serem estes marcadores adequados para utilização como “DNA barcoding”. Os dados obtidos neste estudo representam um avanço na taxonomia das algas calcárias não articuladas no Brasil, que pela primeira vez baseou-se em características moleculares aliadas a características morfoanatômicas.

Abstract

The Coralline algae from the phylum Rhodophyta, has as main characteristic the carbonate impregnation of cell walls, and for this reason, special techniques are required for their anatomical studies. Despite the recent improvement in the characterization of the group, the absence of a methodological standard demonstrates that still there is demand for methodologies for to support the taxonomy of this group. The use of molecular tools is an informative alternative within this context, and it is being increasingly used, combined with morphology and anatomic data, to determine the systematic position of genera, species and subspecies. This study aimed to describe the genus *Lithophyllum* of the intertidal and subtidal habitats in southern Brazil, based on morphological and anatomical data combined with molecular data. The analysis were performed from specimens collected in five points along of southern Brazilian coast. The morphological and anatomical study was performed with optical microscope and scanning electron microscope. Molecular studies were based on DNA sequences of the molecular markers UPA, *cox1* and SSU rDNA. Neighbor-joining and maximum parsimony analysis were performed for all three markers, and for the last, were held in addition the bayesian analysis. Through comparative morphoanatomy study, we identified two species, *Lithophyllum margaritae* (Hariot) Heydrich, and *Lithophyllum* sp. 1, and the molecular data corroborated with these results. The UPA and *cox1* markers were efficient in separating taxonomic entities of the same genus, demonstrating that these markers are suitable for its use as "DNA barcoding". The data obtained in this study represent a breakthrough in the taxonomy of non-geniculate coralline algae in Brazil, which for the first time was based on molecular characteristics combined with morphological anatomic.

Introdução

As algas do filo Rhodophyta, ou algas vermelhas, são organismos eucariontes fotossintetizantes, que não apresentam flagelos em nenhuma fase de vida, nem mesmo nos gametas. Possuem como pigmentos clorofila a, ficobiliproteínas, e carotenóides e o seu principal material de reserva dessas algas é o amido das florídeas.

Estes organismos têm importante papel na produção primária, como fonte de alimento, produção de oxigênio e ciclagem de nutrientes. Ocorrem principalmente no ambiente marinho e estão amplamente distribuídas das regiões tropicais até as regiões polares (Lee 2008).

Esta divisão forma uma das principais linhagens monofiléticas dentro dos eucariotos, e segundo Yoon et al. (2006), atualmente está dividida em seis classes Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae, e Stylonematophyceae.

Na classe Florideophyceae, estão posicionadas os membros da ordem Corallinales Silva & Johansen, ou algas calcárias. Sua distribuição é conhecida em todos os oceanos, dos trópicos aos pólos (Littler et al. 1991; Foster 2001; Konar et al. 2006), como um constituinte conspícuo, ou mesmo dominante, particularmente em locais de alta herbivoria (Steneck & Paine 1986; Woelkerling 1988). Estas algas são comumente encontradas sob o dossel de macroalgas desde a zona das entre-marés até grandes profundidades (Littler et al. 1985; Littler et al. 1991; Foster 2001; Konar et al. 2006). Em áreas tropicais, por exemplo, fazem parte da construção dos recifes de corais, protegendo esse ecossistema contra a ação erosiva das ondas e possibilitando a manutenção e crescimento do mesmo (Steneck & Testa 1997; Piller & Rasser 1996).

As algas calcárias ou coralíneas incluem dois grupos morfológicos: as articuladas ou geniculadas, representadas por formas que possuem porções não calcificadas ou genículos, intercaladas por segmentos calcificados ou intergenículos, e as formas não-geniculadas, que não possuem genículos, sendo os talos completamente calcificados.

O trabalho de Harvey & Woelkerling (2007) propõem que as algas calcárias sejam agrupadas em uma só ordem (Corallinales) representada por três famílias - Hapalidiaceae, Corallinaceae e Sporolithaceae, as quais seriam subdivididas em sete subfamílias (Tabela 1). Este esquema taxonômico baseou-se em uma combinação de dados morfológicos, anatômicos, bioquímicos, ultraestruturais e moleculares (Bailey & Chapman 1996, 1998; Bailey 1999, Harvey et al. 2002, 2003).

Tabela 1: Classificação da ordem Corallinales (Harvey & Woelkerling 2007).

Família e subfamília	Gênero
Corallinaceae	
Metagoniolithoideae	<i>Metagoniolithon</i>
Corallinoideae	<i>Alatocladia, Arthrocardia, Bossiella Calliarthron, Cheilosporum, Chiharaea, Corallina, Haliptilon, Jania, Marginosporum, Masakiella, Serraticardia, Yamadaea</i>
Mastophoroideae	<i>Hydrolithon, Lesueuria, Lithoporella, Mastophora, Metamastophora, Neogoniolithon, Pneophyllum, Spongites</i>
Lithophylloideae	<i>Amphiroa, Ezo, Lithophyllum/Titanoderma, Lithothrix, Paulsilvella, Tenarea</i>
Hapalidiaceae	
Austrolithoideae	<i>Austrolithon, Boreolithon</i>
Choreonematoideae	<i>Choreonema</i>
Melobesioideae	<i>Clathromorphum, Exilicrusta, Kvaleya, Lithothamnion, Mastophoropsis, Melobesia, Mesophyllum, Phymatolithon, Synarthrophyton</i>
Sporolithaceae	<i>Heydrichia, Sporolithon</i>

Porém recentemente, Le Gall et al. (2010), com base em um estudo filogenético, propôs uma mudança no status taxonômico da família Sporolithaceae, elevando-a à uma nova ordem para as algas calcárias, a ordem Sporolithales Le Gall, Payri, Bittner & Saunders, que compreende uma única família, Sporolithaceae, com dois gêneros – *Sporolithon* e *Heydrichia*. Para sustentar a proposta de separar a nova ordem Sporolithales da ordem Corallinales, os referidos autores utilizaram como evidência morfo-anatômica o padrão de divisão dos esporos (que em Sporolithales é cruciada e em Corallinales, zonada) e na ausência (Sporolithales) ou presença (Corallinales) de conceptáculos (fig.1).

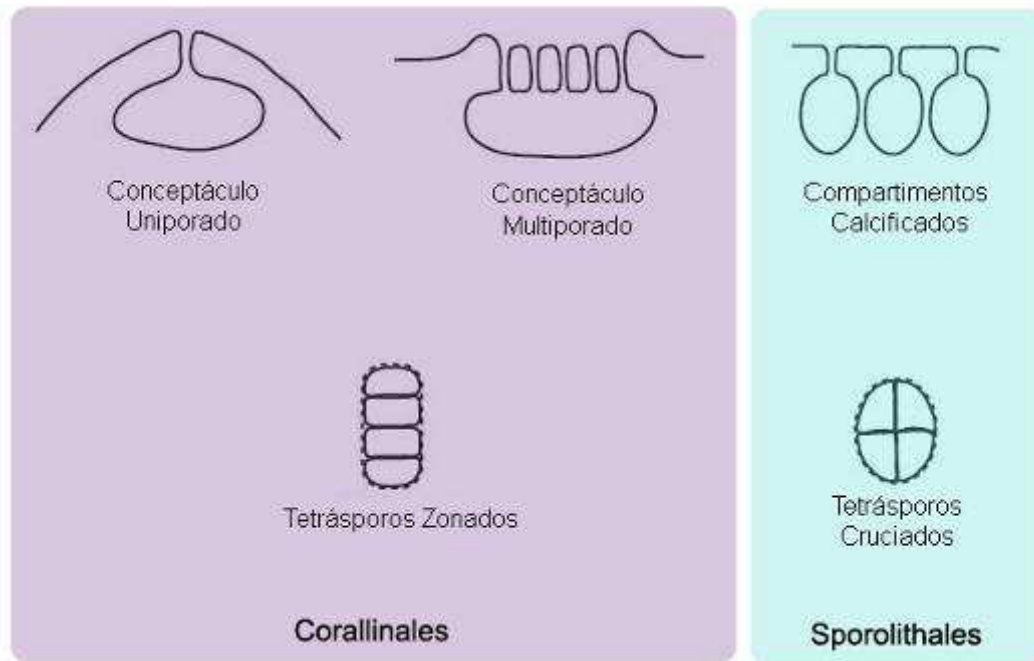


Figura 1. Características para delimitação das ordens Corallinales e Sporolithales, adaptado de Farr et al. 2009.

Após esta mudança, as algas calcárias compreendem então em duas ordens, e o novo esquema taxonômico está sintetizado na Tabela 2.

Com relação à classificação das famílias, subfamílias e gêneros nada foi alterado.

Tabela 2. Novo esquema taxonômico das algas calcárias, segundo a proposta de Le Gall et al. 2010.

Ordem	Famílias e Subfamílias
Corallinales	Corallinaceae - Metagoniolithoideae, Corallinoideae, Mastophoroideae e Lithophylloideae. Hapalidiaceae - Austrolithoideae, Choreonematoideae e Melobesioideae.
Sporolithales	Sporolithaceae

As algas calcárias apresentam grande importância ecológica, pois são consideradas organismos-chave em vários ambientes (Foster et al. 2007) e um atributo interessante é a formação de rodolitos (algas vermelhas de vida livre que crescem independentes do substrato) formando bancos naturais, conhecidos por *maërl* ou bancos de rodolitos (ou nódulos calcários). Esses bancos formam um ecossistema único que abriga grande diversidade de outras algas, invertebrados e vertebrados associados direta ou indiretamente a eles (Steller et al. 2003; Littler & Littler, 2008; Riul et al. 2009). Estes bancos estão presentes em todos os mares, especialmente na plataforma continental brasileira. Além de serem verdadeiros oásis de biodiversidade em meio a bancos arenosos da plataforma continental de diferentes mares e oceanos (Riul et al. 2009), esses bancos são também importantes macro-ambientalmente, pois estão potencialmente envolvidos com os processos globais de controle climático do planeta por se tratarem uma das maiores reservas de carbonato do mundo (Oliveira 1996, 1997).

A principal característica dessas algas é a impregnação de carbonato na forma de calcita nas paredes celulares (Bailey & Chapman, 1998), o que não é observado nos demais grupos de algas vermelhas. Os carbonatos correspondem a cerca de 90% do peso seco dessas algas o que lhes confere características especiais, como maior suporte mecânico e proteção contra herbivoria. Estas algas são comumente observadas com a superfície livre de epibiontes, tal característica é resultado de um processo conhecido por “sloughing”, ou descamação das células epiteliais, (Masaki 1984; Masaki et al. 1984; Woelkerling et al. 1993; Poeschel & Miller 1996; Keats et al. 1997), que periodicamente libera as camadas superficiais do organismos e junto com ela eventuais epibiontes. Além disso, alguns autores também reportam a ocorrência deste processo em células de camadas mais abaixo, em células subepiteliais e até mesmo de células próximas à região do peritelo (Keats et al. 1993; Keats et al. 1994; Poeschel & Keats 1997), o que sugere este ser um mecanismo endógeno de regulação da espessura do talo, beneficiando a aderência no substrato e um crescimento mais rápido, conforme o que foi reportado para *Spongites yendoi* (Foslie) Chamberlain e *Lithophyllum neoatalayense* Masaki (Keats et al. 1994; Poeschel & Keats 1997).

Entretanto, esse talo rígido e opaco, consequência da deposição de carbonatos, é considerado o motivo pelo qual a taxonomia do grupo é considerada uma das mais difíceis e problemáticas entre as Rhodophyta (Chamberlain, 1983), e exige técnicas diferenciadas

para estudos anatômicos mais detalhados que possam determinar o posicionamento taxonômico de acordo com a nomenclatura moderna do grupo (Horta, 2002).

No Brasil, desde os trabalhos pioneiros de Tomita (1976), os estudos sobre a taxonomia das algas calcárias ficaram em boa parte restritos aos grupos geniculados. Uma retomada dos trabalhos sobre este grupo no Brasil teve início com a publicação de Horta (2002), que serviu de estímulo para trabalhos subsequentes como os de Nunes et al. (2008), que descreveram 3 espécies da ordem Corallinales para o estado da Bahia. Destacam-se ainda os trabalhos de Villas-Boas et al. (2009) que descreveram 4 espécies do gênero *Lithophyllum* para o estado do Espírito Santo, destacando-se a proposição de uma espécie nova para a ciência e Bahia et al. (2010) que determinou a estrutura de um banco de rodolitos em um gradiente de profundidade, reconhecendo mais cinco táxons de algas calcárias para o estado da Bahia. Farias et al. (2010), baseados em coletas realizadas ao longo de todo o litoral Brasileiro reavaliaram a espécie *Lithothamnion heteromorphum* (Foslie) Foslie, originalmente descrita para o litoral paulista, sudeste do Brasil. Horta et al. (2011), reporta para o litoral sul Brasileiro a ocorrência de *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Lemoine, reavaliando material da coleção de Taylor (1960), discutindo aspectos da diagnose da referida espécie.

Apesar do aprimoramento recente na caracterização morfoanatômica do referido grupo, através da utilização de técnicas e equipamentos de microscopia convencional e eletrônica, a grande plasticidade morfológica e a dependência de características diagnósticas vinculadas às estruturas de reprodução, reforçam a demanda por metodologias alternativas para se subsidiar a taxonomia do grupo. Neste sentido, existe uma tendência de se aliar a essas características, metodologias que possibilitem a utilização de espécimes estéreis e até mesmo desgastados. O uso de ferramentas moleculares é uma alternativa informativa dentro deste contexto, e vem sendo cada vez mais utilizada, aliada a características morfoanatômicas, para determinar a posição sistemática de gêneros, espécies e subespécies (Vidal et al. 2003).

Recentemente o uso de marcadores moleculares tem possibilitado avaliar a biodiversidade de modo rápido e eficiente corrigindo eventuais distorções resultado da plasticidade morfológica observada no grupo. No momento, o sequenciamento de DNA é a técnica mais poderosa para detectar polimorfismo no genótipo e tem sido bastante utilizada na comparação de diferentes níveis taxonômicos (Oliveira 1998).

Em geral, nas macroalgas, os estudos filogenéticos têm-se baseado nas sequências de DNA de diferentes regiões. Essas regiões são denominadas de marcadores moleculares, sendo que a maioria destes estudos está baseada na região dos genes ribossomais, incluindo as sequências dos genes que codificam para o RNA da subunidade menor (SSU rDNA). Recentemente tem sido agregado ao estudo das algas marcadores moleculares denominados de “DNA barcodes”, que em linhas gerais são uma analogia ao código de barras de produtos manufacturados (Stoeckle 2003). O sistema de “DNA barcoding” é prático e uniforme para identificação de espécies, com grande utilidade em levantamentos de biodiversidade e em conservação. O principal marcador utilizado como “DNA barcode” é a região 5’ do gene mitocondrial *cox1* que codifica para a subunidade 1 da enzima citocromo oxidase. Um trabalho que utilizou a região do *cox1* em Rhodophyta (Saunders 2005) constatou que esse marcador se mostrou adequado para a distinção de espécies nos grupos de algas vermelhas estudados. Entretanto, os autores que vem trabalhando com este marcador, ressaltam que é necessário testá-lo e ainda avaliar suas taxas de divergências, de grupo para grupo, o que até o presente momento não foi realizado para as algas calcárias não articuladas.

1.1. Revisão Histórica das metodologias aplicadas às algas calcárias

De acordo com a revisão histórica realizada por Horta (2000), no início do século XVIII, não se sabia ao certo do que se tratavam as algas calcárias, sendo estas na época, consideradas como corais, por apresentarem morfologia semelhante a estes organismos. Esta perspectiva do referido grupo em parte foi resultado do status do conhecimento proporcionado pelos equipamentos e técnicas então utilizado. Muitos autores desde então, investigaram essas ‘crostas calcárias’ a fim de classificá-las adequadamente. Destes esforços, destacamos a importância do trabalho de Phillipi, que em 1837 demonstrou pela primeira vez, de forma clara e definitiva, que estes organismos tratavam-se verdadeiramente de plantas, e estabeleceu neste mesmo ano os gêneros *Lithothamnion* e *Lithophyllum*. Entretanto, Phillipi e outros autores de sua época baseiam a separação dos dois gêneros em aspectos de sua morfologia (Printz 1929). Desta forma, *Lithothamnion* era delimitado pela presença de talos crostosos que se ramificavam dicotomicamente, enquanto *Lithophyllum* por talos foliosos, lisos e parcialmente livres.

Após esse marco na história do estudo das algas calcárias, intensificaram-se os esforços para se compreender melhor a taxonomia destas algas, e importantes cientistas propuseram diferentes sistemas de classificação para agrupar os novos táxons que surgiam à medida que suas pesquisas avançavam. Entretanto, a limitação dos equipamentos ópticos da época provavelmente resultou em interpretações equivocadas que por sua vez só foram resolvidas em meados do século 20.

Segundo Printz (1929), Solms em 1881 foi o primeiro a se atentar para a possibilidade de utilizar os órgãos de reprodução como uma característica para diferenciação de gêneros, e posteriormente Rothpletz em 1981 propõe que as espécies de *Lithothamnia* (termo que se referia à algas calcárias em geral) fosse dividido em três grupos, baseado no desenvolvimento do tetrasporângio. Ambos autores falavam à respeito da morfologia externa que os conceptáculos e soros apresentavam sob a superfície do talo dessas algas. Entretanto, os trabalhos disponíveis sobre as abordagens da época não descrevem as bases metodológicas que nortearam os diferentes autores.

Posteriormente, Foslie (1909) que teve boa parte de seus estudos sobre as algas calcárias baseados na morfologia externa, passou a fazer secções nos talos, e com essa metodologia, pode analisar também aspectos vegetativos, e à exemplo de Solms, características reprodutivas para delimitar espécies, chegando a propor mais de 400 novas espécies em sua coleção.

Assim como Foslie, Lemoine (1909) também observou secções nos talos e constatou que as características anatômicas vegetativas oferecem igual valor taxonômico com relação às reprodutivas.

Com a evolução das ferramentas de estudo, como por exemplo, o advento da microscopia eletrônica, que já em 1977 (Wray 1977) era utilizado para o estudo destas algas, destacam-se os trabalhos que discutiram a posição das algas calcárias incrustantes dentro do grupo das algas vermelhas.

Alguns anos depois, Silva e Johansen (1986) baseados em uma série de estudos bioquímicos, anatômicos, e detalhado trabalho utilizando microscopia eletrônica, apresentam a ordem Corallinales, na qual todas as algas calcárias incrustantes estavam posicionadas até 2010.

Conforme citado anteriormente, a mudança mais significativa nos últimos tempos foi a que Le Gall et al. (2010) propuseram, elevando a família Sporolithaceae, até então

pertencente à ordem Corallinales, para a ordem Sporolithales Le Gall, Payri, Bittner & Saunders.

A não uniformidade de metodologias utilizadas durante o processo de caracterização da biodiversidade das algas calcárias pode ter produzido distorções e eventualmente interpretações equivocadas no que se refere à taxonomia de táxons infragenéricos. Considerando o conhecimento produzido nos últimos 30 anos observa-se que a caracterização de espécies ou mesmo a proposta de espécies novas se basearam em informações advindas de secções em micrótomo de congelamento (e.g. Keats 1994, 1997, Dawson 1960), inclusão em parafina (e.g. Mason 1953, Dawson 1960, Masaki 1968, Tomita 1976, Riosmena et al. 1999), inclusão em historesina (e.g. Funari et al. 1996, Harvey et al. 2003, Harvey et al. 2005) e estudos em microscopia eletrônica (e.g. Wray 1977, Woelkerling 1985, Athanasiadis 1999, Riosmena-Rodriguez 1999, Harvey et al. 2003). As técnicas relacionadas à microscopia fotônica podem resultar em análises morfométricas distintas por resultarem em diferentes estados de turgor das células das diferentes regiões do talo e conseqüentemente de estruturas reprodutivas. Por outro lado, como destacado por Adey et al. (2005), a microscopia eletrônica de varredura permite observações em maior magnitude e com grande resolução sem alterar a morfometria de possíveis caracteres diagnósticos.

Com este panorama, podemos observar que as mudanças metodológicas adotadas pelos pesquisadores desde os estudos pioneiros até os dias atuais, pode ser considerada como importante para justificar as mudanças no posicionamento dos táxons mais infragenéricos até o surgimento de uma nova ordem.

1.2. Estudos do gênero *Lithophyllum* no Brasil e no mundo

Conflitos envolvendo a delimitação dos gêneros *Lithophyllum*, *Titanoderma* Nageli e *Pseudolithophyllum* Lemoine têm sido freqüentemente discutidos na literatura. Segundo Woelkerling et al. (1985) e Irvine & Chamberlain (1994), *Titanoderma*, que apresenta células basais em forma de paliçada e porções do talo bi-estratificadas, e *Lithophyllum*, que não apresenta estas características como regra, são gêneros distintos. Campbell & Woelkerling (1990) e Woelkerling & Campbell (1992) consideram *Titanoderma* como sinonímia de *Lithophyllum* baseados no fato de que células basais em forma de paliçada são por vezes encontradas em espécimes do gênero *Lithophyllum*. Entretanto, estes autores não abordaram a significância da presença ou ausência de porções do talo bi-estratificadas. Segundo Keats (1997), o plano de divisão das células basais do talo em *Lithophyllum* pode variar no decorrer do desenvolvimento do talo, assim a observação da forma destas células está também associada ao plano de corte adotado. Este último autor considera válidas as características diagnósticas adotadas para separar os dois gêneros, assim como Chamberlain et al. (1991). Estudos de biologia molecular corroboram a separação entre os dois gêneros (Bailey 1999; Braga 2003), porém Woelkerling et al. (2002) coloca estes dois gêneros em um complexo *Lithophyllum-Titanoderma*, alegando que somente dados moleculares não seriam suficientes para delimitar os gêneros, necessitando de caracteres morfológicos para validar a separação definitiva dos gêneros.

Outro gênero que permanece sem uma delimitação clara ou separação de *Lithophyllum* é o gênero *Pseudolithophyllum*. Estes táxons foram segregados considerando o padrão de desenvolvimento de seus talos. *Pseudolithophyllum* apresentaria organização dímera, enquanto *Lithophyllum* margem de crescimento monômera. Entretanto, estes dois gêneros foram considerados como sinonímia por Woelkerling (1988) e Irvine & Chamberlain (1994), que consideram as referidas características algumas vezes presentes em um mesmo talo. Além disso, Funari e colaboradores (1996) discutem que a presença de hipotalo monostromático em *Pseudolithophyllum*, característica adicional utilizada para separar os dois gêneros, é bastante variável dentro de uma mesma espécie, sendo dependente, por exemplo, do estágio de desenvolvimento. Segundo Athanasiadis (1999) esta deve ser uma característica que apareceu de maneira independente em diferentes grupos de coralináceas. Além de dados moleculares que ainda não foram acrescentados a esta discussão, são necessários estudos mais detalhados também da morfologia de espécimes tipos destes gêneros para se consolidar uma posição quanto à

delimitação destes táxons. No Atlântico Sul, os estudos de Mendoza (1999), nos fornece evidências de que estes seriam um bom ponto de partida para resolver parte das divergências com estes gêneros, porém poucos foram os dados publicados provenientes da extensa coleção de Mendoza.

Baseado em coleções da costa da Sicília, Philippi (1837) determinou quatro espécies para o gênero *Lithophyllum*: *Lithophyllum expansum* Phillip, *Lithophyllum incrustans* Phillip, *Lithophyllum lichenoides* Phillip e *Lithophyllum decussatum* (J.Ellis & Solander) Philippi (Woelkerling 1983).

Recentemente, diversos trabalhos sobre o gênero *Lithophyllum* vêm sendo publicados em todo o mundo. O Anexo 1 (pág. 74) sintetiza os estudos mais atuais, que se basearam em nomenclaturas atualizadas e técnicas apropriadas para detalhar características diagnósticas para o gênero. Mas é necessário enfatizar que estudos com os gêneros do complexo *Lithophyllum-Titanoderma* e *Lithophyllum-Pseudolithophyllum*, ainda são de extrema importância.

No Brasil, espécies de *Lithophyllum* vêm sendo citadas desde 1960, quando Taylor (1960) cita a ocorrência da espécie *Lithophyllum pustulatum* (Lamouroux) Foslie em costões rochosos do Estado de São Paulo. Posteriormente outros autores citaram a ocorrência de espécies de *Lithophyllum* em recifes de corais (Figueiredo & Steneck 2002; Tâmega & Figueiredo 2005; Nunes et al. 2008), e em bancos de rodolitos (Rocha et al. 2006; Figueiredo & Steneck 2002; Tâmega & Figueiredo 2005), porém a grande maioria dos trabalhos enfocou aspectos da ocorrência e importância geológica e ecológica das algas calcárias no geral, sem um detalhamento de aspectos taxonômicos.

Até o momento foram realizados apenas dois trabalhos que avaliam o referido gênero utilizando técnicas e nomenclaturas atualizadas, estes são o trabalho de Nunes et al. (2008) que descreve *Lithophyllum stictaeforme* (Areschoug) Hauck para o sul da Bahia, e o trabalho de Villas-Boas et al. (2009) que descrevem, para um banco de rodolitos localizado ao largo do estado do Espírito Santo, mais duas espécies do gênero (*Lithophyllum corallinae* (P.L. Crouan & H.M.Crouan) Heydrich, *Lithophyllum johansenii* Woelkerling & Campbell) além de apresentarem *Lithophyllum depressum* Villas-Boas, Figueiredo & Riosmena-Rodriguez, como espécie nova para a ciência baseados nas características do teto dos conceptáculos tetrasporangiais.

1.3. Biologia Molecular

A identificação e delimitação de espécies de Rhodophyta são notoriamente difíceis devido à morfologia e anatomia relativamente simples e, em muitos casos, convergentes, grande plasticidade fenotípica e alternância de gerações no ciclo de vida heteromórficas (Saunders 2005). Devido a essas dificuldades, o emprego de caracteres morfológicos tem, em muitos casos, falhado em delimitar adequadamente gêneros e suas categorias infragênicas e infraespecíficas, levando a constantes mudanças taxonômicas e nomenclaturais.

Consequentemente, estudos de sistemática molecular têm sido cada vez mais empregados para identificar e delimitar espécies, inferir afinidades e relações filogenéticas entre organismos. A sistemática molecular tem se baseado, principalmente, na comparação de sequências de DNA que podem ser obtidas a partir de diferentes regiões genômicas (nuclear, mitocondrial e plastidial).

Um marcador molecular que vem sendo muito utilizado recentemente para identificação de espécies e estudos filogenéticos de algas é o *cox1*. O gene mitocondrial *cox1* codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase e é um segmento de DNA relativamente curto (710 pb), mas que se mostra informativo para identificação de espécies com uma taxa relativamente rápida de divergência, de acordo com Yang et al. (2007), o *cox1* pode ser usado para a identificação de espécies, filogeografia, resolução de estrutura de populações e em estudos visando a conservação de espécies.

O sucesso do *cox1* em animais levou Saunders (2005) a considerá-lo como um potencial marcador para o uso de “DNA barcoding” em algas vermelhas (Robba et al. 2006). São denominadas de “DNA barcodes” (em analogia ao sistema de código de barras utilizado em produtor manufaturados) as sequências de marcadores moleculares de tamanho relativamente curto que contenham uma variação de sequências adequadas para distinção de organismos em nível de espécie (Stoeckle 2003, Presting 2006). Os resultados obtidos por Saunders (2005) para complexos de espécies das ordens Gigartinales e Rhodymeniales mostraram que o *cox1* é um marcador apropriado para “DNA barcoding” nessas duas ordens de Rhodophyta, e os trabalhos subsequentes realizados com outros grupos de algas vermelhas (Geraldino et al. 2006, Robba et al. 2006, Yang et al. 2007, Walker et al. 2009) corroboraram os resultados de Saunders (2005).

Outro marcador vem sendo testado quanto à sua efetividade como barcode em plantas, o UPA (Universal Plastidial Amplicon). O referido marcador foi descrito por

Presting (2006) e posteriormente, testado para uma seleção de linhagens de algas (Sherwood & Presting 2007) e o que estes trabalhos demonstraram foi que esta região pode ser facilmente amplificada e sequenciada para a maioria das cianobactérias e para as algas, com apenas algumas exceções em nível de gênero (e.g. *Cladophora*). Esta universalidade é excepcional entre os primers utilizados em algas, e demonstra que este é um potencial marcador para o levantamento de diversidade e avaliação de ambientes onde estão presentes várias linhagens de algas (Sherwood et al. 2008) e conseqüentemente é mais um candidato a marcador para “DNA barcode”.

Para análises filogenéticas, o marcador molecular mais utilizado em algas é o gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade menor do ribossomo (“small subunit rRNA gene” - SSU rDNA), conhecido também como 18S. Esse marcador é frequentemente utilizado para o grupo das Rhodophyta em geral (Bird et al. 1992, Oliveira et al. 1995, Bailey 1999, Broom et al. 1999, Harvey et al. 2002, Milstein 2002, Broom et al. 2008, Geraldino et al. 2009).

Poucos são os estudos enfocando a biologia molecular nas algas calcárias de um modo geral. Dos estudos pioneiros, podemos destacar os trabalhos de Bailey & Chapman (1998) que utilizaram o gene SSU rDNA para inferir a filogenia da ordem Corallinales e Bailey (1999) que utilizou o referido gene para investigar as relações entre os gêneros *Lithophyllum* e *Titanoderma*.

Harvey et al. (2003) utilizaram o SSU rDNA para a análise filogenética do gênero *Choreonema* Schmitz (1898), e para posicionar as subfamílias Choreonematoideae (na qual o único representante é o gênero *Choreonema*), Melobesioideae, e Austrolithoideae, anteriormente posicionadas na família Corallinaceae, em uma família separada da Ordem Corallinales (Rhodophyta), a família Hapalidiaceae. Este estudo baseou-se nas fortes evidências moleculares e na presença de conceptáculos tetrasporangiais multiporados para redescrever a família Hapalidiaceae.

Destacam-se ainda os trabalhos de Broom et al. (2008) que além do nSSU rDNA, utilizou o marcador *psbA*, um gene plastidial que codifica a proteína D1 do fotossistema II, para a reconstrução filogenética das Corallinales da Nova Zelândia e de Vidal et al. (2008) que utilizaram o SSU rDNA e a região espaçadora *cox2-3* aliados à caracteres morfológicos obtidos em MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) para estabelecer as relações filogeográficas do gênero *Spongites*, gênero da família Corallinaceae, da costa sul do Chile com espécies do gênero encontrados no Sul da África e na Nova Zelândia.

Recentemente Le Gall et al. (2010), utilizaram os genes SSU, LSU (gene que codifica o rRNA da subunidade maior do ribossomo) e o EF2 (Fator de Elongação 2), além das evidências morfológicas reprodutivas, para propor uma mudança no status taxonômico da família Sporolithaceae, elevando-a à uma nova ordem para as algas calcárias, a ordem Sporolithales.

A abordagem molecular para este grupo também pode auxiliar no entendimento dos diferentes tipos morfológicos que uma mesma espécie pode apresentar. Schaeffer et al. (2002) utilizaram o AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) para analisar os diferentes fenótipos da espécie *Lithophyllum margaritae* e constataram diferenças genéticas entre populações de hábito folioso e fruticoso. Embora estes resultados necessitem de confirmação por motivos que os próprios autores apontam – insuficiência amostral e a necessidade de utilização de marcadores filogenéticos (como por exemplo, o SSU rDNA) para uma melhor acurácia, esta também é uma abordagem interessante para este grupo diante das variações morfológicas e de hábitos que ocorrem numa mesma espécie.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Considerando que o Brasil abriga potencialmente os maiores bancos de rodolitos do planeta (Foster 2001) e que estudos descritivos revelam ser o gênero *Lithophyllum* um dos mais frequentes e abundantes nos referidos ambientes assim como em costões rochosos, e ainda se por um lado existem claros avanços recentes no conhecimento da biodiversidade das algas calcárias, o conhecimento de sua diversidade molecular é ainda modesto, o presente trabalho teve como objetivo descrever os representantes do referido gênero no meso e infralitoral do Sul do Brasil, com base em dados morfo-anatômicos aliados a dados moleculares.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a morfoanatomia de espécies do gênero *Lithophyllum* baseado em técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, buscando características diagnósticas para a delimitação de espécies no gênero;
- Contribuir para o conhecimento da distribuição das espécies deste gênero no Atlântico Sul;
- Descrever a variação na morfologia e anatomia das populações locais (Sul do Brasil);
- Comparar as informações do material do Sul com as demais populações já descritas para as demais regiões do Brasil;
- Sequenciar e comparar os genes SSU r DNA, *cox1* e UPA para fornecer novos subsídios para as discussões da taxonomia e filogenia do gênero.

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de estudo

As coletas foram realizadas nos estados da região Sul do Brasil.

As áreas amostradas estão localizadas na região ficogeográfica Temperada Quente, que compreende entre o norte do Estado do Rio de Janeiro e a região de Rio Grande no Rio Grande do Sul (Horta et al. 2001).

Esta região apresenta uma grande variação sazonal das condições meteorológicas e oceanográficas, com uma forte influência da corrente das Malvinas durante o inverno, com águas frias e ricas em nutrientes, e da corrente do Brasil (CB) durante o verão, com águas mais quentes e pobres. Observa-se também a ocorrência da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) durante o verão, promovendo eventualmente o fenômeno de ressurgência em algumas áreas.

No Paraná, a área amostrada foi o Arquipélago de Currais ($25^{\circ}44'08.62''S$ e $48^{\circ}21'58.70''W$), local que apresenta importância científica, por ser um dos poucos afloramentos naturais no Estado do Paraná que oferece a disponibilidade de habitats apropriados ao desenvolvimento de comunidades com características peculiares (Pinheiro 2002). Neste arquipélago são raros os fundos consolidados tão frequentes nos estados vizinhos de São Paulo e Santa Catarina, muito menos fundos de algas calcárias ou recifes de corais, abundantes na região central e nordeste do Brasil. A coleta no infralitoral deste local foi realizada em Março de 2010 pelo grupo da UFPR (Dra. Franciane Pellizari e Oc. Juliane Bernardi), que numa parceria com o Professor Paulo Horta, gentilmente nos cedeu o material para análise e inclusão neste estudo. Este material não foi passível de sequenciamento, visto que este já se encontrava fixado em formol.

Na Ilha de Santa Catarina (Florianópolis) as coletas foram realizadas no costão rochoso da Praia de Ponta das Canas ($27^{\circ}24'89''S$; $48^{\circ}26'78''W$), onde a ocorrência de algas calcárias incrustantes pode ser observada durante o ano todo, abaixo de outras macroalgas.

O material amostrado na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, também localizada em Santa Catarina, foi coletado na Enseada do Rancho Norte ($27^{\circ}44'32.83''S$ e $48^{\circ}38'74.26''W$), zona da Reserva classificada como intangível pelo plano de manejo, uma vez que apresenta um banco de rodolitos, ambiente com ampla heterogeneidade de habitats e de grande importância ecológica. Este banco representa o limite sul de distribuição dos

bancos de rodolitos na costa brasileira e consiste em um fundo arenoso coberto parcialmente por nódulos calcários, cuja profundidade varia de 5 a 20m com uma área de aproximadamente 1000m² (Gherardi, 2004). As coletas foram realizadas em 2009 e 2010, além dos espécimes analisados por Horta (2000) provenientes deste mesmo local e que foram reavaliados neste trabalho.

A Ilha do Xavier é uma ilha costeira localizada a 4,5km da Ilha de Santa Catarina (Florianópolis-SC, 27°36'34.48"S e 48°23'13.25"W), nas proximidades da praia Mole. A ilha é cercada por paredões rochosos, e algas calcárias são frequentemente encontradas incrustando esses paredões e alguns pedaços de rocha soltas no fundo. Esses fragmentos de rochas foram coletados em janeiro de 2010 para utilização neste estudo.

O estado do Rio Grande do Sul está representado neste trabalho pela cidade de Torres, ao norte do estado. As coletas foram realizadas no costão da área de proteção ambiental do Parque da Guarita (29°21'63"S; 49°44'98"W), onde foram observados poucos indivíduos e quando encontrados, estavam muito próximo à arrebentação. Não há relatos da ocorrência de algas calcárias em regiões mais ao sul deste estado, e possivelmente este é o limite de distribuição destas algas no Brasil.

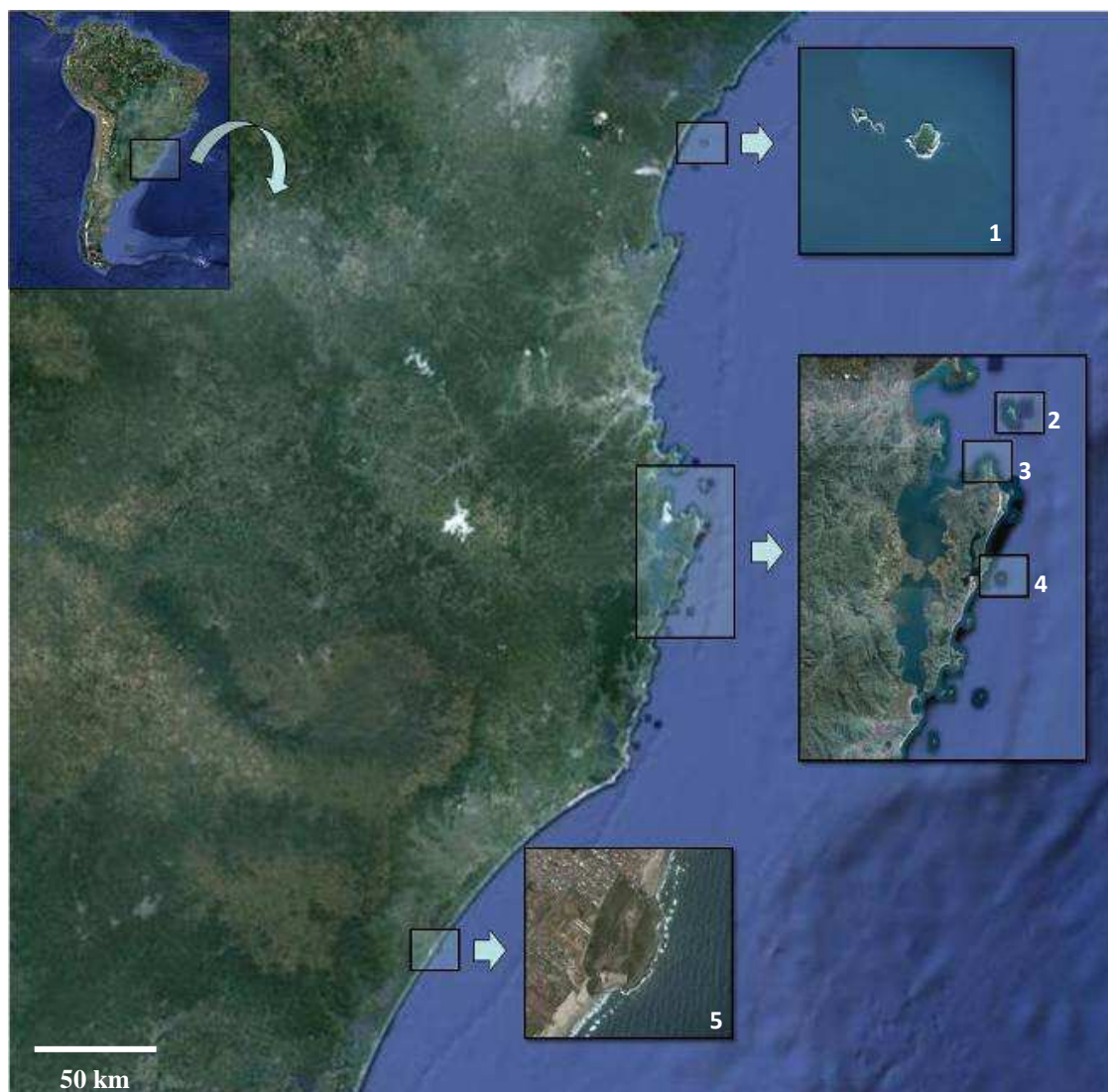


Figura 2. Mapa da região Sul do Brasil detalhando as áreas de estudo. 1) Arquipélago de Currais-PR; 2) Ilha do Arvoredo-SC; 3) Ponta das Canas, Florianópolis-SC; 4) Ilha do Xavier-SC; 5) Praia da Guarita, Torres-RS.

3.2. Coleta e Preservação do Material

No infralitoral, as áreas foram amostradas com a utilização de mergulho autônomo, e as coletas na região entre marés foram realizadas durante eventos de marés baixas de sizígia. Para as coletas de material incrustante foi utilizada uma marreta e uma talhadeira de ferro.

Logo após a coleta, em laboratório, o material foi lavado, triado a fim de retirar epífitas e fauna associada e metade deste material foi fixado em formol 4% em água do mar. A outra metade destinada às análises moleculares, foi seca ao ar livre sob papel filtro e em seguida acondicionadas em sacos tipo “zip” com sílica gel azul, para mantê-lo seco.

3.3. Estudos Morfológicos

Microscopia Óptica

Para a confecção de cortes histológicos o material foi descalcificado em ácido clorídrico em concentrações de 5 - 10% e desidratado de forma gradual em soluções de etanol à 30, 50, 70, 90 e 100% de concentração, permanecendo emergido de 20-30 minutos para cada concentração. O material foi infiltrado por 12 horas em solução de metacrilatoglicol (“Historesin embedding Kit” Leica, marca Reichert-Jung) e a inclusão foi realizada segundo as instruções fornecidas pelo referido fabricante. Os blocos foram seccionados em uma espessura de 5 e 10 μm , em micrótomo rotativo marca Leica RM 2125 RT, com navalha de aço para montagem das lâminas permanentes.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Seguindo a metodologia de Horta (2002), com a utilização de lupa foram selecionados espécimes que apresentavam margens de crescimento e/ou conceptáculos. Ainda sob a lupa, utilizando alicates de tamanhos variados, o respectivo material foi fraturado, devidamente posicionado e fixado em fita adesiva dupla face de carbono sob suporte metálico (“stub”) e metalizado em ouro, com um tempo de exposição de 60 segundos, a uma corrente de 50 mA.

As amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JEOL JSM-6390LV. A voltagem utilizada durante as observações no microscópio variou de 15-25 kV, sempre em busca de se obter melhor resolução.

O material analisado, bem como as lâminas permanentes, foram depositados no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR).

Análise morfológica

A análise morfológica das plantas foi feita com base nos seguintes caracteres vegetativos e reprodutivos:

I. Caracteres vegetativos:

- Hábito, cor e textura dos talos
- Tipo de fixação ao substrato
- Forma, comprimento e diâmetro das células epiteliais, subepiteliais, do peritalo e do hipotalo
- Presença de conexões secundárias entre as células com o filamento adjacente
- Ausência de fusões celulares

II. Caracteres reprodutivos:

- Forma, comprimento e diâmetro dos conceptáculos tetrasporangiais
- Presença ou ausência de columela central; calcificada ou mucilagínosa
- Número de células do filamento do teto do conceptáculo
- Profundidade do conceptáculo em número de células, da base do conceptáculo até a célula epitelial.

Morfometria e terminologia

Medidas dos conceptáculos, bem como demais medidas estão de acordo com Chamberlain (1983), e a terminologia morfológica e anatômica empregada estão de acordo com Woelkerling (1988) e Woelkerling et al. (1993).

3.4. Estudo Molecular

No Anexo 2 (pág. 75) estão listados os espécimes de *Lithophyllum* do Sul do Brasil para os quais foram obtidas sequências para o estudo molecular. Considerando os marcadores utilizados, não foi possível obter sequências de todos os marcadores para todos os espécimes, e os possíveis motivos para este fato serão discutidos mais adiante. Além das amostras do Sul do Brasil, sequências de táxons dos gêneros *Lithophyllum* e *Sporolithon* coletados em outras localidades, como Bahia, Pernambuco e Paraíba, foram incluídas neste estudo a fim de enriquecer as análises.

Marcadores utilizados

1) SSU rDNA

O gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade menor do ribossomo (“small subunit rDNA gene” - SSU rDNA), conhecido também como 18S, é um marcador molecular bastante utilizado para análises filogenéticas. É uma região do DNA nuclear relativamente grande (aproximadamente 1800 pb), onde a estrutura secundária conservada do gene auxilia no alinhamento das sequências de diferentes organismos e as regiões conservadas e semi-conservadas são utilizadas como sítios informativos em análises filogenéticas de alta hierarquia taxonômica, como por exemplo ordens e famílias; e as regiões variáveis podem auxiliar na identificação de diferentes gêneros e espécies da ordem Corallinales (Bailey 1999, Vidal et al. 2003, Broom et al. 2008).

2) *cox1*

O gene mitocondrial *cox1* codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase. O *cox1* é um segmento de DNA relativamente curto (710 pb), mas que se mostra informativo para identificação de espécies com uma taxa relativamente rápida de divergência. O gene é de herança haplóide, não contém introns que podem complicar a amplificação usando a técnica de PCR (Herbert et al. 2003, Stoeckle 2003, Saunders 2005).

3) UPA

O UPA (*Universal Plastid Amplicon* ou 23S rRNA plastidial) região plastidial conservada em todas linhagens de fotossintetizantes, é um marcador que tem se mostrado ser efetivo na maioria dos grupos de algas, apesar de ser um segmento muito curto (~370pb), e ser uma região pouco variável (Presting 2006).

Extração de DNA

1) Limpeza do material

O material destinado às análises moleculares foi observado em lupa para verificar a presença de epífitas e de outros organismos. Para minimizar as chances de amplificar outros organismos, houve a necessidade de quebrar as amostras visto que estas algas incrustam sob bivalves, moluscos, entre outros pequenos animais.

2) Maceração em Nitrogênio líquido

Com o auxílio de pinças e alicates, pequenos fragmentos foram cuidadosamente retirados dos espécimes de rodolitos, procurando sempre regiões marginais e mais limpas possíveis. Estes fragmentos foram pesados em balança de precisão e a biomassa utilizada variou de 150 a 200 mg. Em cadinhos previamente resfriados, os fragmentos selecionados foram macerados utilizando nitrogênio líquido para a lise de tecidos e células. A extração de DNA foi realizada com o *kit* de extração “NucleoSpin Plant II” (Macherey-Nagel), seguindo o protocolo do fornecedor.

Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação por reação em cadeia da polimerase (ou Polymerase chain reaction, em inglês) é a técnica através da qual é possível obter cópias de uma determinada região do material genético, em quantidade suficiente que permita sequenciar uma região específica, ou verificar a presença de um marcador que é alvo do estudo, entre outras aplicações.

“*Primers*” específicos foram utilizados para delimitar a região de interesse a ser amplificada. As sequências dos “*primers*” utilizados neste estudo para a PCR e reações de sequenciamento estão listados na Tabela 3.

Para a amplificação do SSU rDNA foram utilizados os “primers” 530F e 536R combinados com 18S3’ e 18S5’ respectivamente. Os “primers” GAZ F1 e GAZ R1 foram utilizados para a amplificação do *cox1* e para a amplificação UPA, foram utilizados os “primers” UPA-R e UPA-F.

Tabela 3. “Primers” utilizados para PCR e sequenciamento; em laranja, lilás e azul estão os primers para o SSU rDNA, *cox1* e UPA, respectivamente.

“Primers”	Sequências
18S5’ (forward)	5’-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT- 3’
536R (reverse)	5’-GAATTACCGCGGCTGCTG-3’
530F (forward)	5’-GAGGGCAAGTCTGGTG-3’
18S3’ (reverse)	5’-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA-3’
1055F (forward)*	5’-GGTGGTGCATGGCCG-3’
1055R (reverse)*	5’-CGGCCATGCACCACC-3’
GAZ F1 (forward)	5’- TCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3’
GAZ R1 (reverse)	5’- ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA -3’
UPA-F (forward)	5’- GGACAGAAAGACCCTATGAA- 3’
UPA-R (reverse)	5’- TCAGCCTGTTATCCCTAGAG -3’

* os primers internos 1055F e 1055R foram utilizados apenas para o seqüenciamento.

Para a preparação da reação das PCR, com um volume final de 50µl foram utilizados a seguinte proporção de reagentes: 32,75µL de água, 1µL (aproximadamente 2 ng) de DNA total, 10µL de tampão, 3µL de MgCl₂, 1µL de dNTP, 1µL de cada par de primer (“forward e reverse”) e 0,25µL de Taq Polimerase (Invitrogen). Foram feitos, também, controles negativos de PCR (todos os reagentes menos DNA) a fim de verificar a pureza dos reagentes.

A reação da PCR foi realizada em termociclador Techne TC-512 (Analítica) com ciclos específicos para cada marcador molecular utilizado, conforme listado abaixo:

- SSU rDNA - 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 60°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.

A eletroforese em gel de agarose permite a verificação do tamanho e quantidade de DNA amplificado a partir da análise comparativa com o bandejamento de um marcador conhecido. Desta forma, uma alíquota de 5 µL do DNA amplificado foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,7% em TBE (Tris 445 mM, ácido bórico 445 mM e 10 mM EDTA) e corado com *gel red*, em cuba de eletroforese (BLD Apelex); posteriormente o gel foi observado em transluminador UV .

Para fins de consulta posterior, o mesmo foi fotografado em câmera digital é Kodak DC290, acoplada no adaptador Kodak Edas 290, o Transluminador UV é da empresa Spectoline, modelo TE-312S, 1D Image Analysis Software. Version 3.5.

Purificação e quantificação do produto de PCR

O produto da PCR foi purificado em colunas “GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fornecedor.

A quantificação do DNA amplificado foi feita em gel de agarose, conforme descrito acima, comparando por uma estimativa visual a concentração do DNA purificado com a concentração de DNA da banda do marcador padrão “1Kb DNA ladder” (Invitrogen), seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante.

Sequenciamento e Precipitação

O sequenciamento foi feito com aproximadamente 40 ng do produto da PCR purificado (de 1µm a 7µm em alguns casos), e o kit de sequenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” da Applied Biosystems (Foster City, EUA). Seguindo as instruções do fabricante, para cada reação de sequenciamento foram

utilizadas as seguintes proporções: 2 µL de BigDye; 2µL de tampão (5x), 2 a 4 µL do DNA purificado (dependendo do bandeamento), 1 a 3.3 µL de primer (dependendo da concentração molar) e H2O milliQ até completar um volume final de 10µL. Os primers utilizados estão listados na Tabela 3.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Termocilador Techne TC-512, e o ciclo utilizado para seqüenciamento foi: 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 50°C a 20 seg e 60°C 4 min, com um tempo total de 3 h e 56 min.

A precipitação das amostras foi realizada adicionando aos tubos 1µL de EDTA (125mM), 1µL de acetato de sódio (3M) e 25µL de etanol (100%) os quais foram invertidos por 4 vezes, envolvidos em papel alumínio e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram descartados invertendo os tubos em papel absorvente.

Foram adicionados mais 35µL de Etanol (70%) nas amostras, e estas foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e os sobrenadantes desprezados. O produto foi seco em centrífuga a vácuo por 60 minutos.

As amostras de DNA foram sequenciadas em sequenciador automático 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Alinhamentos e inferência filogenética

As seqüências do SSU rDNA, UPA e *cox1* de *Lithophyllum* obtidas neste trabalho e as seqüências dos demais táxons importados do GenBank (Anexos 2 e 3, respectivamente págs. 75 e 76) foram alinhadas no programa ClustalW dentro do BioEdit (Hall 1999). Também foram incluídas nos alinhamentos as seqüências desses marcadores para as espécies escolhidas como grupo externo.

Seqüências correspondentes aos “primers” e regiões variáveis que poderiam ser alinhadas com ambigüidade, foram removidas de todos os alinhamentos gerando as seguintes matrizes:

- 1) Matriz UPA: 370 posições e 18 táxons
- 2) Matriz *cox1* ‘curta’: 644 posições e 14 táxons
- 3) Matriz *cox1* geral: 667 posições e 21 táxons
- 4) Matriz SSU rDNA: 1513 posições e 16 táxons

As análises filogenéticas para neighbour-joining (NJ) e máxima parcimônia (MP) foram feitas no programa PAUP 4.0b8 (Swofford 2000). O modelo evolutivo apropriado foi selecionado no Modeltest (Posada & Crandall 1998) usando o Akaike Information Criterion (AIC).

Para o método de distância, foi construída uma árvore de neighbour-joining “NJ” (Saitou & Nei 1987) com o modelo de substituição de Tamura & Nei (1993). A árvore de máxima parcimônia (MP) foi inferida por busca heurística. As árvores iniciais foram obtidas pelo algoritmo “stepwise addition” ou adição passo a passo, com adição de seqüências ao acaso (10 replicatas) e rearranjadas pelo algoritmo “branch-swapping: tree bisection-reconnection” (TBR). Em ambas as árvores de NJ e MP, as lacunas foram consideradas como dados ausentes e foi dado o mesmo peso para todos os sítios. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) foram feitas com 1000 replicatas para os métodos descritos acima.

A análise bayesiana foi realizada para a matriz de SSU rDNA através do programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). O modelo evolutivo apropriado foi selecionado no MrModeltest 2.2 (Nylander 2004). Quatro cadeias de MCMC foram realizadas com 4×10^6 gerações, com reamostragem a cada 1000 gerações. Foram descartadas as primeiras 50.000 gerações como “burn-in”, determinado com a ajuda de um gráfico construído com as colunas de gerações e valores de máxima verossimilhança, no programa Excel 2007. Após eliminar as árvores associadas ao “burn-in”, uma árvore consenso foi construída.

4. Resultados

4.1. Estudo Morfológico

Lithophyllum margaritae (Hariot) Heydrich

Bot. Jahrb. Syst. 28, p. 530. 1901.

Figuras 3-14, Tabela 4

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

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

Sinônimos homotípicos:

Pseudolithophyllum margaritae (Hariot) Me.Lemoine

Sinônimos heterotípicos:

Lithothamnion digueti Hariot

Lithophyllum digueti (Hariot) Heydrich

Lithophyllum dentatum f. *digueti* (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

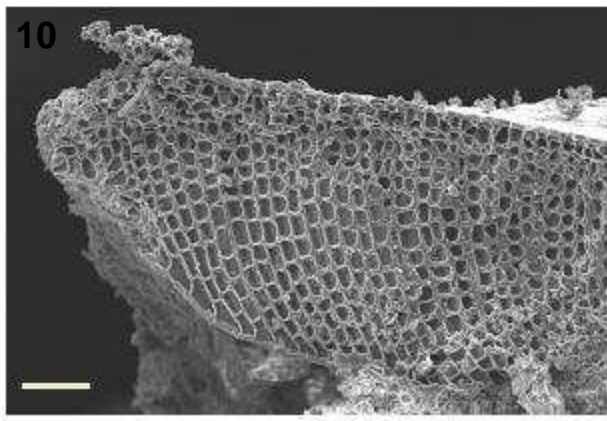
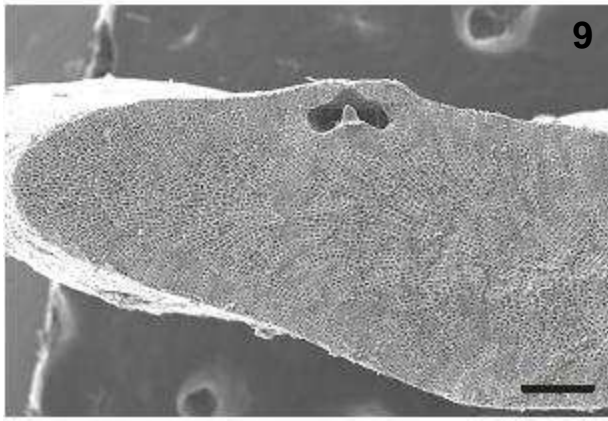
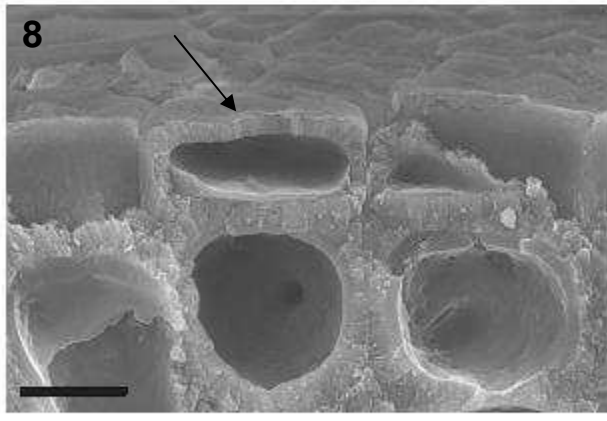
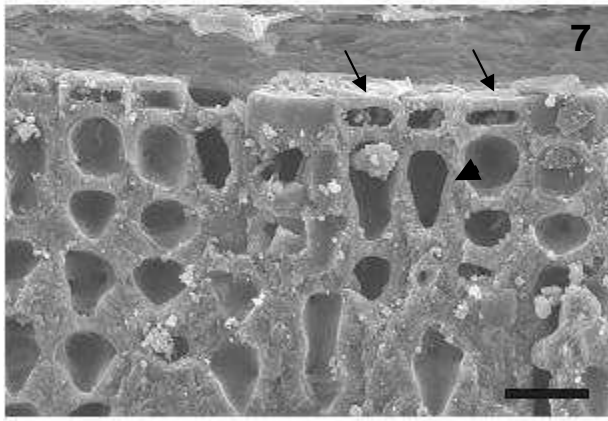
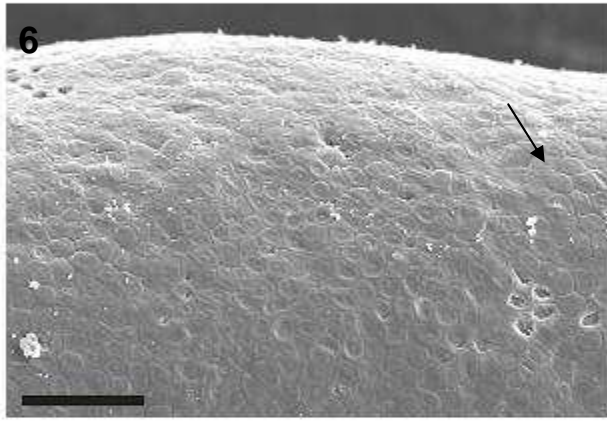
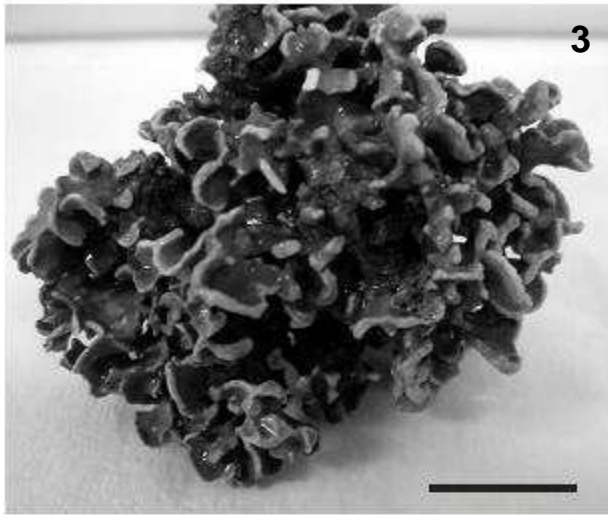
Lithophyllum veleroae Dawson

Sinônimos homotípicos e heterotípicos seguem Riosmena-Rodriguez *et al.* (1999)

Hábitat e estrutura vegetativa

Plantas geniculadas, de cor vermelho purpúreo, com partes jovens do talo incrustantes, e as partes mais velhas com ramificações lamelares formando rodolitos com formas irregulares que variam de globosos a foliáceos, medindo de 3-8 cm de diâmetro (figs. 3-5); células epiteliais de contorno poligonal com paredes distais achatadas ou côncavas medindo de 1,5-5 μm de altura e 5–13 μm de diâmetro, células subepiteliais com 4-13 μm de altura e 4-8 μm de diâmetro. Células do peritalo com 7-16 μm de altura e 3-10 μm de diâmetro, células dos filamentos adjacentes unidas por conexões secundárias (figs. 6-8); Talo de organização monômera nas porções mais velhas (fig. 9), e organização dímera observada nas margens de crescimento (fig. 10). Fusões de células não observadas; tricocitos também não foram observados.

Os espécimes foram encontrados crescendo sob forma de rodolitos, ou seja, sob forma de vida livre, em um banco de algas calcárias situado na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo. Esta espécie foi encontrada mais ao sul do banco e em profundidades que variaram de 10 a 15 metros de profundidade, sem diferenças observadas nas coletas nos períodos de inverno e verão.



Figuras 3-10. Estrutura vegetativa de *Lithophyllum margaritae*.

Figs. 3-5. Aspecto geral dos diferentes tipos morfológicos do talo de *Lithophyllum margaritae*. Barras das escalas = 2 cm.

Fig. 6. Células epiteliais com formato poligonal – vista superficial (seta). Barra da escala = 50µm.

Fig. 7. Fratura transversal da região superficial do talo, mostrando as células epiteliais retangulares com paredes distais achatadas ou côncavas (setas) e células subepiteliais (ponta de seta) maiores em relação às epiteliais. Barra da escala= 10 µm.

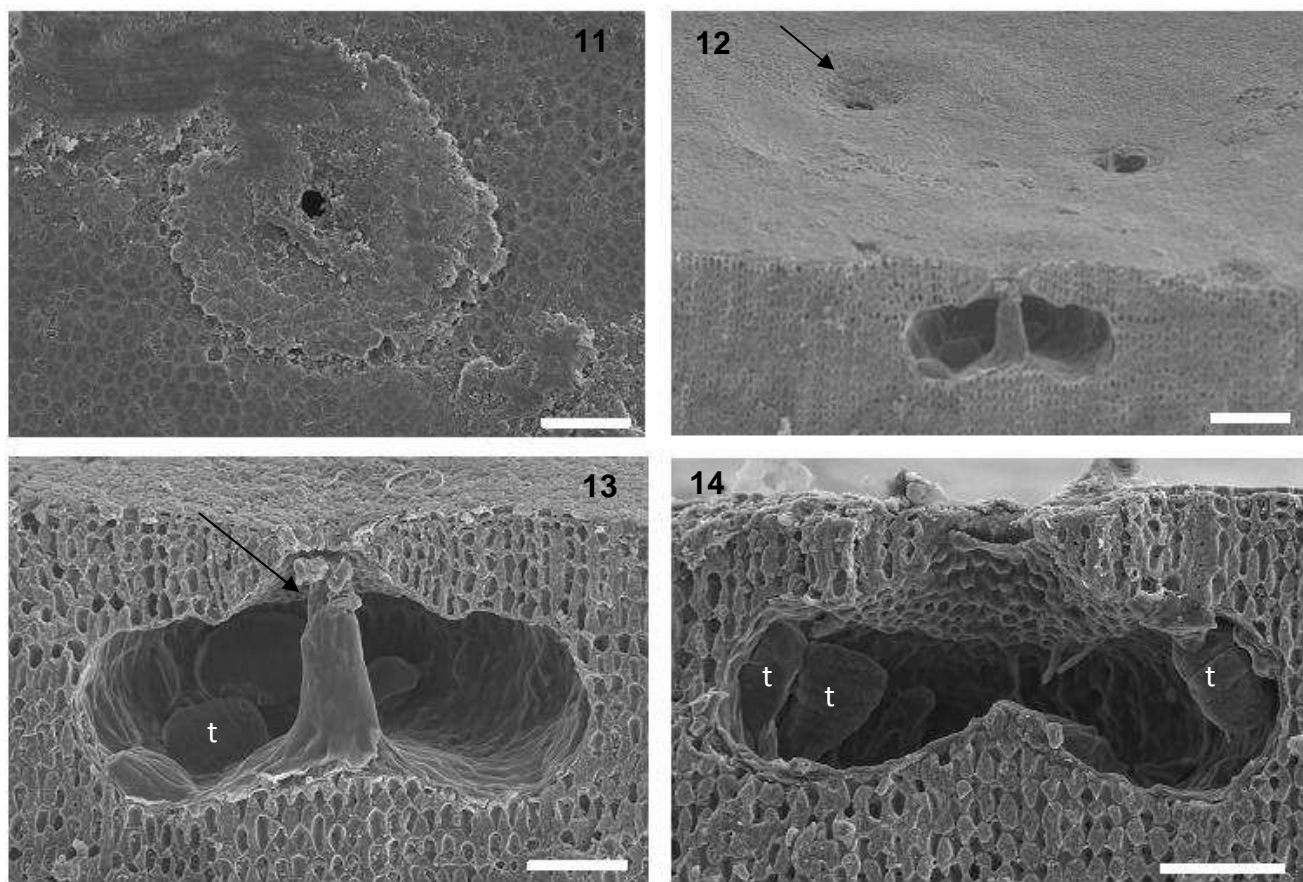
Fig. 8. Detalhe de uma célula epitelial (seta). Barra da escala = 5 µm.

Fig. 9. Fratura longitudinal evidenciando talo com organização monômera. Barra da escala = 200 µm.

Fig. 10. Fratura longitudinal na margem de crescimento do talo, evidenciando organização dímera. Barra da escala = 50 µm.

Aspectos reprodutivos

Estrutura de reprodução espórica em conceptáculos tetrasporangiais uniporados (fig. 11), no mesmo plano ou sutilmente afundado em relação à superfície do talo (fig. 12) com câmara com 180-260 μ m de diâmetro e 70-95 μ m de altura, teto apresentando 3-5 células de espessura e com base da câmara do conceptáculo 10-14 células abaixo da superfície do talo, apresentando frequentemente columela central calcificada que em alguns conceptáculos se projeta para dentro do canal do poro (fig. 13). Conceptáculos enterrados foram observados em porções mais velhas do talo. Canais dos poros delimitados por células, mas não ocluídos por elas; Tetrasporângios zonados com 40-60 μ m de altura e 15-35 μ m de diâmetro (fig. 14). Não foram observados conceptáculos femininos, masculinos e bisporangiais.



Figuras 11-14. Estrutura reprodutiva de *Lithophyllum margaritae*.

Fig. 11. Vista superficial do conceptáculo uniporado. Barra da escala = 50 μm .

Fig. 12. Fratura transversal no talo evidenciando um conceptáculo no mesmo plano do talo e um conceptáculo com canal do poro sutilmente afundado (seta). Barra da escala = 100 μm .

Fig. 13. Conceptáculo tetrasporangial com columela central calcificada (seta). Barra da escala = 50 μm .

Fig. 14. Conceptáculo com tetrasporângios zonados (t). Barra da escala = 50 μm .

Distribuição geográfica

Lithophyllum margaritae é descrito para o Golfo da Califórnia, no México (Riosmena-Rodriguez et al. 1999) e citado para o estado de São Paulo e Santa Catarina no Brasil (Horta 2000).

Materiais examinados

BRASIL. Santa Catarina: Florianópolis, Ilha do Arvoredo, 27°44'32.83"S e 48°38'74.26"W (Novembro 2009, FLOR 14570, FLOR 14571; Julho 2010 FLOR 14580, FLOR 14581), talos tetrasporofíticos.

Lithophyllum sp.1

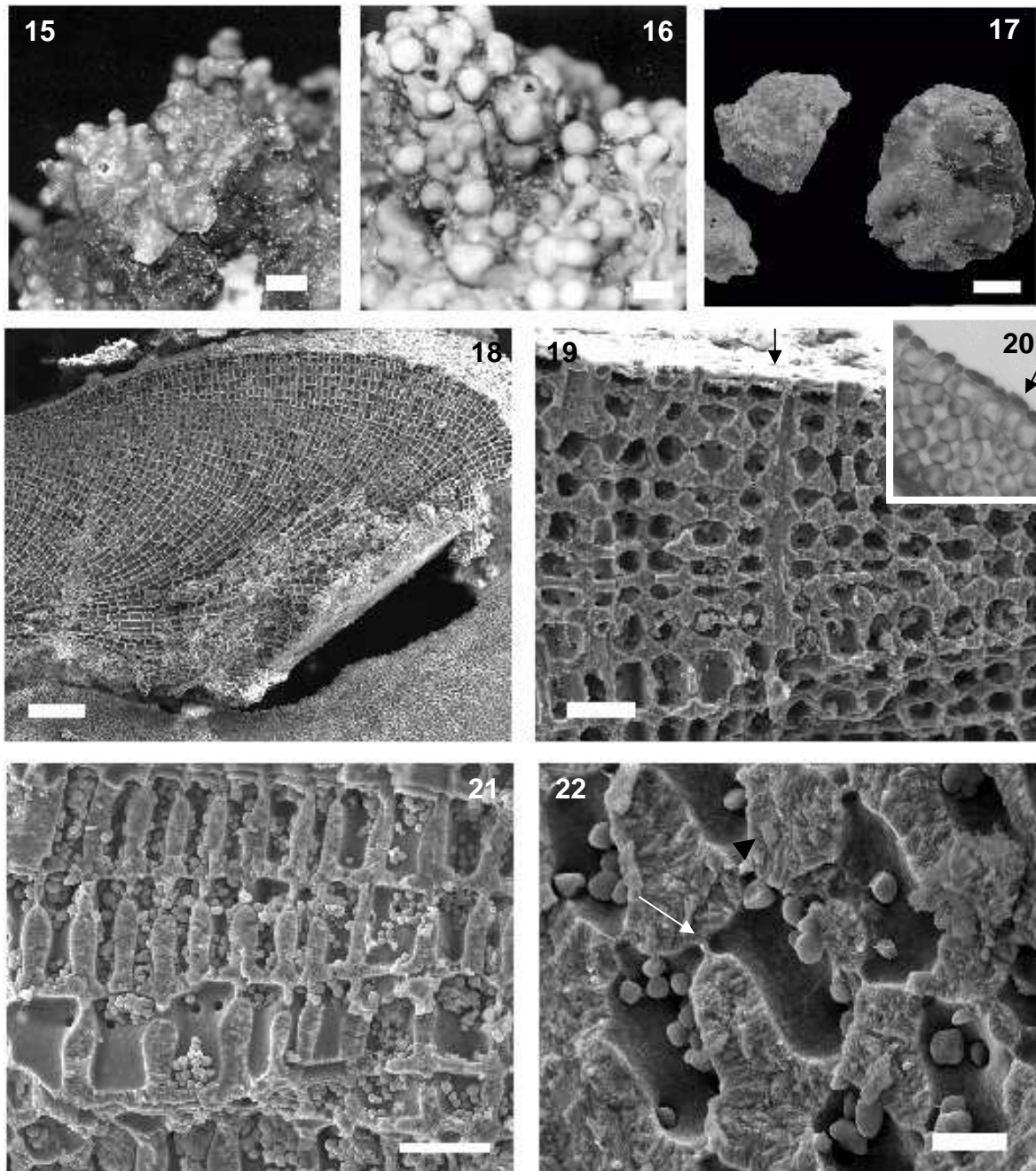
Figuras 15-26, Tabela 5

Hábitat e estrutura vegetativa

Plantas calcárias não geniculadas, com superfície do talo lisa ou com aspecto rugoso, formando suaves e esparsas protuberâncias, ou ainda chegando a um talo verrugoso (figs. 15-17). Quando verrugoso, protuberâncias com cerca de 5 mm de diâmetros e 5-10 mm de altura. Talos crescendo sob forma de rodolitos em fundo arenoso, ou incrustante crescendo totalmente ou levemente aderido ao substrato, sendo encontrado em costões e ilhas circundantes à costa. Talo de organização monômera nas porções mais velhas e nas margens de crescimento (fig. 18). Células epiteliais de 1-2 camadas, com 3-6 μ m de altura e 6-11 μ m diâmetro com paredes distais achatadas ou côncavas (fig. 19). Células subepiteliais com 6,5-13 μ m de altura e 4,5-10 μ m de diâmetro (fig. 19). Filamentos do peritalo relativamente perpendiculares ao hipotalo com células de 8-17 μ m de altura e 5,5-11 μ m de diâmetro (fig. 20). Estes filamentos, assim como os demais constituintes do talo, são ligados entre si por conexões celulares secundárias (fig. 21). Tricocitos não foram observados.

Ocorrendo sob forma de vida livre, também conhecida como “rodolito”, esta espécie foi encontrada formando bancos de algas calcárias na Reserva Marinha Biológica Marinha do Arvoredo em profundidades de 5 a 15 metros de profundidade.

Sob forma incrustante, foi encontrada epilítica crescendo nos costões no mesolitoral e infralitoral, e ocasionalmente epizóica (em moluscos). No mesolitoral, os espécimes foram encontrados em costões de praias de Florianópolis e Torres e no infralitoral, foram encontradas no Arquipélago de Currais (no litoral paranaense) em profundidades de 5-10 metros de profundidade e em ilhas circundantes da costa de Florianópolis.



Figuras 15-21. Estrutura vegetativa de *Lithophyllum* sp.1.

Fig. 15-17. Aspecto geral de diferentes tipos morfológicos de *Lithophyllum* sp.1.

Barra da escala = 5 mm.

Fig. 18. Fratura longitudinal evidenciando margem de crescimento monômera. Barra da escala = 20 μ m.

Fig. 19. Fratura transversal mostrando as células epiteliais achatadas (setas). Barra da escala = 20 μ m.

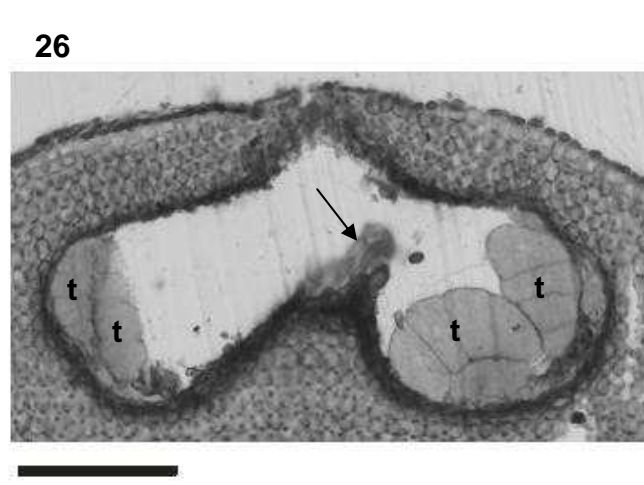
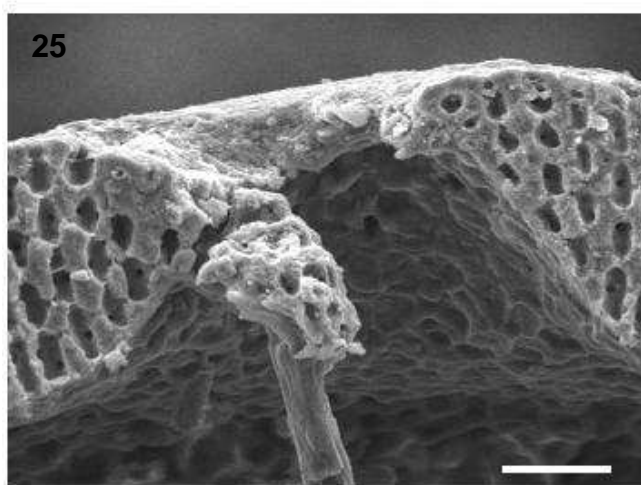
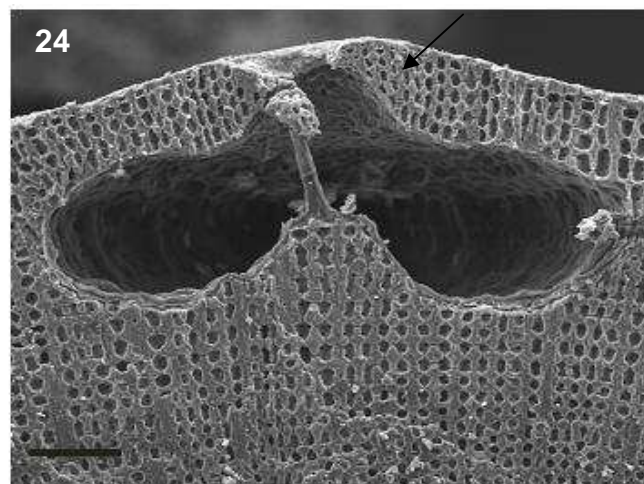
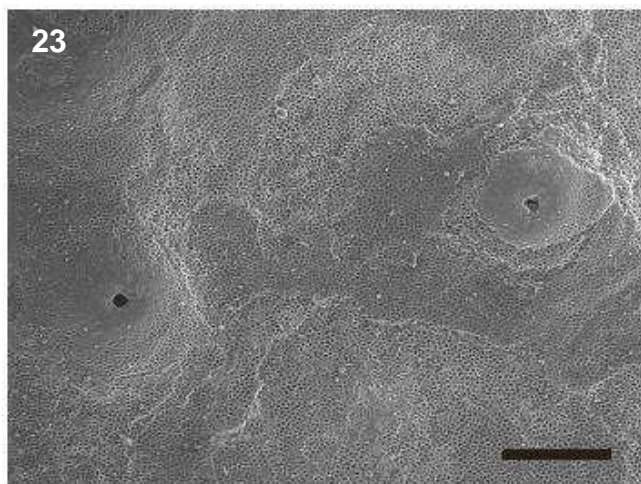
Fig. 20. Secção transversal mostrando células epiteliais achatadas (seta). Barra da escala = 10 μm .

Fig. 21. Fratura transversal mostrando as células do peritalo. Barra da escala = 50 μm .

Fig. 22. Detalhe das conexões intercelulares primárias com células do filamento (ponta de seta) e conexões secundárias com filamentos adjacentes (seta). Barra da escala = 100 μm .

Aspectos reprodutivos

Talos tetrasporofíticos com conceptáculos tetrasporangiais uniporados (fig.22) planos, suavemente elevados e algumas vezes levemente em depressão em relação à superfície do talo. Teto do conceptáculo apresentando 5-7 camadas de células e assoalho localizado de 9-13 células abaixo da superfície do talo, câmara dos conceptáculos tetrasporangiais com 315-345 μm diâmetro e 90-130 μm altura; (figs. 23-24). Columela não-calcificada presente na porção central do conceptáculo (fig. 25), tetrasporângios com 15–33 μm diâmetro e 46–68 μm altura (fig.25) Não foram observados conceptáculos femininos, masculinos e bisporangiais.



Figuras 23-26. Aspectos reprodutivos de *Lithophyllum* sp.1.

Fig. 23. Vista superficial dos conceptáculos uniporados, no mesmo plano do talo à direita e pouco protuberante em relação ao plano do talo à esquerda. Barra da escala = 200 μ m.

Fig. 24. Câmara do conceptáculo tetrasporangial uniporado; canal do poro (seta). Barra da escala = 50 μ m.

Fig. 25. Detalhe do canal do poro, mostrando células delimitando o canal, mas não o ocluindo. Barra da escala = 20 μ m.

Fig. 26. Câmara do conceptáculo tetrasporangial com tetrasporângios zonados (t) e columela central não-calcificada (seta). Barra da escala = 100 μ m.

Distribuição geográfica

Espécie encontrados no litoral sul brasileiro, presente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná.

Materiais examinados

Talos tetrasporofíticos. BRASIL. Santa Catarina: Florianópolis, Ilha do Arvoredo, 27°44'32.83"S e 48°38'74.26"W (Novembro 2009, FLOR14567, FLOR 14567, FLOR 19569; Julho 2010 FLOR14569, FLOR 14578, FLOR 14579), Praia da Ponta das Canas, 27°24'89"S; 48°26'78"W (Novembro 2010, FLOR 14574, FLOR 14575, FLOR 14575), Ilha do Xavier, 27°36'34.48"S e 48°23'13.25"W (Fevereiro 2010); Rio Grande do Sul: Torres, Praia da Guarita, 29°21'63"S; 49°44'98"W (Fevereiro 2010, FLOR14566, FLOR 14573), 2010; Paraná: Pontal do Paraná, Arquipélago de Currais, 25°44'08.62"S e 48°21'58.70"W (Março 2010, FLOR 14572, FLOR 14577).

4.2. Estudo Molecular

Foram geradas neste trabalho um total de 36 sequências a partir dos marcadores UPA, *cox1* e SSU rDNA. Para o marcador UPA foram geradas 17 sequências, para o *cox1* 12 sequências e para o SSU rDNA 7 sequências (Anexo 2, pág. 75).

As sequências geradas foram utilizadas para análises de agrupamento e filogenéticas e para análises de divergência para cada um dos marcadores moleculares conforme descrito abaixo.

Filogenia Molecular

Análises do UPA

Para a matriz do UPA com 18 sequências (370 pb) (Anexo 5, pág. 78) foram geradas e agrupadas em árvores de máxima parcimônia (MP) e de distância (NJ). Uma espécie de *Gracilaria* foi utilizada como grupo externo. A Figura 27 mostra a árvore consenso de distância (NJ), com valores de bootstrap para MP (número acima) e NJ (número abaixo em azul) representados nos ramos.

A árvore mostra dois agrupamentos com alto suporte de bootstrap: um agrupamento monofilético (com valores de bootstrap de 100% para MP e NJ) apresenta as espécies do gênero *Sporolithon* (Sporolithales) coletados no Nordeste do Brasil, e um segundo agrupamento também monofilético compreendendo as espécies de *Lithophyllum* e ainda uma espécie de *Amphiroa*.

Neste segundo, dois agrupamentos são observados: um contendo os indivíduos de *Lithophyllum* sp.1 (Santa Catarina/Rio Grande do Sul) todas agrupadas no mesmo clado fortemente sustentado (98% MP e 100% NJ), sem distinção entre os espécimes de Santa Catarina que formam rodolitos e os espécimes incrustantes de costão (Santa Catarina e Rio Grande do Sul), e um segundo clado contendo os indivíduos de *Lithophyllum margaritae* (Santa Catarina), também agrupado em um clado fortemente sustentado (100% MP e NJ). Além dos dois agrupamentos, neste clado também aparecem as espécies de *Lithophyllum* sp. e *Amphiroa* sp., ambos do Estado da Bahia.

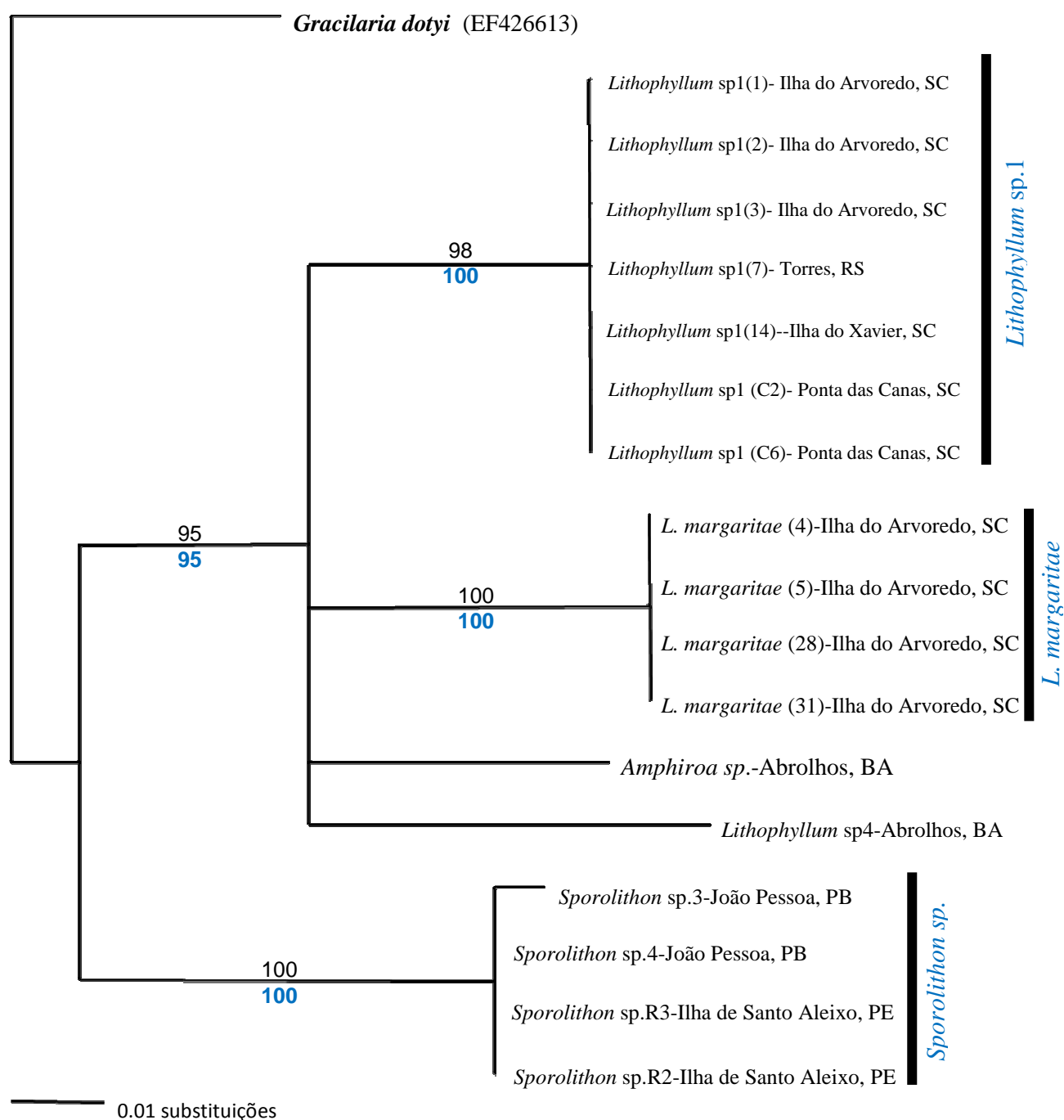


Figura 27. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelo grupo externo *Gracilaria dotyi* construído para as seqüências do UPA. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) referentes às análises de Máxima Parcimônia (MP) e de Neighbor-joining (NJ) estão expressos acima dos ramos em preto, e abaixo dos ramos e em azul, respectivamente. Todas as sequências foram obtidas nesse trabalho, exceto a do grupo externo para a qual o número de acesso no GenBank está entre parênteses. Os ramos sem valor indicado não apresentaram suporte significativo nas análises realizadas.

Análises do *cox1*

Para as análises geradas a partir do gene *cox1* foram montadas duas matrizes distintas, uma com 644 posições e 14 sequências (Anexo 6, pág. 79) para comparação com a árvore gerada para o UPA e uma segunda com 667 posições e 21 sequências (Anexo 7, pág. 80), incluindo sequências retiradas do Genbank e que permite uma comparação mais ampla das sequências geradas neste trabalho com as sequências depositadas no banco.

O filograma consenso gerado para primeira matriz do *cox1*, com 14 táxons (Fig. 28), apresenta topologia semelhante à árvore gerada para a matriz do UPA, com a amostra de *Sporolithon* SP. do NE como táxon irmão do agrupamento contendo as amostras de *Lithophyllum* e *Amphiroa* sp. Este último agrupamento também apresenta uma topologia semelhante a obtida para UPA com a formação de três agrupamentos: um agrupamento com os indivíduos de *Lithophyllum* sp.1 do Sul do Brasil (rodolitos e costão) com alto suporte de bootstrap (100% em MP e NJ); um outro agrupamento fortemente sustentado onde estão agrupados como grupos irmãos *Lithophyllum margaritae* (Santa Catarina) e *Lithophyllum* sp.2 (Paraíba) (100% MP e NJ); e um terceiro agrupamento, mas sem suporte de bootstrap, formado por espécies *Lithophyllum* sp. e *Amphiroa* sp. coletadas no Estado da Bahia, entretanto os espécimes de *Lithophyllum* sp. foram agrupados com alto suporte (100% MP e NJ).

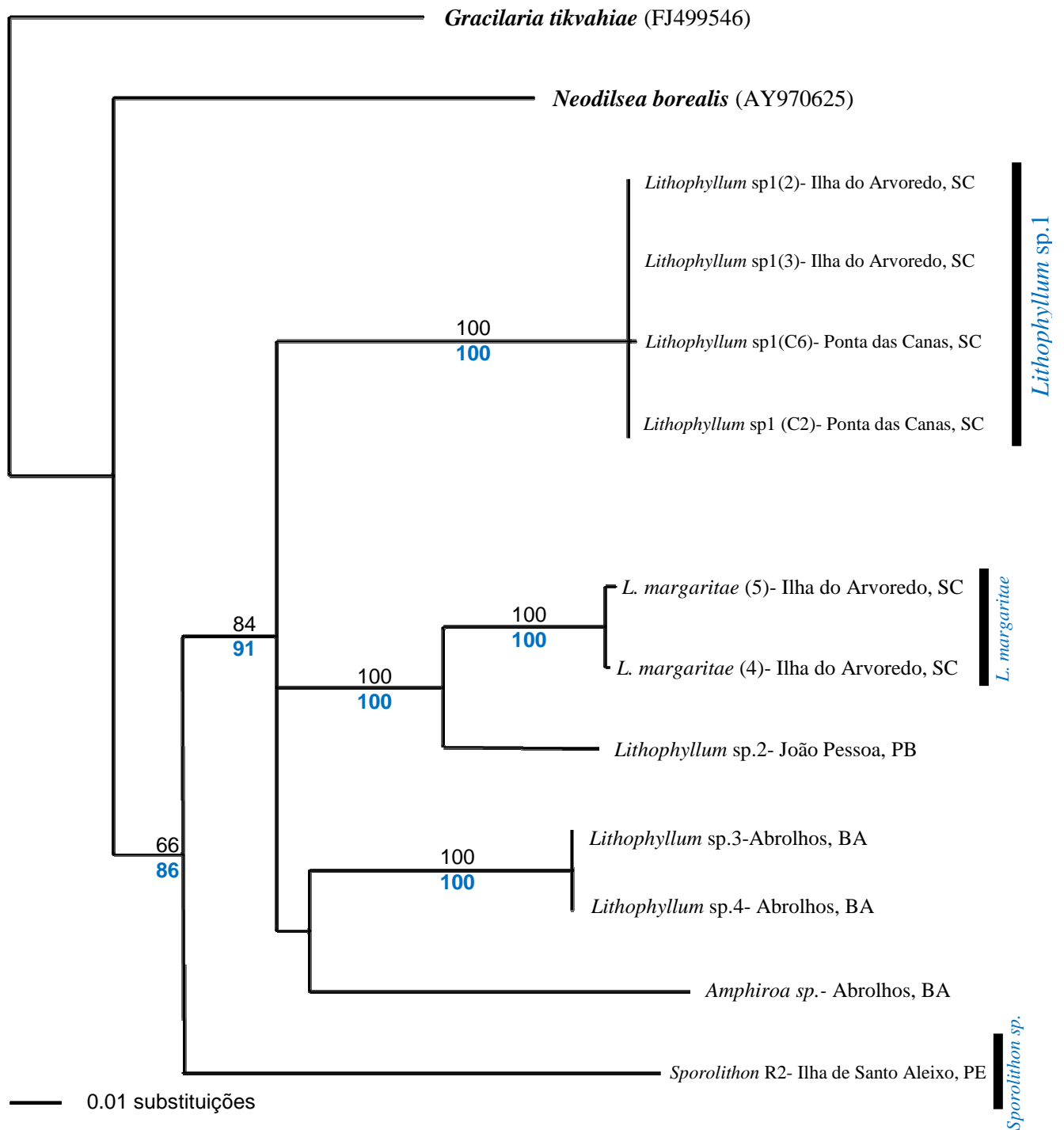


Figura 28. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelos grupos externos *Gracilaria tikvahiae* e *Neodilsea borealis*, construído para o *cox1*. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) referentes às análises de Máxima Parcimônia (MP) e de Neighbor-joining (NJ), estão expressos acima dos ramos em preto, e abaixo dos ramos e em azul, respectivamente. Todas as sequências foram obtidas nesse trabalho, exceto as dos grupos externo, para as quais o número de acesso no GenBank está entre parênteses. Os ramos sem valor indicado não apresentaram suporte significativo nas análises realizadas.

O segundo filograma inclui as análises geradas para o gene *cox1* com a inclusão das sequências disponíveis no Genbank.

Assim como para as análises anteriores, os indivíduos de *Lithophyllum* sp.1 (Santa Catarina) formaram um agrupamento com alto suporte (100% MP e NJ) para os espécimes que formam rodólitos e os espécimes incrustantes de costão.

Lithophyllum margaritae (Santa Catarina) agrupou-se com um espécime de *Lithophyllum* sp.2 do Estado da Paraíba com alto suporte (99% MP e 100% NJ).

As espécies de *Lithophyllum* sp. da Bahia também aparecem em um clado fortemente suportado (100% MP e NJ), separado das espécies de *Lithophyllum* do Sul.

As sequências de Corallinales sp. da Coréia do Sul e Coréia do Norte retiradas do Genbank aparecem agrupadas com alto suporte (100% MP e NJ), sugerindo serem estas de uma mesma espécie. O mesmo se aplica às sequências de Corallinales sp. de Vanuatu (100% MP e NJ).

Como demonstrado no filograma gerado a partir desta matriz (Fig. 29), existe a separação do gênero *Lithophyllum* e demais sequências obtidas no banco, da amostra de *Sporolithon* de Pernambuco, com um suporte moderado (79% MP e 83% NJ) e o que nos confirma que as amostras do Genbank identificadas como “Corallinales sp.” ou “Uncultured Corallinales clone” pertencem mesmo à esta ordem. Analisando a topologia da árvore, é possível ainda destacar que não existem sequências de *cox1* com 100% de identidades em relação às sequências geradas neste trabalho.

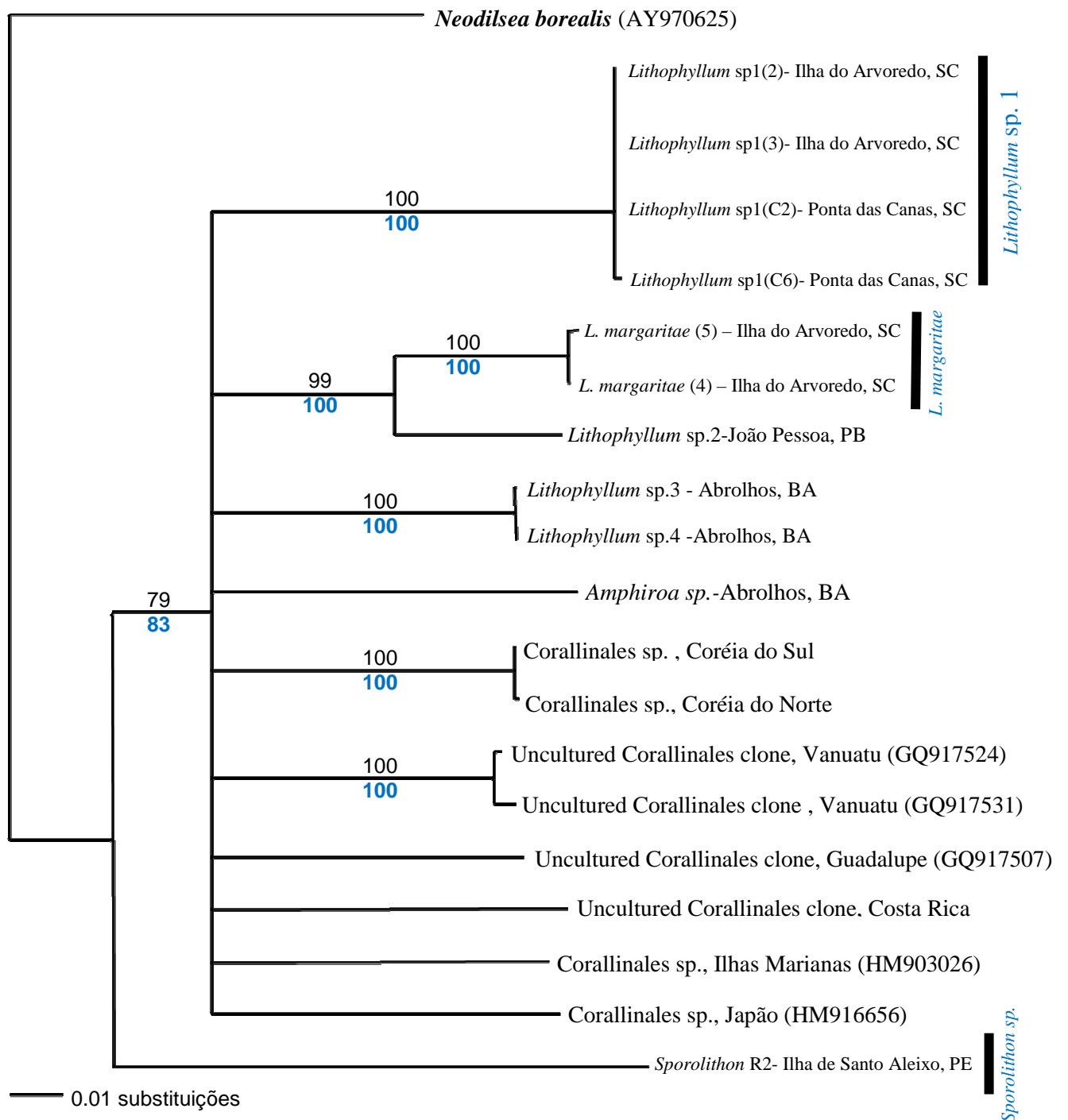


Figura 29. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelo grupo externo *Neodilsea borealis* construído para o *cox1*. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) referentes às análises de Máxima Parcimônia (MP) e de Neighbor-joining (NJ) estão expressos acima dos ramos em preto, e abaixo dos ramos e em azul, respectivamente. O número de acesso para as amostras dos grupos externos e internos obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido do local de coleta (para os espécimes inclusos no grupo interno das análises). Os ramos sem valor indicado não apresentaram suporte significativo nas análises realizadas.

Análises do SSU

A matriz do SSU rDNA (Anexo 8, pág. 81) contou com 16 sequências (1513 pb) e partir desta matriz foram geradas análises de máxima parcimônia (MP), de distância (NJ) e análise Bayesiana. Foram utilizadas sequências de *Mesophyllum* e uma de *Pneophyllum* como grupo externo. O filograma (Fig. 30) gerado a partir das análises de NJ tem expressado nos ramos os valores de bootstrap para MP (número acima) e NJ (número abaixo em azul) e ramos mais espessos representam os valores de probabilidade *a posteriori* (PP) entre 95% e 100%.

Em relação às espécies do Sul do Brasil, as análises geradas através do SSU rDNA apresentam topologia semelhante aos outros dois marcadores, UPA e *cox1*. Os espécimes de *Lithophyllum* sp.1 do Sul, agruparam-se num clado fortemente suportado em todas as análises (100% para MP, NJ e PP).

Igualmente os espécimes identificados como *Lithophyllum margaritae* agruparam-se também em um clado bem suportado em todas as análises (100% para MP, NJ e PP).

A sequência de *Lithophyllum stictaeforme* da Nova Zelândia não se agrupou com os espécimes do sul do Brasil descritos no presente trabalho, mas agrupou-se com *Lithophyllum* sp. também da Nova Zelândia com alto suporte (94% MP, 99% NJ e 100% PP).

Outro agrupamento fortemente suportado é o de *Titanoderma pustulatum* do Reino Unido e *Amphiroa* sp. da Austrália (100% para MP, NJ e PP), o que apesar da distância geográfica, era esperado, já que *Titanoderma* e *Amphiroa* têm reconhecida afinidade filogenética, conforme as análises de Bailey (1999) que utilizou estes espécimes e que também apresentou forte suporte para MP e para Máxima Verossimilhança.

Um outro agrupamento gerado por este marcador foi o de *Lithophyllum incrustans* do Reino Unido e *Lithophyllum insipidum* do Hawaii, porém com um suporte não significativo.

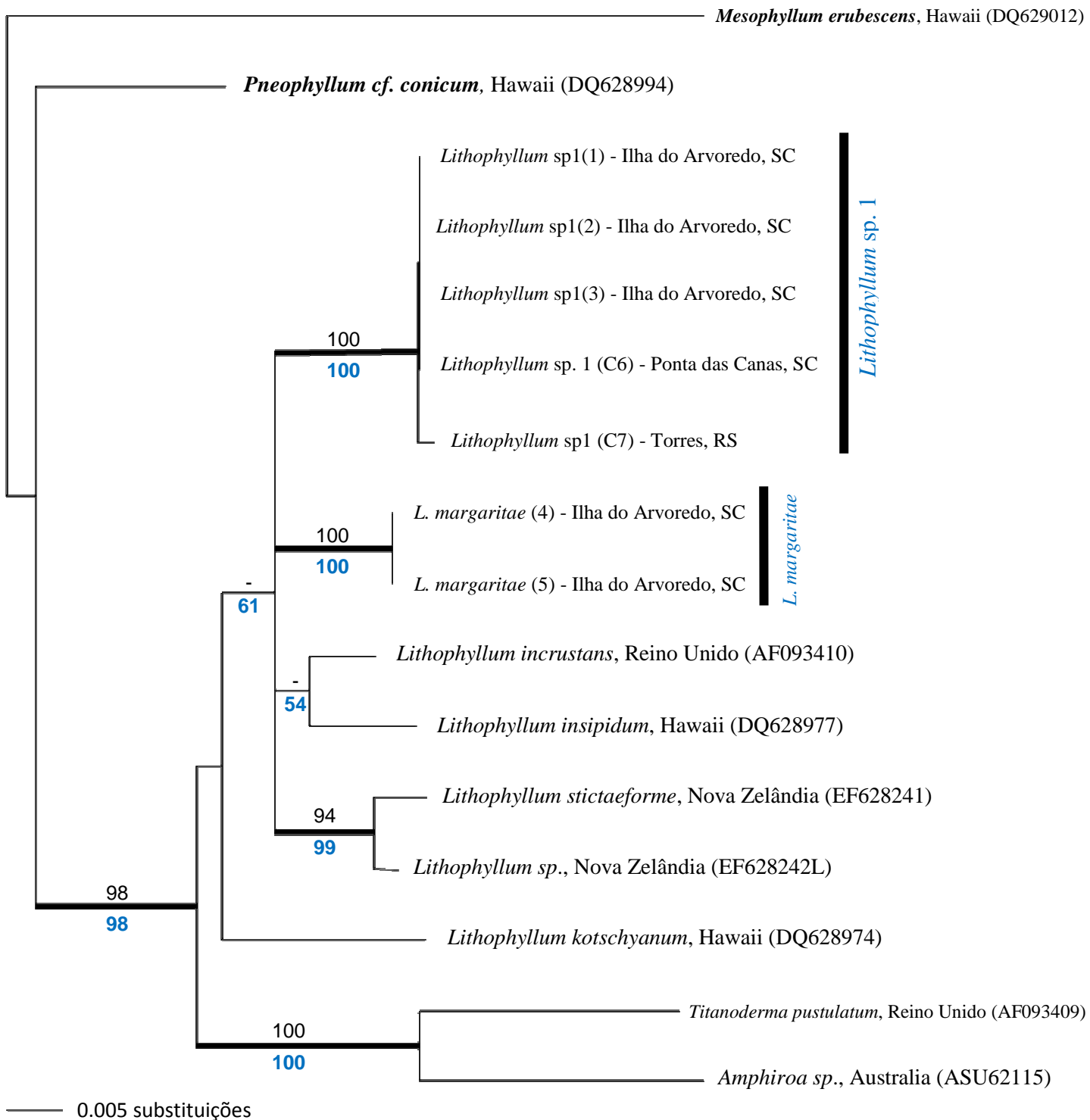


Figura 30. Filograma de Distância (NJ) enraizado pelos grupos externos *Mesophyllum erubescens* e *Pneophyllum cf. conicum*, construído para o SSU rDNA. Os valores de “bootstrap” para “neighbour-joining” (NJ) estão em azul (e abaixo) e para Máxima Parcimônia estão em preto (e acima), ambos para 1000 replicatas. Ramos mais espessos representam valores de probabilidade *a posteriori* entre 95% e 100%. O número de acesso para as amostras obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido pela localidade de coleta. Os ramos sem valor indicado não apresentaram suporte significativo nas análises realizadas.

5. Discussão

A taxonomia das algas pode ser bastante enriquecida com uma abordagem polifásica, levando em consideração não apenas aspectos morfológicos e anatômicos, mas também outros aspectos como distribuição geográfica, fenologia, entre outros. A análise de marcadores moleculares também tem sido fundamental para auxiliar no entendimento da diversidade e relações filogenéticas de diferentes táxons.

As algas calcárias, especialmente as incrustantes, apresentam dificuldades taxonômicas e metodológicas, e neste trabalho buscou-se fazer uma análise para o gênero *Lithophyllum* do Sul do Brasil, que integrasse as observações morfológicas e atômicas com diferentes marcadores moleculares, a fim de solucionar a sobreposição de caracteres diagnósticos morfoantômicos empregados nos estudos deste gênero.

5.1. Aspectos relacionados ao gênero *Lithophyllum*

Quanto a real delimitação do complexo *Lithophyllum/Titanoderma/Pseudolithophyllum*, que não está em questão neste trabalho, o que pudemos constatar é que ainda são necessários estudos mais detalhados da morfologia e biologia molecular dos tipos dos diferentes gêneros para se consolidar uma posição quanto à delimitação destes táxons.

De forma geral, a presença de conceptáculos tetrásporangiais uniporados, conexões secundárias com o filamento adjacente e crescimento monômero e/ou dímero, caracterizam as espécies pertencentes ao gênero *Lithophyllum* (Woelkerling & Campbell 1992, Irvine & Chamberlain 1994). Essas características são apresentadas pelas duas espécies identificadas neste trabalho, e de acordo com as análises para os três marcadores utilizados, os espécimes identificados agruparam-se em clados fortemente ou moderadamente suportados, evidenciando portanto, o claro posicionamento taxonômico das espécies aqui descritas em nível de gênero.

Entretanto, uma vez que poucos são os dados moleculares disponíveis para este gênero, e até mesmo para este grupo em geral, este trabalho pioneiro no Brasil, reforça a necessidade de investimento de esforço na caracterização molecular desse grupo, que se mantém com muitas discussões em aberto.

Considerando as características diagnósticas utilizadas pelas grandes escolas da taxonomia de algas calcárias (sintetizadas no Anexo 4, pág 77), nossos espécimes foram

comparados com táxons semelhantes descritos para o Brasil e para outras partes do mundo (Athanasiadis 1999, Chamberlain 1997, Keats 1997, Mendoza et al. 1996, Riosmena-Rodriguez 1999, Funari et al. 1996, Farr et al. 2009), e as espécies aqui apresentadas aliam características suficientes para confirmar a identificação das mesmas.

Para o Sul do Brasil, foram encontradas apenas duas espécies após estudos morfoanatômicos, e após os estudos moleculares utilizando os marcadores *cox1* e UPA, marcadores estes considerados eficientes na identificação a nível de espécie, confirmou-se a identificação de duas entidades taxonômicas para este gênero no Sul do Brasil.

Inicialmente, levando em consideração a diferença de hábitos de vida dos espécimes coletados (rodolitos e formas incrustantes nos costões), a sobreposição de caracteres diagnósticos encontrados na morfoanatomia e ausência de espécimes gametofíticos, acreditávamos que possivelmente haveria um número maior de espécies, além das que haviam sido identificadas através da morfoanatomia. Entretanto, os dados moleculares obtidos neste trabalho mostraram a ocorrência de apenas duas espécies de *Lithophyllum* para a região estudada. Analisando a distribuição conhecida e o número de espécies listadas para o Caribe (6 spp. - Taylor 1960, Littler & Littler 2000) e Espírito Santo (5 spp. - Villas Boas et al. 2009), uma possível explicação para essa baixa diversidade do gênero no Sul do Brasil seria um declínio da diversidade proporcional à distância dos trópicos (aumento da latitude), tratando-se de táxons de origem tropical.

De maneira geral, estudos de biogeografia demonstram menor diversidade de espécies em locais de clima temperado, sendo este um dos fatores limitantes da distribuição de algumas espécies (Lüning 1990). Entretanto, outros autores enfatizam o cuidado que deve ser tomado ao discutir a biogeografia em macro escala baseado em presença ou ausência de determinada espécie podendo estes dados apresentar padrões errôneos de interpretação (Adey & Steneck 2001).

5.2. *Lithophyllum margaritae*

As características consideradas diagnósticas para o gênero *Lithophyllum* e para a espécie *Lithophyllum margaritae* corroboram com os resultados obtidos no estudo de Riosmena-Rodriguez et al. (1999), onde as características morfológicas e anatômicas da população dos referidos táxons do Golfo da Califórnia muito se assemelha com as características observadas nos espécimes analisados no presente estudo (Tabela 4).

Lithophyllum margaritae, assim como destacado por Riosmena-Rodriguez et al. (1999) se distingue das demais espécies do gênero, principalmente, por apresentar columela central calcificada, e em alguns espécimes do litoral brasileiro assim como o que é observado para espécie no Golfo da Califórnia (Riosmena-Rodriguez 2011, comentário pessoal) chega até mesmo a se projetar para dentro do canal do poro, mas nunca ocluindo o poro.

Das espécies descritas em literaturas recentes, *Lithophyllum margaritae* se assemelha com a espécie *Lithophyllum incrustans* por ambas apresentarem columela central calcificada (Chamberlain et al. 1991), entretanto é possível diferenciar uma da outra por *Lithophyllum margaritae* apresentar organização monômera nas porções mais antigas do talo, enquanto que em *Lithophyllum incrustans* a organização do talo é estritamente dímera (Athnasiadis 1999). Diferente de *Lithophyllum incrustans*, que apresenta as células da parede dos poros dos conceptáculos tetrasporangias e bisporangiais crescendo perpendicularmente à superfície da crosta (Irvine & Chamberlain 1994), os espécimes do Sul do Brasil apresentam estas células projetadas para o interior do canal do poro ou crescendo paralelo a este canal. Ainda é possível distinguir as duas espécies pelo número de células do teto do conceptáculo, que em *L. incrustans* é de 6-17 e em *Lithophyllum margaritae* é de 4 células (Athnasiadis 1999).

A espécie *Lithophyllum orbiculatum* (Foslie) Foslie, descrita para as Ilhas Britânicas muito se assemelha com *Lithophyllum inscrustans*, entretanto apresenta diferença significativa em relação à *Lithophyllum margaritae* por não apresentar columelas calcificadas nos conceptáculos tetrasporangiais (Chaberlain et al. 1991, Irvine & Chamberlain 1994), característica esta que é diagnóstica para *Lithophyllum margaritae*.

Lithophyllum corallinae, espécie que muito se assemelha com *Lithophyllum margaritae* pelas dimensões dos conceptáculos tetrasporangias, também se difere dos espécimes analisados pela profundidade do assoalho da câmara dos conceptáculos, que em

Lithophyllum corallinae é de até 7 células e em nos espécimes do Sul do Brasil é de até 14 células (Harvey et al. 2009, pág. 89, fig. 12.2; Villas-Boas et al. 2009, pág. 239, fig. 3).

Lithophyllum margaritae também é semelhante morfológicamente com *Lithophyllum insipidum*, no entanto a separação das duas espécies é evidenciada através das dimensões dos conceptáculos tetrasporangiais (Keats 1997, pág. 354, fig. 13) e também através da análise molecular para o marcador SSU, que coloca estes táxons em clados diferentes.

Das espécies descritas para o litoral brasileiro observam-se algumas semelhanças entre *Lithophyllum depressum*, descrito para o estado do Espírito Santo, com o material do sul do Brasil. Considerando diferentes aspectos morfoanatômicos (Villas-Boas et al. 2009), podemos diferenciar estas duas espécies pelas dimensões dos conceptáculos tetrasporangiais e número de células do filamento do teto do conceptáculo que em *Lithophyllum depressum* são maiores em relação as dimensões e número de células observadas para *Lithophyllum margaritae*. Com relação a depressão na região poro, observada eventualmente em alguns espécimes de *Lithophyllum margaritae*, destacamos que esta não é uma característica que foi encontrada para *Lithophyllum margaritae* do Golfo da Califórnia (Riosmena-Rodriguez 1999), o que nos sugere se tratar de um possível artefato de técnica.

Do ponto de vista morfológico e anatômico, a presente espécie apresenta diferenças significativas em relação à *Lithophyllum* sp.1 por apresentar células epiteliais sutilmente menores, conceptáculos tetrasporangiais sistematicamente menores e filamentos do teto com menor número de células. A confirmação da clara separação destes táxons foi possível através da caracterização molecular dos referidos táxons, que agruparam-se em clados diferentes, e ambos fortemente suportados por todas as análises, em todos os marcadores utilizados.

Em relação às demais espécies descritas para o Atlântico tropical e subtropical (Taylor 1960, pag. 390 e 391) suas diagnoses em boa parte estão baseadas em características morfológicas, o que dificulta comparações consistentes com o táxon em questão.

No golfo da Califórnia *Lithophyllum margaritae* está amplamente distribuída entre 1-50 m de profundidade, e até o momento o limite sul de distribuição era desconhecido (Riosmena-Rodriguez et al. 1999), com o presente estudo, constatamos que o limite de distribuição sul no Atlântico é então, a Ilha do Arvoredo – Santa Catarina, visto que esta espécie não foi encontrada até o momento no estado do Rio Grande do Sul.

No Brasil, a espécie foi citada por Horta (2000) para os estados de São Paulo e Santa Catarina e por Rocha et al. (2006) para Santa Catarina.

O presente estudo apresenta fortes evidências que confirmam a ocorrência da referida espécie no litoral de Santa Catarina, porém como não obtivemos sequências de espécimes da localidade do tipo (Golfo do México) para incluir em nossa análise molecular, é importante que comparemos as sequências das amostras obtidas neste trabalho com sequências de material proveniente da localidade tipo para reforçar a presente identificação.

Tabela 4. Resumo das características diagnósticas de *Lithophyllum margaritae* encontradas no Brasil e na população do Golfo da Califórnia.

	Presente estudo (Sul do Brasil)	Riosmena-Rodriguez <i>et al.</i> 1999 (Golfo da Califórnia- México)
Altura das células epiteliais	1,5 - 5 μm	2 - 4 μm
Diâmetro das células epiteliais	5-13 μm	6 –10 μm
Altura das células do peritalo	7-16 μm	6 - 18 μm
Diâmetro das células do peritalo	3-10 μm	5 – 10 μm
Diâmetro interno da câmara do conceptáculo	180 – 260 μm	150- 450 μm
Altura da câmara conceptáculo	70 – 95 μm	50 – 150 μm
Número de células de espessura do teto do conceptáculo	3-5	3-4
Profundidade da câmara em nº de células	10-14	11-12

5.3. *Lithophyllum* sp.1

Lithophyllum sp.1 foi encontrada nos três estados do Sul do Brasil e considerando particularidades morfoanatômicas e moleculares, se apresenta como endêmica da região até o presente momento. Esta espécie difere das espécies das demais por apresentar a seguinte combinação de características (i) câmara dos conceptáculos tetrasporangiais com 9-13 células de profundidade (da célula epitelial até a base do conceptáculo) e (ii) dimensões dos conceptáculos tetrasporangiais com 315-345 µm de diâmetro e 90-130 µm de altura.

Considerando as espécies descritas utilizando métodos e as bases nomenclaturais modernas, *Lithophyllum* sp.1 (315-345 µm de diâmetro) difere da espécie *Lithophyllum insipidum* (200-220 µm de diâmetro), por apresentar dimensões dos conceptáculos tetrasporangiais maiores, além disto, as espécies estão claramente separadas pelos dados moleculares obtidos para o SSU rDNA.

Diferente de *Lithophyllum incrustans*, que apresenta as células da parede dos poros dos conceptáculos tetrasporangiais e bisporangiais crescendo perpendicularmente à superfície da crosta (Irvine & Chamberlain 1994), os espécimes do Sul do Brasil apresentam estas células projetadas para o interior do canal do poro sem, entretanto, ocluir o canal. Ainda é possível distinguir as duas espécies pelo número de células do teto do conceptáculo, que em *Lithophyllum incrustans* é de 6-17 e em *Lithophyllum* sp.1 é de 5-7 células.

Lithophyllum sp.1 também apresenta semelhanças com *Lithophyllum acrocamptum* Heydrich (Chamberlain 1996, como *Lithophyllum incrassatum* (Foslie) Foslie) espécie referida para o Sul da África, quanto à anatomia de aspectos vegetativos e à forma e dimensões dos conceptáculos tetrasporangiais. No entanto, *Lithophyllum acrocamptum* possui o canal do poro mais curto e estreito, enquanto *Lithophyllum* sp.1 possui o canal do poro mais longo na porção da base e mais cônico. Outra característica que diferencia estas duas espécies é o número de células do filamento do teto do conceptáculo, que em *Lithophyllum acrocamptum* é de 3-5 células, enquanto que *Lithophyllum* sp.1 possui de 5-7 células.

Lithophyllum orbiculatum, espécie descrita para as Ilhas Britânicas diferente de *Lithophyllum* sp.1, Foslie apresenta os conceptáculos tetrasporangiais e bisporangiais restritos à superfície da crosta (Irvine & Chamberlain 1994), enquanto que em *Lithophyllum* sp.1 por vezes foram encontrados conceptáculos enterrados nas partes mais velhas do talo.

A espécie *Lithophyllum kotschyianum* Unger apresenta ampla distribuição em todo o Indo-Pacífico tropical e pode ser diferenciada dos espécimes do Sul do Brasil por apresentar conceptáculos tetrasporangiais com câmaras mais altas, assoalho mais profundo e teto com um maior número de camadas de células (Verheij 1994), esta separação é corroborada também pela análise filogenética para o SSU rDNA apresentada neste trabalho que separa claramente as duas espécies em diferentes clados.

Considerando as espécies até então descritas para o litoral brasileiro, *Lithophyllum stictaeforme* é uma das que mais se aproxima da espécie em questão. Este táxon apresenta distribuição ampla no mundo, estando presente em regiões tropicais e temperadas. Sua ocorrência foi registrada para o Sul e Sudeste da Austrália (Woelkerling & Campbell 1992 - como *Lithophyllum bermudense* Foslie & M.A.Howes; Woelkerling 1996 - como *Lithophyllum frondosum* (Dufour) G.Furnari, Cormaci & Alongi; Ringeltaube & Harvey 2000 - como *Lithophyllum frondosum*; Harvey et al. 2009), Nova Zelândia (Harvey et al. 2005), Mediterrâneo (Athanasiadis 1999; Furnari et al. 1996 - como *Lithophyllum frondosum*); México (Fragoso & Rodríguez 2002 - como *Lithophyllum frondosum*); e Nordeste e Sudeste do Brasil (Nunes et al. 2008; Villas-Boas et al. 2009).

Lithophyllum stictaeforme é delimitado para o Mediterrâneo por apresentar hipotalo monostromático com uma camada de filamentos expandindo radialmente (Athanasiadis 1999, página 738, fig. 3), compostos de células rombóides ou retangulares nas células do hipotalo. Cada célula do hipotalo origina um único filamento ascendente ao peritalo e cada filamento deste, é conectado ao filamento adjacente por conexões secundárias que não se alinham à camada da superfície do crescimento indicando um crescimento não-coaxial, característica esta que a distingue dos espécimes analisados neste estudo já que tanto nas porções mais antigas do talo, quanto na margem de crescimento foi observada organização estritamente monômera nos espécimes do Sul do Brasil. Em relação ao conceptáculo, este autor descreveu dimensões internas da câmara de até 475µm, que são maiores que as apresentadas nos espécimes analisados neste estudo (até 345 µm). Outra informação que difere as duas espécies é o número de células do assoalho da câmara do conceptáculo até a célula epitelial, que em *Lithophyllum stictaeforme* do Mediterrâneo é de 16-17 células (Athanasiadis 1999, pág. 739, fig.9) e em *Lithophyllum* sp.1 é de 9-13 células.

Com relação à *Lithophyllum stictaeforme* identificado para Nova Zelândia e Austrália (Harvey et al. 2005, Harvey et al. 2009, Farr et al. 2009), estes apresentam diferenças significativas com o material do Sul do Brasil. A descrição dessa espécie para a região

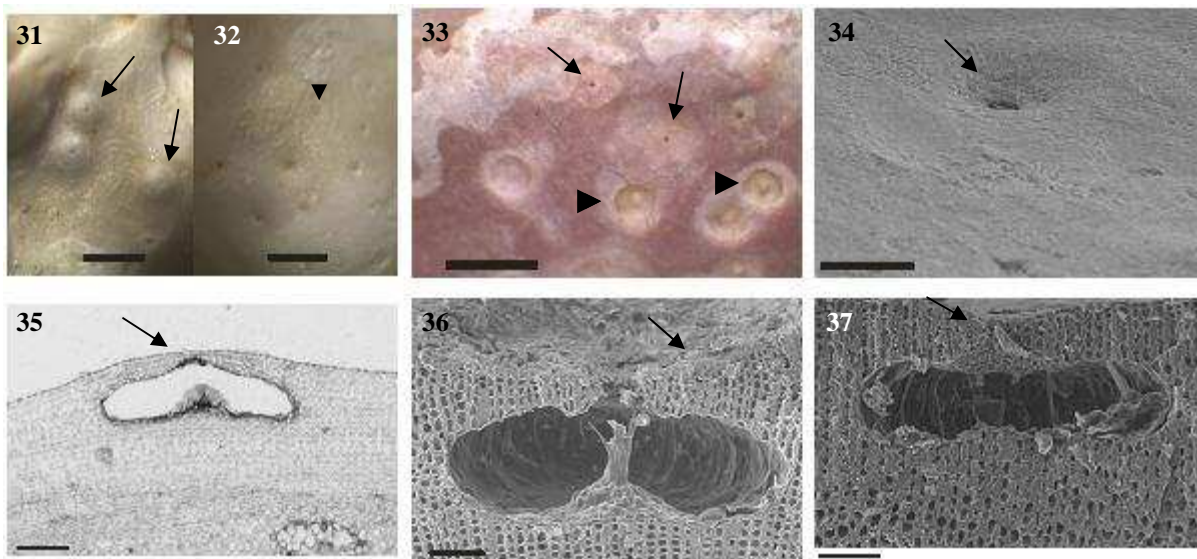
norte e central da Nova Zelândia (Harvey et al. 2005) apresenta uma grande diferença em relação ao diâmetro das câmaras dos conceptáculos tetrasporangiais, 290-420 (450) µm e 290 -450 µm, respectivamente, enquanto que *Lithophyllum* sp.1 é consideravelmente menor ((295)315-345 µm). Para a Austrália (Harvey et al. 2009) a principal característica que diferencia *Lithophyllum* sp.1 dos espécimes identificados como *Lithophyllum stictaeforme* é o número de células de profundidade da câmara do conceptáculo tetrasporangial que é maior (12-17) em relação à *Lithophyllum* sp.1.

Confirmando os dados obtidos através das comparações morfonatômicas, as sequências para o gene SSU rDNA das amostras de *Lithophyllum stictaeforme* apresentaram 39 a 45 (2,6%) nucleotídeos de divergência com as sequências de *Lithophyllum* sp.1. No entanto, vale destacar que Athanasiadis (2010, comentário pessoal) acredita que as espécies identificadas como *Lithophyllum stictaeforme* da Nova Zelândia e Austrália não seriam coespecíficas com a espécie que ocorre no Mediterrâneo. Segundo este pesquisador, esta espécie não ocorre nem mesmo em Ilhas relativamente próximas (e.g. Ilhas Canárias) da localidade tipo, o que sugere que a distribuição desta espécie seja restrita ao Mar Mediterrâneo .

Considerando ainda os espécimes identificados como *Lithophyllum stictaeforme* para o litoral Brasileiro (Nunes et al. 2008, Villas-Boas et al. 2009), a proximidade geográfica e algumas semelhanças anatômicas (Tabela 5) é recomendável que sequências provenientes de espécimes das localidades originais destas populações sejam incluídas nas discussões da delimitação das espécies para se verificar semelhanças ou divergências genéticas entre as referidas populações.

O espécime tipo de *Lithophyllum depressum* foi analisado neste trabalho por ter apresentado anatomia semelhante aos espécimes do Sul do Brasil. A análise do material (Holótipo, BR 454263, amostras de 1-4) revelou que a característica considerada diagnóstica, o teto do conceptáculo tetrasporangial afundado em relação à superfície do talo, é variável. Em vista superficial observam-se conceptáculos, tanto com os tetos em depressão, quanto planos ou mesmo elevados em relação à superfície (Figs. 31 e 32). Essa característica também foi observada em alguns dos espécimes analisados neste trabalho tanto em *Lithophyllum margaritae* quanto em *Lithophyllum* sp.1 (Figs. 33 e 34). Em cortes e fraturas transversais na região sagital dos conceptáculos, foi possível verificar que em *Lithophyllum depressum* são encontrados conceptáculos com teto elevado ou plano em relação à superfície do talo adjacente (fig. 35) e também foi possível observar que

Lithophyllum sp.1 e *Lithophyllum margaritae* compartilham eventualmente a característica do teto em depressão, sugerindo ser este um caracter plástico, que ocorre em diferentes espécies, sendo possivelmente reflexo do envelhecimento da estrutura ou de artefato de técnicas utilizadas, como, por exemplo, no processo de desidratação do material para análises em microscopia ótica e de varredura. Uma explicação adicional para esta característica aparecer em espécies do gênero seria o sobrecrecimento das células iniciais acima do conceptáculo, razão pela qual muitas espécies deste gênero apresentam conceptáculos senescentes enterrados nas porções mais antigas do talo.



Figuras 31-37. Ocorrência de teto em depressão nos espécimes de *Lithophyllum depressum*, *Lithophyllum* sp.1 e *Lithophyllum margaritae*.

Fig. 31. Superfície do talo de *Lithophyllum depressum* (BR 454263), evidenciando conceptáculos elevados (setas). Barra da escala = 600 μ m.

Fig. 32. Superfície do talo de *Lithophyllum depressum* (BR 454263), evidenciando conceptáculos em depressão (ponta de seta). Barra da escala = 600 μ m.

Fig. 33. Superfície do talo de *Lithophyllum* sp.1, evidenciando conceptáculos planos (setas) e em depressão (ponta setas). Barra da escala = 1mm.

Fig. 34. Superfície do talo de *Lithophyllum margaritae*, evidenciando conceptáculo em depressão (seta). Barra da escala = 100 μ m.

Fig. 35. Secção transversal de conceptáculo de *Lithophyllum depressum* (BR 454263), evidenciando conceptáculo elevado em relação a superfície do talo (seta). Barra da escala = 100 μ m.

Fig. 36. Fratura transversal de conceptáculo de *Lithophyllum* sp.1, evidenciando conceptáculo elevado em depressão em relação a superfície do talo (seta). Barra da escala = 50 μ m.

Fig. 37. Fratura transversal de conceptáculo de *Lithophyllum margaritae*, evidenciando conceptáculo elevado em depressão em relação a superfície do talo (seta). Barra da escala = 50 μ m.

Com relação às outras espécies descritas para o Atlântico tropical e subtropical (Taylor 1960, pag. 390 e 391) a diagnose de boa parte das espécies até então descritas está baseada em características morfológicas, o que dificulta comparações consistentes com o táxon em questão.

Tabela 5. Comparação de *Lithophyllum* sp.1 com populações de *Lithophyllum stictaeforme*.

	Presente estudo <i>Lithophyllum</i> sp.1 (Sul do Brasil)	Funari <i>et al.</i> 1996 <i>L. stictaeforme</i> (Mediterrâneo- como <i>L. frondosum</i>)	Athanasiadis 1999 <i>L. stictaeforme</i> (Mediterrâneo)	Harvey <i>et al.</i> 2005 <i>L. stictaeforme</i> (Nova Zelândia)	Harvey <i>et al.</i> 2009 Farr <i>et al.</i> 2009 <i>L. stictaeforme</i> (Austrália)	Nunes <i>et al.</i> 2008 <i>L. stictaeforme</i> (Nordeste-Brasil)	Villas-Boas <i>et al.</i> 2009 <i>L. stictaeforme</i> (Sudeste-Brasil)
Altura das células epiteliais	(2,5)3-6 µm	4-8 µm	-	-	3-6 µm	2-3 µm	8-12 µm
Diâmetro das células epiteliais	6-11 µm	10-16 µm	-	-	4-11 µm	5-9 µm	5-8 µm
Altura das células do peritalo	8-17 µm	15-45 µm	10-24	-	8-35 µm	-	20-22 µm
Diâmetro das células do peritalo	5,5-11 µm	10-20 µm	12-17	-	11-20 µm	-	9-13 µm
Diâmetro interno da câmara do conceptáculo	(295)315-345 µm	200-450 µm	375-475 µm	290-420(50) µm	(230)260-390 µm	202-262 µm	220-230(295)µm
Altura da câmara conceptáculo	(75)90-130 µm	Até 120 µm	100-175 µm	(65)90-125(160)	(55)75-110 µm	105-180 µm	125-135 µm
Número de células de espessura do teto do conceptáculo	4-7	5-9	5-10	3-6	(3)4-6	5-7	3-7
Posição do assoalho da câmara do conceptáculo (nº de células)	9-13	10-19	16-17	>6	-	11-13	6-10

5.4. Divergência entre as sequências dos marcadores estudados

A comparação da variação entre as sequências do UPA, *cox1* e SSU rDNA está sumarizada na Tabela 6, e as informações complementares estão nos Anexos 5, 6, 7 e 8 (págs. 78, 79, 80 e 81).

Tabela 6. Variação da % de divergência entre as sequências dos marcadores estudados.

	UPA	<i>cox1</i>	SSU
Interespecífica	6,8% (25 pb)	13,2-18,4% (87 a 89 pb)	1-2,8% (15 a 54 pb)
Intraespecífica	0 pb	0,2-0,4% (1 a 3 pb)	0-0,4% (0 a 6 pb)

As sequências obtidas para o UPA mostraram a existência de dois agrupamentos diferentes de *Lithophyllum* para o Sul do Brasil, indicando assim a existência de 2 entidades taxonômicas diferentes para este gênero com divergências interespecíficas de 25 pb (6,8%).

As sequências obtidas para o marcador *cox1* corroboram com os resultados apresentados pelo marcador UPA. Para o *cox1*, os mesmos dois agrupamentos foram observados, porém as divergências interespecíficas foram relativamente mais alta que para o marcador UPA, apresentando divergências de 87 a 89 pb (13,2% a 18,4%).

Essa variação interespecífica apresentada pelo *cox1* de 13,6% em um total de 664 posições está no limite da faixa de amplitude de variação verificada por Saunders (2005) para as Gigartinales e Rhodymeniales (4,5 a 13,6% de divergência, 30 a 90 pb) em um total de 664 posições também. Para a ordem Corallinales, Robba *et al.* (2006) também encontraram 90 pb divergentes entre *Corallina elongata* J. Ellis *et Solander* e *C. officinalis* Linnaeus e este foi o único gênero da ordem com mais de uma espécie representada na análise destes autores. Para as Gracilariales, Yang *et al.* (2007) reportaram uma variação maior (3,2-16,1% - 41 a 201 pb) entre espécies de *Gracilaria* para um total de 1245 posições.

Ainda em comparação com as sequências do UPA, o *cox1* foi também mais variável em nível intraespecífico. Este marcador apresentou divergências intraespecíficas de 1 pb (0,2%) para *Lithophyllum* sp.1 e 3pb (0,4%) para *Lithophyllum margaritae*, ao passo que o marcador UPA não apresentou divergências intraespecíficas para as espécies do Sul do Brasil.

Os resultados obtidos com o *cox1* corroboram com os verificados por Geraldino *et al.* (2006), Robba *et al.* (2006) e Yang *et al.* (2007) para diferentes ordens de Rhodophyta (Bangiales, Corallinales, Gigartinales, Gracilariales e Rhodymeniales). As sequências do *cox1* foram mais variáveis em nível inter e intraespecífico do que as dos demais marcadores. Maior

variação entre sequências do *cox1* é esperada, uma vez que o genoma mitocondrial apresenta taxas maiores de mutação no DNA do que o genoma do cloroplasto, além disso o UPA é uma região do gene que codifica a subunidade grande do RNA ribossomal do cloroplasto, um gene que de modo geral é apresenta menos variações (Avice 1994). Autores como Robba et al. (2006) e Saunders (2005), demonstraram que o *cox1* foi um marcador acurado para revelar especiação incipiente e diversidade críptica devido às diferenças nas taxas de mutação entre os marcadores, e nossos resultados corroboram com os destes autores.

Semelhante aos resultados encontrados neste estudo, Conklin et al. (2009) em seu estudo sobre os gêneros *Euchema* e *Kappaphycus* do Hawaii, assim como Sherwood et al. (2008) para a gênero de água doce *Batrachospermum helminthosum* Sirodot, encontraram diferentes resoluções genéticas entre esses dois marcadores, entretanto esses autores sugerem que o marcador UPA não seriam apropriados para distinguir espécies proximamente relacionadas. Neste trabalho os dois marcadores, *cox1* e UPA, se mostraram eficientes na separação das duas espécies estudadas.

Já em relação ao marcador SSU rDNA, gene nuclear e, portanto mais conservado, a variação interespecífica foi de 27 a 33 pb (1,8% - 2,2%) entre as duas espécies do Sul do Brasil e 15 a 54 pb (1% - 2,8%) em relação à todas as amostras de *Lithophyllum* utilizadas na análise. A faixa de variação observada neste trabalho condiz com o observado por Bailey (1999) em outros gêneros da ordem Corallinales (0,5% a 3,6%).

A menor variação desse gene em relação aos outros marcadores, já era esperada, uma vez que os genes ribossomais estão entre os mais conservados e é pouco informativa quanto à identificação de espécies próximas e, portanto neste trabalho o marcador foi utilizado para investigar as relações filogenéticas entre as espécies do Sul do Brasil e as demais espécies de *Lithophyllum* disponíveis no Genbank.

5.5. Análise crítica das metodologias utilizadas

As metodologias empregadas para estudos morfoanatômicos em algas calcárias têm sofrido significativas modificações ao longo do tempo, conforme já exposto anteriormente na introdução. Analisando metodologias utilizadas nos últimos 50 anos, é possível observar diferenças na forma de descalcificação, desidratação e inclusão dessas algas o que dificulta a comparação morfométrica, visto que distorções nas medidas podem ocorrer de acordo com a variação destas metodologias, o que possivelmente resulta na sobreposição de caracteres diagnósticos, observada com frequência na literatura.

A utilização de microscopia eletrônica aliada a caracteres moleculares demonstra ser uma metodologia eficaz e passível de padronização no estudo da taxonomia das algas calcárias não articuladas. A utilização desta técnica de microscopia minimiza as distorções, visto que a preparação da amostra não necessita de pré-tratamentos que alteram a composição estrutural do talo. Entretanto, é importante aliar a esta técnica, a microscopia óptica que possibilita a visualização de caracteres morfoanatômicos diagnósticos não calcificados, como por exemplo, a columela central que em algumas espécies é mucilaginososa e, portanto, não é possível observar no microscópio eletrônico de varredura.

Quanto à metodologia empregada para o estudo molecular, optou-se por utilizar as metodologias de extração, PCR, purificação e sequenciamento mais usuais para algas.

Entretanto diante as dificuldades encontradas durante este estudo, ficou claro que para este grupo, serão necessários alguns testes quanto à metodologia de extração, “primers”, e até mesmo ciclos da PCR. Isso fica evidente quando analisamos a tabela do Anexo 2 (pág. 75), e constata-se as poucas amostras para as quais tivemos sucesso com a amplificação do *cox1*. A concentração de DNA purificado utilizado nas reações de sequenciamento variou de 1,4 a 44,0 ng/μl de DNA, e esta variação sugere ser em função da extração, que em algumas amostras ficou comprometida devido à dificuldade de obtenção de biomassa “viva” e em outras, devido a pouca biomassa coletada.

A biomassa utilizada neste trabalho foi quase que uniforme, variou de 150 a 200 mg. Para alguns espécimes foi possível selecionar apenas fragmentos com partes da superfície dos rodolitos (parte viva) para os quais foram obtidas concentrações de DNA suficiente para o sequenciamento das amostras, entretanto para os espécimes em que partes mais antigas do talo foram utilizadas a concentração de DNA foi muito baixa. Para corroborar com essa informação, as amostras incrustantes (coletados nos costões) foram os que apresentaram maior

concentração de DNA em ng/μl. A biomassa de incrustada é em sua maior parte “viva”, com poucas partes antigas. Em contrapartida, a dificuldade encontrada com as amostras dos costões foi outra, a obtenção de quantidade de biomassa, que dada a camada muito fina desses espécimes, a dificuldade de coleta e a maior chance de contaminação, quase sempre foi toda retirada, impossibilitando uma posterior re-extração caso fosse necessária, como no caso das amostras de Torres.

Para o marcador UPA, a concentração de DNA purificado variou de 5,2 a 18,9 ng/μl, também uma baixa concentração, porém para este marcador não encontramos dificuldade de amplificação. Isso enfatiza que o UPA, embora menos variável, é um marcador com primers mais universais e são mais fáceis de amplificar do que os do *cox1* e, portanto, se mostrou um marcador mais eficiente do ponto de vista prático.

Analisando a metodologia empregada por outros pesquisadores que vêm trabalhando com a biologia molecular das algas calcárias, outro detalhe que não foi testado neste trabalho e merece atenção para os próximos trabalhos é a reamplificação em do produto da PCR, a exemplo de Harvey (2003), que para aumentar a quantidade de DNA da região de interesse (SSU rDNA), utilizou de 7-15 μl de produto da PCR para reamplificá-lo nas mesmas condições que na primeira PCR.

Além disto, existem outras particularidades nos trabalhos publicados com algas calcárias, o que ressalta a necessidade de testar os diferentes protocolos com adaptações já publicadas, e ainda pensar em algumas alternativas utilizadas em outros grupos de algas (por exemplo, *Gracilaria* que possui ficocolóides que atrapalham a extração através do kit de extração), para desta forma minimizar as dificuldades encontradas neste trabalho.

6. Conclusões

- O estudo morfológico e molecular do gênero *Lithophyllum* permitiu a identificação de duas espécies para a região sul do Brasil: *Lithophyllum Lithophyllum* sp.1 e *Lithophyllum margaritae* (Hariot) Heydrich.
- A utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura foi uma ferramenta importante para a obtenção de imagens de alta resolução que foram definitivas nas identificações aqui apresentadas.
- Os dados obtidos neste estudo representam um avanço na taxonomia das algas calcárias não articuladas no Brasil, sendo pela primeira vez baseada também em características moleculares.
- Os dados moleculares gerados neste trabalho são inéditos para as espécies estudadas.
- Maiores valores de divergências intraespecífica e interespecífica foram obtidos para *cox1*, entretanto a divergência genética obtida para os três marcadores (*cox1*, UPA e SSU rDNA) foi eficiente na separação das entidades taxonômicas identificadas.
- Este trabalho demonstra a importância da caracterização molecular neste grupo de algas, visto que um investimento nesta caracterização poderá trazer grandes contribuições para o conhecimento da sua biodiversidade, distribuição e relações filogenéticas entre as populações de algas calcárias do Brasil e do mundo.

7. Referências

- Adey, W. H.; Chamberlain, Y. M.; Irvine, L. M.** 2005. An SEM-based analysis of the morphology, anatomy, and reproduction of *Lithothamnion tophiforme* (Esper) Unger (Corallinales, Rhodophyta), with a comparative study of associated north Atlantic Arctic/Subarctic Melobesioideae. *Journal of Phycology* 41: 1010-1024.
- Adey, W. H. & Steneck, R. S.** 2001. Thermogeography over time creates biogeographic regions: a temperature/space/time-integrated model and an abundance-weighted test for benthic marine algae. *Journal of Phycology* 37: 677–698.
- 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.
- Avise, J. C.** 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York, 511p.
- Bahia, R. G.; Abrantes, D. P.; Brasileiro, P. S.; Pereira-Filho, G. H.; Amado-Filho, G. M.** 2010. Rhodolith bed structure along a depth gradient on the Northern coast of Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58:323-337.
- Bailey, J. C.** 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanoderma pustulatum* (Coralliaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* 38:208–217.
- Bailey, J. C.; Chapman, R. L.** 1996. Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 1 8S rRNA gene sequence analysis. In: Chaudhary, B. R.; Agrawal, S. B. [Eds.] *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Academic Publishing, Amsterdam. pp.363–76.
- Bailey, J. C.; Chapman, R. L.** 1998. A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *Journal of Phycology* 34:692-705.
- Braga, J. C.** 2003. Application of botanical taxonomy to fossil coralline algae (Corallinales, Rhodophyta). *Acta Micropaleontologica Sinica* 20:47–56.
- Bird, C. J.; Rice, E. L.; Murphy, C. A.; Ragan M. A.** 1992. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia* 31: 510-522.

- 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.
- Broom, J. E.; Jones, W. A.; Hill, D. F.; Knight, G. A.; Nelson, W. A.** 1999. Species recognition in New Zealand *Porphyra* using 18S rDNA sequencing. *Journal of Applied Phycology* 11: 421-428.
- Campbell S. J.; Woelkerling W. J.** 1990. Are *Titanoderma* and *Lithophyllum* (Corallinales, Rhodophyta) distinct genera? *Phycologia* 29:114- 125.
- Chamberlain, Y. M.** 1983. Studies in the Corallinaceae with special reference to *Fosliella* and *Pneophyllum* in the British Isles. *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series*, 11:291-463.
- 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.
- Chamberlain, Y. M.** 1996. Lithophylloid Corallinaceae (Rhodophyta) of the genera *Lithophyllum* and *Titanoderma* from southern Africa. *Phycologia* 35:204–221.
- Chamberlain, Y. M.** 1997. Observations on *Lithophyllum lichenoides* Philippi (Rhodophyta, Corallinaceae) and its reproductive structures. *Cryptogamie Algologie* 18:139–149.
- Conklin, K. Y.; Kurihara, A.; Sherwood, A. R.** 2009. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii. *Journal of Applied Phycology* 21:691–699
- Dawson, E. Y.** 1960. Marine red algae of Pacific Mexico. Part 3. Cryptonemiales, Corallinaceae subf Melobesioideae. *Pacific Naturalist* 2:3-125.
- Farias, J. N.; Riosmena-Rodriguez, 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.
- Farr, T.; Broom, J.; Hart, D.; Neill, K.; Nelson, W.** 2009. Common coralline algae of northern of New Zeland. An identification guide. NIWA Information. Ser. No. 70. Wellington, New Zealand. 125p.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-91.

- Figueiredo, M. A. O.; Steneck, R. S.** 2002. Floristic and ecological studies of crustose coralline algae on Brazil's Abrolhos reefs. In: International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia. pp.493-497.
- Foslie M.** 1909. Algologiske notiser. VI. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* 1909: 1-63.
- Foster, M. S.** 2001. Rhodoliths: between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37:659–667.
- Foster, M. S.; maConnico, L. M.; Ludsten, L.; Wadsworth, T.; Kimball, T.; Brooks, L. B.; Medina-López, M.; Riosmena-Rodriguez, R.; Hernández-Carmona, G.; Vásquez-Elizondo, R. M.; Johnson, S.; Steller, D. L.** 2007. Diversidad e historia natural de una comunidad de *Lithothamnion mulleri* y *Sargassum horridum* em al Golfo de California. *Ciencias Marinas* 33:367-384.
- Fragoso, D.; Rodríguez, D.** 2002. Algas coralinas no geniculadas (Corallinales, Rhodophyta) en el Pacífico tropical Mexicano. Anals del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica 73:97–136.
- Furnari, G.; Cormaci, M.; Alongi, G.** 1996. *Lithophyllum frondosum* (Dufour) comb. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta): the species to which Mediterranean '*Pseudolithophyllum expansum*' should be referred. *European Journal of Phycology* 31:117 -122
- Geraldino, P. J. L.; Yang, E. C.; Boo, S. M.** 2006. Morphology and Molecular Phylogeny of *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea. *Algae* 21:417-423.
- Geraldino, P. J. L.; Yang, E. C.; Kim, M. S.; Boo, S. M.** 2009. Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU, plastid rbcL, and mitochondrial cox1. *Taxon* 58: 606-616.
- Gherardi, D. F. M.** 2004. Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 52: 207-224.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Harvey, A. S.; Woelkerling, W. J.; Millar, A. J. K.** 2002. The Sporolithaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia: Taxonomy and 18S rRNA phylogeny. *Phycologia* 41:207–227.

- Harvey, A. S.; Broadwater, S. T.; Woelkerling W. J.; Mitrovski, P. J.** 2003. Choreonema (CORALLINALES, RHODOPHYTA): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology*, 39:988–998.
- Harvey, A. S.; Woelkerling, W. J.; Farr, T.; Neill K.; Nelson, W.** 2005. Coralline algae of central New Zealand: An identification guide to common “crustose” species. NIWA Info. Ser. No. 57, Wellington, New Zealand. 145p.
- Harvey, A. S.; Woelkerling, W. J.** 2007. Guía para la identificación de rodolitos de algas rojas coralinas no geniculadas (Corallinales, Rhodophyta). *Ciencias Marinas* 33:411–426
- Harvey, A. S.; Woelkerling, W. J.; Millar, J. K.** 2009. The genus *Lithophyllum* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Rhodophyta) in south-eastern Australia, with the description of *L. riosmenae*, sp. nov. *Australian Systematic Botany* 22:296–317.
- Herbert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; deWaard, J. R.** 2003. Biological identifications through DNA barcoding. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 270: 313-322.
- 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. 301p.
- Horta, P. A.; Amancio, C. E.; Coimbra, C. S.; Oliveira, E. C.** 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.
- 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.** 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15:7-44.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. R.** 2001. MrBayes. Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17: 754-5.
- 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.
- Keats, D. W.** 1997. *Lithophyllum insipidum* Adey, Townsend et Boykins and *L. flavescens* sp. nov.: two flat lithophylloid coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) abundant in shallow reef environments in Fiji. *Phycologia* 36:351–365.

- Keats, D. W.; Knight, M. A.; Pueschel, C. M.** 1997. Antifouling effects of epithallial shedding in three crustose coralline algae (Rhodophyta, Corallinales) on a coral reef. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 213:281-293.
- Keats, D. W.; Groener, A.; Chamberlain, Y. M.** 1993. Cell sloughing in the littoral zone coralline alga *Spongites yendoi* (Foslie) Chamberlain (Corallinales, Rhodophyta). *Phycologia* 32:143-150.
- Keats, D. W.; Wilton, P.; Maneveldt, G.** 1994. Ecological significance of deep-layer sloughing in the eulittoral zone coralline alga, *Spongites yendoi* (Foslie) Chamberlain (Corallinales, Rhodophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 175:145-154.
- Konar, B.; Riosmena-Rodriguez, R.; Iken, K.** 2006. Rhodolith bed: A newly discovered habitat in the North Pacific Ocean. *Botanica Marina* 49:355–359.
- Lee, R.E.** 2008. Phycology, 4th edition. Cambridge University Press.
- 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.
- Lemoine, M.** 1909. Essai de classification des Mélobésiées basée sur la structure anatomique. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 57:323-331.
- Littler, M. M.; Littler, D. S.; Blair, S. M.; Norris, J. N.** 1985. Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. *Science* 227:57-59.
- Littler, M. M.; Littler, D. S.; Hanisak, M. D.** 1991. Deepwater rhodolith distribution, productivity, and growth history at sites of formation and subsequent degradation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 150:163–182.
- Littler, D. S. and Littler, M. M.** 2000. *Caribbean Reef Plants: an identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida, and Gulf of Mexico*. OffShore Graphics Inc., Washington DC. 542 pp.
- Littler, M. M.; Littler, D. S.** 2008. Coralline algal rhodoliths form extensive benthic communities in the Gulf of Chiriqui, Pacific Panamá. *Coral Reefs* 27: 553-553.
- Lüning, K.** 1990. Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley, New York.

- Manson, L. R.** 1953. The crustaceous coralline algae of the Pacific coast of the United States, Canada, and Alaska. University of California press. 26:313-390.
- Masaki, T.** 1984. Crustose coralline algae. *Japanese Journal of Phycology* 32:71-85.
- Masaki, T.; Fujita, D.; Hagen, N. T.** 1984. The surface ultrastructure and epithallium shedding of crustose coralline algae in an Isoyake area of southwestern Hokkaido, Japan. *Hydrobiologia* 116/117:218-223.
- Masaki, T.** 1968. Studies on the Melobesoideae of Japan. Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University 16: 1-80.
- Mendoza, M. L.; Molina, S.; Ventura, P.** 1996. Flora Criptogámica de Tierra del Fuego. Rhodophyta: Corallinales Centro Austral de Investigaciones Científicas y Técnicas. CADIC, C.C. 92 (9410) Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina 8:1-71.
- Mendoza, M. L.** 1999. State of knowledge of the Corallinales (Rhodophyta) of Tierra del Fuego and the Antarctic Peninsula. *Scientia Marina* 63: 139 - 144.
- Milstein, D.** 2002. Filogenia molecular de espécies de *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul. Dissertação de Mestrado, Depto. de Botânica, IB-USP, pp. 82.
- Nylander, J. A. A.** 2004. Bayesian phylogenetics and the evolution of gall wasps. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 34p.
- Nunes, J. M. C.; Guimarães, S. M. P.; Donnangelo, A.; Farias, J.; Horta, P. A.** 2008. Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59:075-086.
- Oliveira, M. C.; Kurniawan, J.; Bird, C. J.; Rice, E. L., Murphy, C. A.; Singh, R. K.; Gutell, R. R.; Ragan, M. A.** 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiothycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycological Research* 43:71-79.
- 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.
- Oliveira E.C.** 1997. Letters. *Science* 277: 1991.
- Oliveira, M. C.** 1998. O uso de marcadores moleculares no estudo da biodiversidade. *In:* Azevedo, M. T. P. [ed.] Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Brasileira de Ficologia: Conservação da biodiversidade e novas tecnologias: promessas e perigos. Sociedade Brasileira de Ficologia. pp.178-186.

- Philippi, R.** 1837. Beweis dass die Nulliporen Pflanzen sind. *Arch. Naturgesch.* 3:387-393.
- Piller, W. E.; Rasser, M.** 1996. Rhodolith formation induced by reef erosion in the Red Sea, Egypt. *Coral Reefs* 15:191-198.
- Pinheiro, P. C.** 2002. Relatório para o Programa Recifes Artificiais Marinhos (RAM): Comunidades ícticas do Arquipélago de Currais, Paraná. PADCT/CIAMB - CEM/UFPR, Pontal do Paraná. 13p.
- Posada, D.; Crandall, K. A.** 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-8.
- 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.
- Printz H.** 1929. 'M. Foslie - 'Contributions to a Monograph of the *Lithothamnia*'. Det Kongelige Norske Videnskabers Selskab Museet, Trodhjem.
- Pueschel, C. M.; Keats, D. W.** 1997. Fine structure of deep-layer sloughing and epithallial regeneration in *Lithophyllum neotalayense* (Corallinales, Rhodophyta). *Phycological Research* 45:1-8.
- Pueschel, C. M.; Miller T. J.** 1996. Reconsidering prey specialization in an lgal-limpet grazing mutualism: epithallial cell development in *Clathromorphum circumscriptum* (Rhodophyta, Corallinales). *Journal of Phycology* 32:28-36.
- Ringeltaube, P.; Harvey, A.** 2000. Non-geniculate coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) on Heron Reef, Great Barrier Reef (Australia). *Botanica Marina* 43: 431-454.
- 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.; Christorffersen, M. L.; Horta, P. A.** 2009. Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90:315-320.
- Robba, L., Russell, S. J., Barker, G. L., Brodie, J.** 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93:1101-1108.
- Rocha, R. M.; Metri, R.; Muro, J. Y.** 2006. Spatial distribution and abundance of ascidians in a bank of coralline algae at Porto Norte, Arvoredo Island, Santa Catarina. *Journal of Coastal Research*, Special Issue 39:1676-1679.

- Saitou, N.; Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Saunders, G. W.** 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360:1879-1888.
- Schaeffer, T. N.; Smith, G. J.; Foster, M. S.; DeTomaso, A.** 2002. Genetic differences between two growth-forms of *Lithophyllum margaritae* (Rhodophyta) in Baja California Sur, Mexico. *Journal of Phycology* 38:1090-1098.
- Sherwood, A.R.; Presting, G. G.** 2007. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43:605–608
- Sherwood, A. R.; Vis M. L.; Entwisle, T. J.; Necchi, O. Jr.; Presting, G. G.** 2008. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): insights from a DNA barcoding approach. *Phycological Research* 56:269–279
- Silva, P. C.; Johansen, H. W.** 1986. A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). *British Phycological Journal* 21:245-254.
- Steller, D. L.; Riosmena-Rodriguez, R.; Foster, M. S.; Roberts, C. A.** 2003. Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: the importance of rhodolith structure and consequences of disturbance. *Aquatic Conservation Marine Freshwater Ecosystems* 13:S5-S20.
- Steneck, R. S.; Paine, R. T.** 1986. Ecological and taxonomic studies of shallow-water encrusting Corallinaceae (Rhodophyta) of the boreal northeastern Pacific. *Phycologia* 25: 22 1-240
- Steneck, R. S.; Testa, V.** 1997. Are calcareous algae important to reefs today or in the past? Symposium summary. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symposium* 1:685-688.
- Stoeckle, M.** 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* 53:796-797.
- Swofford, D. L.** 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tâmega, F. T.; Figueiredo, M. A. O.** 2005. Distribuição das algas calcárias incrustantes (Corallinales, Rhodophyta) em diferentes habitats na Praia do Forno, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. *Rodriguesia* 56:123–132.

- Tamura, K.; Nei, M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-26.
- Taylor, W.R.** 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. Ann Arbor: The University of Michigan Press.
- Tomita, N. Y.** 1976. Contribuição ao conhecimento do gênero *Sporolithon* (Corallinaceae, Cryptonemiales) no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138p.
- Verheij, E.** 1994. Nongeniculate Corallinaceae (Corallinales, Rhodophyta) from the Spermonde Archipelago, SW Sulawesi, Indonesia. *Blumea* 38:95–137.
- 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.
- Vidal, R.; Meneses, I.; Smith, M.** 2008. Phylogeography of the genus *Spongites* (Corallinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 44:173–182.
- Villas-Boas, A. B.; Riosmena-Rodriguez, R.; Amado Filho, G. M.; Maneveldt, G.; Figueiredo, M. A.** 2009. Rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales; Rhodophyta) from Espírito Santo State, Brazil, including the description of *L. depressum* sp. nov.. *Phycologia* 48:237-248.
- Walker, R.H., Brodie, J., Russell, S., Irvine, L.M., and Orfanidis, S.** 2009. Biodiversity of coralline algae in the Northeast Atlantic including *Corallina caespitosa* sp. nov. (Corallinoideae, Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 45: 287–297.
- Woelkerling W.J.** 1993. Type collections of Corallinales (Rhodophyta) in the Foslíe Herbarium (TRH). *Gunneria* 67: 1-289.
- Woelkerling, W. J.; Chamberlain, Y. M.; Silva, P. C.** 1985. A taxonomic and nomenclatural reassessment of *Tenarea*, *Titanoderma* and *Dermatolithon* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of type and other critical specimens. *Phycologia* 24: 317-337.
- Woelkerling, W.J.** 1985. A taxonomic reassessment of *Spongites* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of Kützing's original collections. *British Phycological Journal* 20: 123-153.

- Woelkerling, W. J.** 1988. The Coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate corallinaceae. British Museum (Natural History) and Oxford University Press: London e Oxford. 268p.
- Woelkerling, W. J.; Irvine, L. M.; Harvey, A. S.** 1993. Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6:277-293.
- Woelkerling, W. J.** 1996. Subfamily Lithophylloideae. In ‘The marine benthic flora of southern Australia – Part IIIB. Gracilariales, Rhodymeniales, Corallinales and Bonnemaisoniales’. Australian Biological Resources Study: Ed. HBSWomersley. pp.214–237.
- 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.; Sartoni, G.; Boddi, S.** 2002. *Paulsilvella huveorum* gen. & sp. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) from the Holocene of Somalia and Kenya, with a reassessment of *Lithothrix antiqua* from the Late Pleistocene of Mauritius. *Phycologia* 41, 358–373.
- Wray, J. L.** 1977. Calcareous algae. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York.
- Yang, E. C.; Kim, M. S.; Geraldino, P. J. L.; Sahoo, D.; Shin, J. A.; Boo, S. M.** 2007. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20:161-168.
- Yoon, H. S.; Müller, K. M.; Sheath, R. G.; Ott, F. D.; Bhattacharya, D.** 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 42:482-492.

Anexos

Anexo 1. Espécies de *Lithophyllum* para as quais foram realizados estudos taxonômicos detalhados.

Adaptado de Harvey *et al.* 2009.

Espécies	Referências
<i>L. acrocampton</i> Heydrich	Chamberlain 1996 (Sul, África – como <i>L. incrassatum</i> [Foslie] Foslie)
<i>L. bamleri</i> (Heydrich) Foslie	Verheij 1994 (Indonésia)
<i>L. chamberlainianum</i> Woelkerling & Campbell	Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália); Woelkerling 1996 (Sul, Austrália); Harvey <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Austrália)
<i>L. corallinae</i> (Crouan & Crouan) Heydrich	Chamberlain 1991 (Ilhas Britânicas – como <i>Titanoderma</i>); Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália); Chamberlain & Irvine 1994 (Ilhas Britânicas – como <i>Titanoderma</i>); Woelkerling 1996 (Sul, Austrália); Fragoso & Rodríguez 2002 (México); Harvey <i>et al.</i> 2005 (Nova Zelândia); Villas-Boas <i>et al.</i> 2009 (Brasil)
<i>L. depressum</i> Villas-Boas	Villas-Boas <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Brasil)
<i>L. flavescens</i> Keats	Keats 1997 (Fiji)
<i>L. incrustans</i> Philippi	Chamberlain & Irvine 1994 (Ilhas Britânicas); Chamberlain 1996 (Sul, África)
<i>L. insipidum</i> Adey, Townsend & Boykins	Keats 1997 (Fiji)
<i>L. johansenii</i> (Woelkerling & Campbell)	Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália); Woelkerling 1996 (Sul, Austrália); Harvey <i>et al.</i> 2005 (Nova Zelândia); Villas-boas <i>et al.</i> 2009 (Sudeste Brasil)
<i>L. kotschyianum</i> Unger	Verheij 1994 (Indonésia)
<i>L. lichenoides</i> Philippi	Chamberlain 1997 (Mediterrâneo)
<i>L. margaritae</i> (Hariot) Heydrich	Riosmena-Rodríguez <i>et al.</i> 1999 (México); Presente estudo 2011 (Sul, Brasil)
<i>L. neoatalayense</i> Masaki	Chamberlain 1996 (Sul, África)
<i>L. nitorum</i> W & P Adey	Chamberlain and Irvine 1994 (Ilhas Britânicas)
<i>L. okamurai</i> Foslie	Verheij 1994 (Indonésia)
<i>L. orbiculatum</i> (Foslie) Foslie	Chamberlain & Irvine 1994 (Ilhas Britânicas)
<i>L. polycephalum</i> Foslie	Chamberlain 1996 (Sul, África – como <i>Titanoderma</i>)
<i>L. prototypum</i> (Foslie) Foslie	Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália); Woelkerling 1996 (Sul, Austrália)
<i>L. pustulatum</i> (Lamouroux) Foslie	Chamberlain 1991 (Ilhas Britânicas – como <i>Titanoderma</i>); Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália); Chamberlain & Irvine 1994 (Ilhas Britânicas – como <i>Titanoderma</i>); Woelkerling 1996 (Sul, Austrália); Ringeltaube & Harvey 2000 (Grande Barreira de Corais, Austrália); Harvey <i>et al.</i> 2005 (Nova Zelândia); Harvey <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Austrália)
<i>L. riosmenae</i> Harvey & Woelkerling	Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália – como <i>Lithophyllum sp.</i>); Harvey <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Austrália)
<i>L. stictaeforme</i> (Areschoug in Agardh) Hauck	Woelkerling & Campbell 1992 (Sul, Austrália – como <i>L. bermudense</i>); Woelkerling 1996 (Sul Austrália – como <i>L. frondosum</i>); Furnari <i>et al.</i> 1996 (Mediterrâneo – como <i>L. frondosum</i>) Athanasiadis 1999 (Mediterrâneo); Ringeltaube & Harvey 2000 (Grande Barreira de Corais, Austrália – as <i>L. frondosum</i>); Fragoso & Rodríguez 2002 (Mexico – como <i>L. frondosum</i>); Harvey <i>et al.</i> 2005 (Nova Zelândia); Nunes <i>et al.</i> 2008 (Nordeste, Brasil); Harvey <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Austrália); Farr <i>et al.</i> 2009 (Nova Zelândia); Villas-Boas <i>et al.</i> 2009 (Sudeste, Brasil)
<i>L. tamiense</i> (Heydrich) Foslie	Verheij 1994 (Indonesia); Ringeltaube & Harvey 2000 (Grande Barreira de Corais, Austrália)

Anexo 2. Lista das amostras sequenciadas neste estudo. Espécies, siglas, locais de coleta e marcadores para os quais foram geradas sequências.

Identificação das amostras	Coleta	UPA (pb)	cox1 (pb)	SSU r DNA (pb)
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (1)	Ilha do Arvoredo-SC	370	-	1744
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (2)	Ilha do Arvoredo-SC	370	664	1744
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (3)	Ilha do Arvoredo-SC	370	664	1744
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (7)	Torres -RS	370	-	1744
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (14)	Ilha do Xavier-SC	370	-	-
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (C2)	Ponta das Canas-SC	370	664	-
<i>Lithophyllum</i> sp.1 (C6)	Ponta das Canas-SC	370	664	1744
<i>Lithophyllum margaritae</i> (4)	Ilha do Arvoredo-SC	370	664	1744
<i>Lithophyllum margaritae</i> (5)	Ilha do Arvoredo-SC	370	664	1744
<i>Lithophyllum margaritae</i> (28)	Ilha do Arvoredo-SC	370	-	-
<i>Lithophyllum margaritae</i> (31)	Ilha do Arvoredo-SC	370	-	-
<i>Lithophyllum</i> sp.3	Abrolhos-BA	-	664	-
<i>Lithophyllum</i> sp.4	Abrolhos-BA	370	664	-
<i>Amphiroa</i> sp. (19)	Abrolhos-BA	370	664	-
<i>Lithophyllum</i> sp.2	João Pessoa-PB	-	664	-
<i>Sporolithon</i> sp.3	João Pessoa-PB	370	664	-
<i>Sporolithon</i> sp.4	João Pessoa-PB	370	664	-
<i>Sporolithon</i> sp.R3	Ilha de Santo Aleixo- PE	370	-	-
<i>Sporolithon</i> sp.R2	Ilha de Santo Aleixo- PE	370	-	-

Anexo 3. Lista de espécies retiradas do Genbank utilizadas no estudo molecular: Espécies, número de acesso no Genbank, localidade e referência.

Espécies	Nº de acesso GenBank	Localidade	Referência
<i>Gracilaria dotyi</i> Hoyle	EF426613	-	Sherwood & Presting (2007)
<i>Gracilaria tikvahiae</i> McLachlan	FJ499546	Ilha de Rodes - USA	Saunders (2009)
<i>Neodilsea borealis</i> (I.A.Abbott) S.C.Lindstrom	AY970625	British Columbia - Canada	Saunders (2005)
Corallinales sp.	HQ544116	Korea do Sul	Bittner et al. (2010)
Corallinales sp.	HQ544086	Korea do Sul	Bittner et al. (2010)
Uncultured Corallinales	GQ917524	Vanuatu	Bittner et al. (2010)
Uncultured Corallinales	GQ917531	Vanuatu	Bittner et al. (2010)
Uncultured Corallinales	GQ917507	Guadalupe	Bittner et al. (2010)
Uncultured Corallinales	GQ917684	Costa Rica	Bittner et al. (2010)
Corallinales sp.	HM903026	Ilhas Marianas do Norte	Bittner et al. (2010)
Corallinales sp.	HM916656	Japão	Bittner et al. (2010)
<i>Mesophyllum erubescens</i> (Foslie) M.Lemoine	DQ629012	Hawaii – USA	James (2006)
<i>Pneophyllum cf. conicum</i> (E.Y.Dawson) Keats, Y.M.Chamberlain & Baba	DQ628994	Hawaii – USA	James (2006)
<i>Lithophyllum incrustans</i> Philippi	AF093410	Reino Unido	Bailey (1999)
<i>Lithophyllum insipidum</i> Adey, Townsend & Boykins	DQ628977	Hawaii – USA	James (2006)
<i>Lithophyllum kotschyianum</i> Unger	DQ628974	Hawaii – USA	James (2006)
<i>Lithophyllum stictaeforme</i> (Areschoug) Hauck	EF628241	Nova Zelândia	Broom et al. (2008)
Lithophyllum sp.	EF628242	Nova Zelândia	Broom et al. (2008)
<i>Titanoderma pustulatum</i> (J.V.Lamouroux) Nägeli	AF093409	Reino Unido	Bailey (1999)
<i>Amphiroa</i> sp.	ASU62115	Austrália	Bailey & Chapman (1998)

Anexo 4. Resumo das características de espécies do gênero *Lithophyllum* que compartilham características semelhantes aos espécimes do Sul do Brasil – 1) Athanasiadis 1999; 2) Riosmena-Rodriguez 1999; 3) Funari et al. 1996; 4) de acordo com escada de Farr et al. 2009; 5) de acordo com escala de Harvey et al 2005 6) Keats 1997; 7) de acordo com escala de Keats 1997; 8) Harvey et al. 2009; 9) Villas-Boas et al. 2009.

	<i>L. margaritae</i> Presente estudo	<i>Lithophyllum</i> sp.1 Presente estudo	<i>L. expansum</i> (6)	<i>L. stictaeforme</i> (1;3)	<i>L. cabiochiaie</i> (3)	<i>L. incrustans</i> (1;3;6)	<i>L. margaritae</i> (2)	<i>L. johansenii</i> (4;6)	<i>L. pustulatum</i> (4)	<i>L. insipidum</i> (7)	<i>L. corallinae</i> (8)	<i>L. depressum</i> (9)
Altura das células epiteliais (µm)	1,5-5	(2,5)3-6	-	-	-	-	-	-	-	3-6	3-6	5-6
Diâmetro das células epiteliais (µm)	5-13	6-11	-	-	-	-	-	-	-	9-11	6-10	10-13
Altura das células do peritalo (µm)	7-16	13-25	5 - 50	15 - 45	13-26	10-16	6 - 18	-	-	-	-	8-14
Diâmetro das células do peritalo (µm)	3-10	7-18	5-15 (16)	10 - 20	08 - 22	5 - 33	5-10	-	-	-	-	6-9
Diâmetro interno da câmara do conceptáculo (µm)	180 – 220	(295) 315-345	(175) 200-350	200 - 450 (475)	290-335 (390)	230-360	150- 450	95-145	185-300	200-220	160-260 (340)	232-252
Altura da câmara conceptáculo (µm)	70 – 95	(75)90-130	100(115)	120	86-140	91-210	50– 150	-	-	85-100	55-95	120-150
Número de células de espessura do teto do conceptáculo	3-5	4-7	5-6	5-9	5-8	6-17	3-4	2-4	1-2	4-7	2-4	6-8
Posição do assoalho da câmara do conceptáculo (nº de células)	10-14	9-13	-	15	-	13-15	11-12	6-8	3-4(6)	6-9	6 -11	12-14

Anexo 5. Matriz de identidade do UPA. Porcentagem de identidade (na porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências utilizadas na Matriz do UPA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1- <i>Gracilaria dotyi</i> (EF426613)	ID	31	31	31	39	39	31	31	31	31	39	39	38	43	32	30	30	30
2- Lsp1 (1)	91,6	ID	0	0	25	25	0	0	0	0	25	25	23	24	40	38	38	38
3- Lsp1 (2)	91,6	100	ID	0	25	25	0	0	0	0	25	25	23	24	40	38	38	38
4- Lsp1 (3)	91,6	100	100	ID	25	25	0	0	0	0	25	25	23	24	40	38	38	38
5-Lm4	89,4	93,2	93,2	93,2	ID	0	25	25	25	25	0	0	29	30	39	37	37	37
6-Lm5	89,4	93,2	93,2	93,2	100	ID	25	25	25	25	0	0	29	30	39	37	37	37
7-Lsp1(C7)	91,6	100	100	100	93,2	93,2	ID	0	0	0	25	25	23	24	40	38	38	38
8-Lsp1(14)	91,6	100	100	100	93,2	93,2	100	ID	0	0	25	25	23	24	40	38	38	38
9-Lsp1(C2)	91,6	100	100	100	93,2	93,2	100	100	ID	0	25	25	23	24	40	38	38	38
10-Lsp1(C6)	91,6	100	100	100	93,2	93,2	100	100	100	ID	25	25	23	24	40	38	38	38
11-Lm(28)	89,4	93,2	93,2	93,2	100	100	93,2	93,2	93,2	93,2	ID	0	29	30	39	37	37	37
12-Lm(31)	89,4	93,2	93,2	93,2	100	100	93,2	93,2	93,2	93,2	100	ID	29	30	39	37	37	37
13-Asp19	89,7	93,7	93,7	93,7	92,1	92,1	93,7	93,7	93,7	93,7	92,1	92,1	ID	26	36	34	34	34
14-Lsp4	88,3	93,5	93,5	93,5	91,8	91,8	93,5	93,5	93,5	93,5	91,8	91,8	90,9	ID	48	46	46	46
15-Sp3	91,3	89,1	89,1	89,1	89,4	89,4	89,1	89,1	89,1	89,1	89,4	89,4	90,2	87	ID	2	2	2
16-Sp4	91,8	89,7	89,7	89,7	90	90	89,7	89,7	89,7	89,7	90	90	90,8	87,5	99,4	ID	0	0
17-SpR3	91,8	89,7	89,7	89,7	90	90	89,7	89,7	89,7	89,7	90	90	90,8	87,5	99,4	100	ID	0
18-SpR2	91,8	89,7	89,7	89,7	90	90	89,7	89,7	89,7	89,7	90	90	90,8	87,5	99,4	100	100	ID

Anexo 6. Matriz de identidade do *cox1* (Matriz curta). Porcentagem de identidade (na porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências utilizadas na Matriz curta do *cox1*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 - FJ499546Gr	ID	121	133	133	134	133	133	132	127	133	133	128	128	142
2 - AY970625Ne	81,7	ID	122	122	123	122	122	120	119	122	129	108	108	123
3 - Lsp1 (2)	79,9	81,6	ID	0	1	0	88	88	86	0	118	84	84	100
4 - Lsp1 (3)	79,9	81,6	100	ID	1	0	88	88	86	0	118	84	84	100
5 - Lsp1(C6)	79,8	81,4	99,8	99,8	ID	1	90	88	88	1	118	86	86	101
6 - Lsp1(C2)	79,9	81,6	100	100	99,8	ID	88	88	86	0	118	84	84	100
7 - Lm(5)	79,9	81,6	86,7	86,7	86,5	86,7	ID	3	43	88	119	80	80	100
8 - Lm(4)	80,1	81,9	86,8	86,8	86,7	86,8	99,6	ID	42	88	118	80	80	98
9 - Lsp2	80,8	82	87	87	86,8	87	93,5	93,6	ID	86	116	81	81	98
10 - Sp4	79,9	81,6	100	100	99,8	100	86,7	86,8	87	ID	118	84	84	100
11 - SpR2	79,9	80,5	82,2	82,2	82,0	82,2	82	82,2	82,5	82,2	ID	112	112	127
12 - Lsp3	80,7	83,7	87,3	87,3	87,1	87,3	87,9	87,9	87,8	87,3	83,1	ID	0	84
13 - Lsp4	80,7	83,7	87,3	87,3	87,1	87,3	87,9	87,9	87,8	87,3	83,1	100	ID	84
14 - Aspp19	78,6	81,4	84,9	84,9	84,7	84,9	85	85,2	85,2	84,9	80,8	87,3	87,3	ID

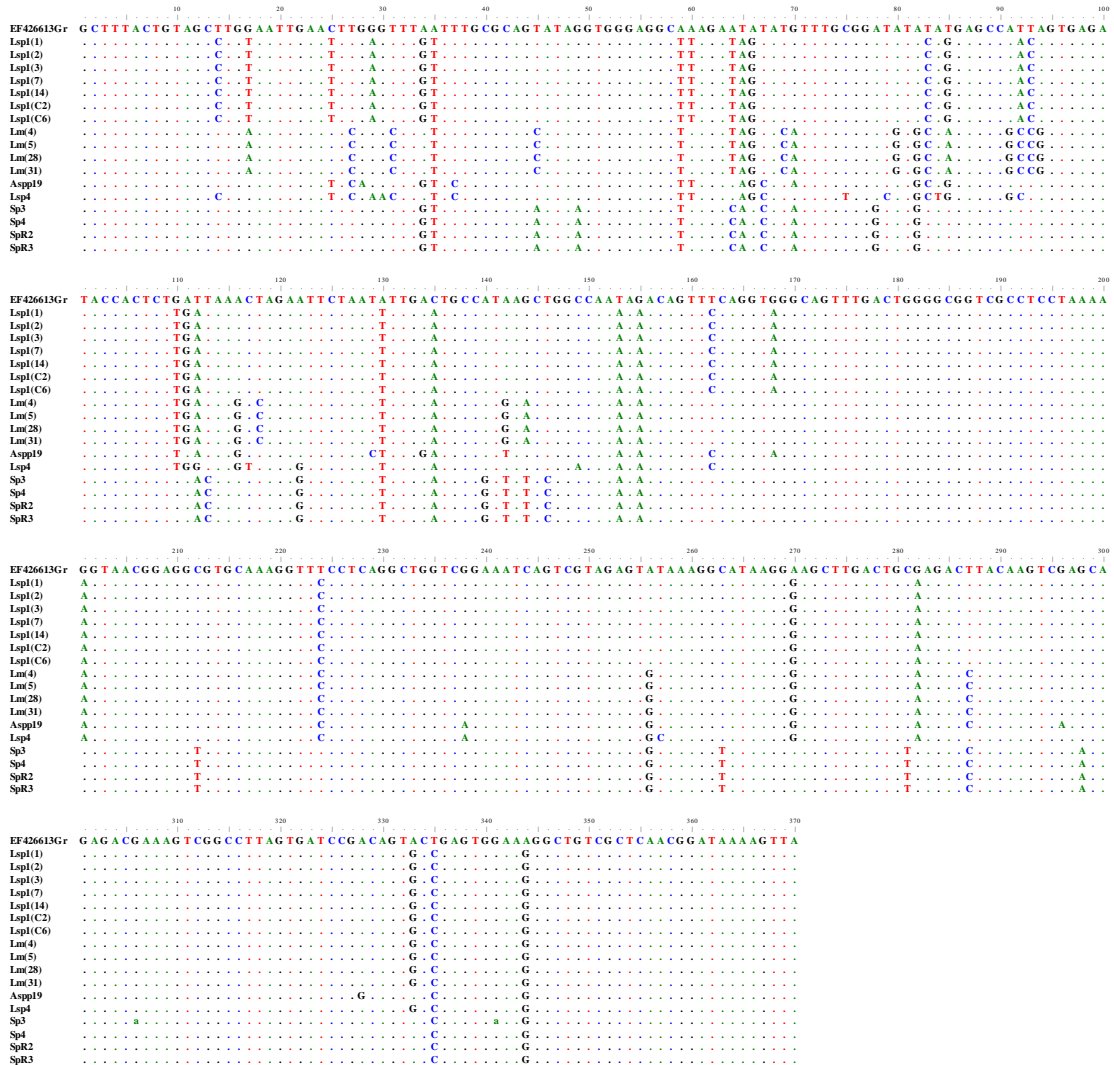
Anexo 7. Matriz de identidade do *cox1* (Matriz geral). Porcentagem de identidade (na porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências utilizadas na Matriz geral do *cox1*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1-AY970625	ID	122	122	123	122	122	120	119	122	129	108	108	123	120	120	109	114	114	111	122	123
2-Lsp1(2)	81,6	ID	0	1	0	88	87	86	0	118	84	84	100	89	89	92	94	94	94	94	94
3-Lsp1(3)	81,6	100	ID	1	0	88	87	86	0	118	84	84	100	89	89	92	94	94	94	94	94
4-Lsp1(C6)	81,4	99,8	99,8	ID	1	89	88	87	1	120	86	86	102	90	90	92	96	94	94	96	94
5-Lsp1(C2)	81,6	100	100	99,8	ID	88	87	86	0	118	84	84	100	89	89	92	94	94	94	94	94
6-Lm(5)	81,6	86,7	86,7	86,5	86,7	ID	3	43	88	120	80	80	100	79	80	88	94	92	88	87	96
7-Lm(4)	81,9	86,8	86,8	86,7	86,8	99,6	ID	42	87	118	80	80	98	77	78	87	94	92	87	86	94
8-Lsp2	82	87	87	86,8	87	93,5	93,6	ID	860	116	81	81	98	79	80	87	89	92	90	80	84
9-Lsp1(14)	81,6	100	100	99,8	100	86,7	86,8	87	ID	118	84	84	100	89	89	92	94	94	94	94	94
10-SpR2	80,5	82,2	82,2	82	82,2	82	82,2	82,5	82,2	ID	112	112	127	127	128	116	125	127	118	127	126
11-Lsp3	83,7	87,3	87,3	87,1	87,3	87,9	87,9	87,8	87,3	83,1	ID	0	84	81	82	74	78	81	78	79	79
12-Lsp4	83,7	87,3	87,3	87,1	87,3	87,9	87,9	87,8	87,3	83,1	100	ID	84	81	82	74	78	81	78	79	79
13-Aspp19	81,4	84,9	84,9	84,7	84,9	85,0	85,2	85,2	84,9	80,8	87,3	87,3	ID	72	73	67	76	83	67	80	84
14-HQ544116	81,9	86,5	86,5	86,4	86,5	88,1	88,4	88,1	86,5	80,8	87,8	87,8	89,1	ID	1	66	61	90	66	76	76
15-HQ544086	81,9	86,5	86,5	86,4	86,5	87,9	88,2	87,9	86,5	80,7	87,6	87,6	89	99,8	ID	67	62	90	67	77	75
16-GQ917524	83,5	86,2	86,2	86,1	86,2	86,7	86,8	86,8	86,2	82,5	88,8	88,8	89,9	90	89,9	ID	66	66	5	70	75
17-GQ917507	82,8	85,8	85,8	85,6	85,8	85,8	85,9	86,5	85,8	81,1	88,2	88,2	88,5	90,8	90,6	90	ID	82	66	70	68
18-GQ917684	82,8	85,8	85,8	85,8	85,8	86,1	86,2	86,2	85,8	80,8	87,8	87,8	87,5	86,5	86,4	90	87,6	ID	70	70	86
19-GQ917531	83,2	85,9	85,9	85,8	85,9	86,7	86,8	86,5	85,9	82,2	88,2	88,2	89,9	90	89,9	99,3	90	89,4	ID	74	77
20-HM903026	81,6	85,8	85,8	85,6	85,8	86,8	87	87,9	85,8	80,8	88,1	88,1	87,9	88,5	88,4	89,4	89,4	87,5	88,8	ID	88
21-HM916656	81,4	85,9	85,9	85,8	85,9	85,6	85,8	87,3	85,9	81	88,1	88,1	87,3	88,5	88,7	88,7	89,7	87	88,4	86,7	ID

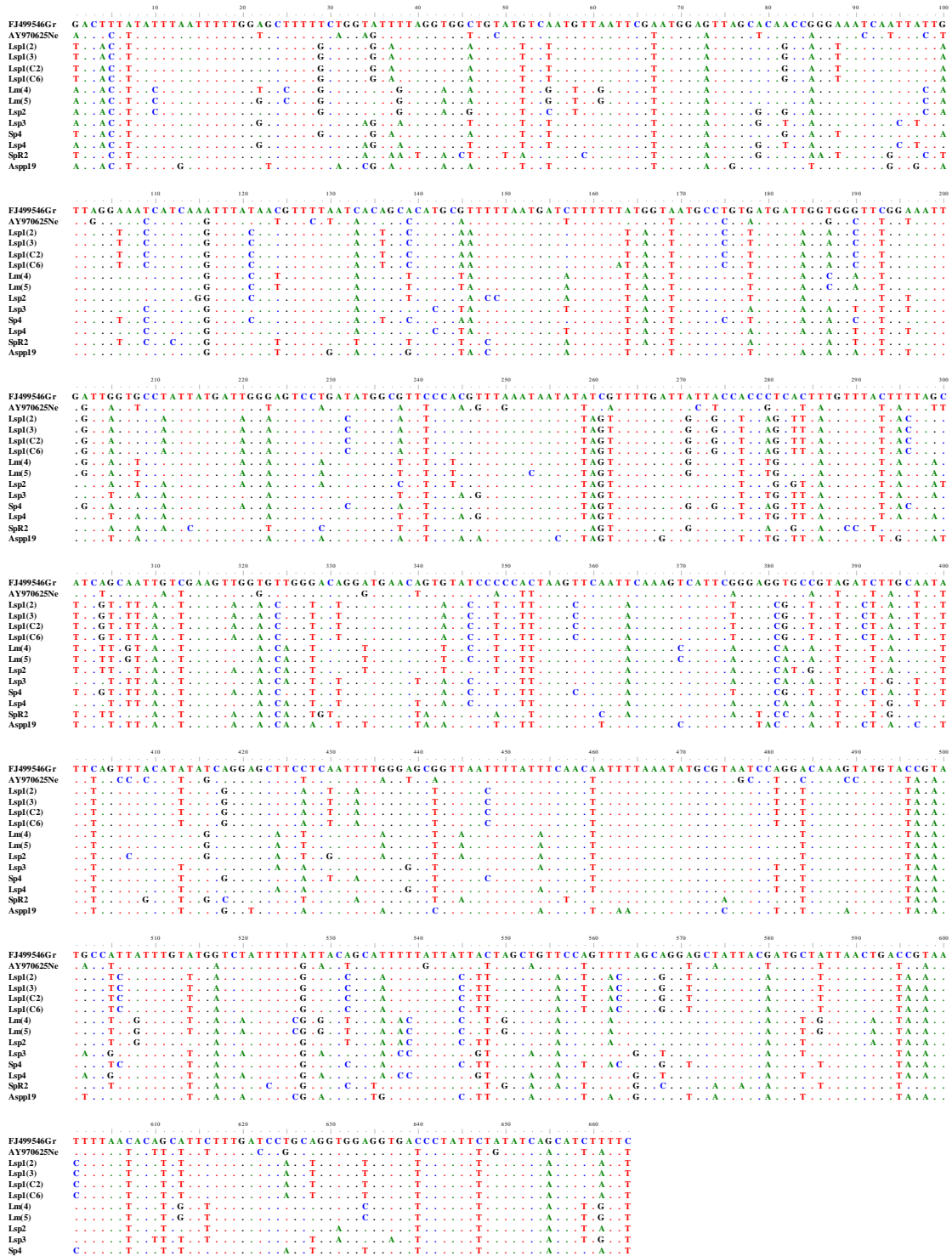
Anexo 8. Matriz de identidade do SSU rDNA. Porcentagem de identidade (na porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências utilizadas na Matriz curta do SSU rDNA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1-DQ629012Me	ID	97	119	119	119	119	122	118	118	119	119	119	122	146	116	145
2-DQ628994Pn	93,6	ID	59	59	59	59	63	59	59	59	60	66	63	98	57	107
3-Lsp1(1)	92,1	96,1	ID	0	0	0	6	27	27	24	32	42	39	77	29	92
4-Lsp1(2)	92,1	96,1	100	ID	0	0	6	27	27	24	32	42	39	77	29	92
5-Lsp1(3)	92,1	96,1	100	100	ID	0	6	27	27	24	32	42	39	77	29	92
6-Lsp1(C6)	92,1	96,1	100	100	100	ID	6	27	27	24	32	42	39	77	29	92
7-Lsp1(7)	91,9	95,8	99,6	99,6	99,6	99,6	ID	33	33	30	36	48	45	80	33	95
8-Lm(4)	92,2	96,1	98,2	98,2	98,2	98,2	97,8	ID	0	26	30	36	39	71	26	85
9-Lm(5)	92,2	96,1	98,2	98,2	98,2	98,2	97,8	100	ID	26	30	36	39	71	26	85
10-AF093410Li	92,1	96,1	98,4	98,4	98,4	98,4	98	98,3	98,3	ID	20	41	30	70	18	91
11-DQ628977Lis	92,1	96	97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	98	98	98,7	ID	38	42	72	32	92
12-DQ628974Lk	92,1	95,6	97,2	97,2	97,2	97,2	96,8	97,6	97,6	97,3	97,5	ID	54	77	42	83
13-EF628241Ls	91,9	95,8	97,4	97,4	97,4	97,4	97	97,4	97,4	98	97,2	96,4	ID	80	15	92
14-AF093409Tp	90,3	93,5	94,9	94,9	94,9	94,9	94,7	95,3	95,3	95,4	95,2	94,9	94,7	ID	75	71
15-EF628242Lsp	92,3	96,2	98,1	98,1	98,1	98,1	97,8	98,3	98,3	98,8	97,9	97,2	99	95	ID	89
16-ASU62115Am	90,4	92,9	93,9	93,9	93,9	93,9	93,7	94,4	94,4	94	93,9	94,5	93,9	95,3	94,1	ID

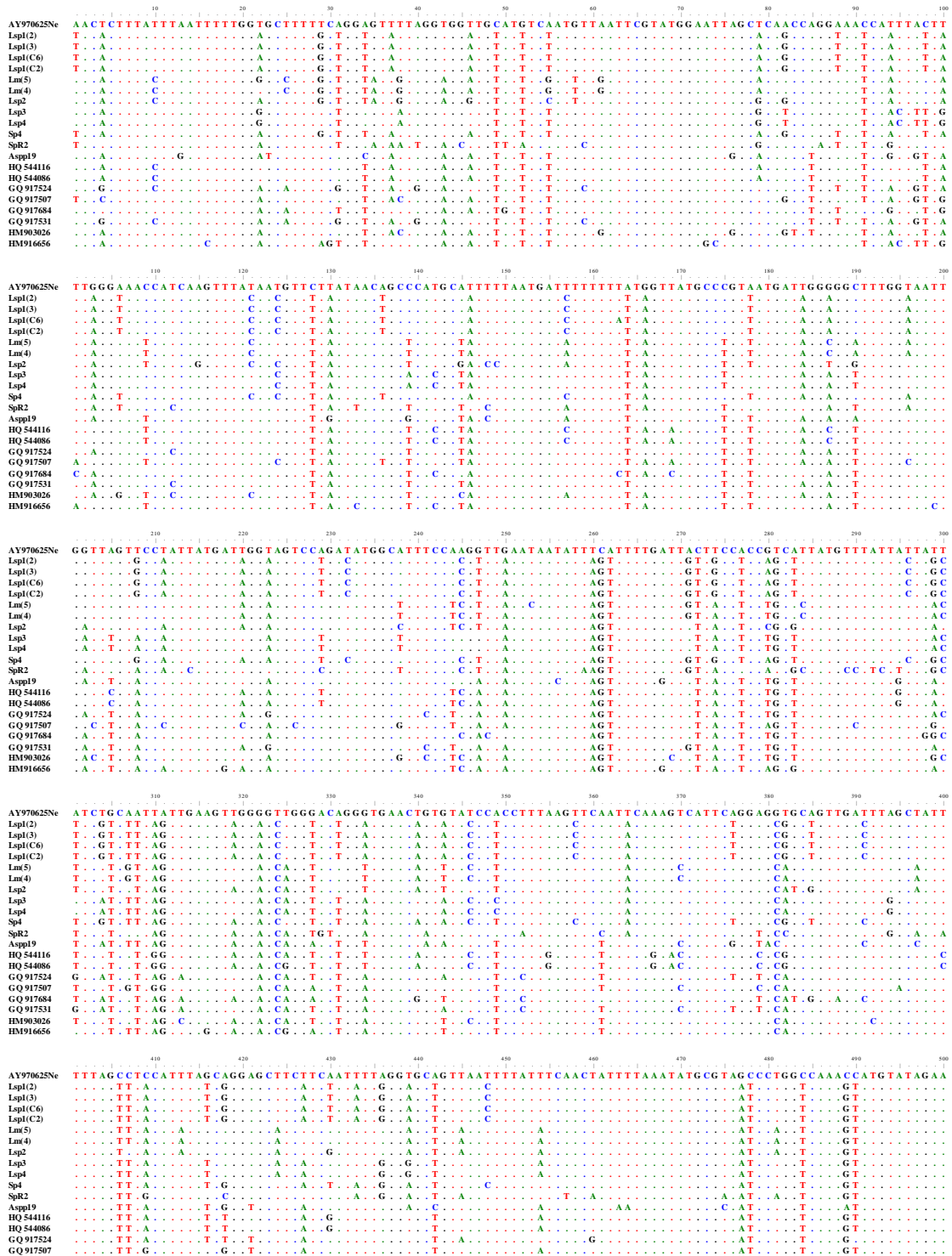
Anexo 9. Alinhamento das sequências do UPA. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências geradas neste trabalho estão identificadas pelas siglas conforme o Anexo 2, e a sequência retirada do GenBank (grupo externo) está identificada pelo número de acesso conforme o Anexo 3.



Anexo 10. Alinhamento das sequências da Matriz *cox1* curta. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências geradas neste trabalho estão identificadas pelas siglas conforme o Anexo 2, e as sequências retiradas do GenBank estão identificadas pelos números de acesso conforme o Anexo 3.



Anexo 11. Alinhamento das sequências da Matriz *cox1* geral. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências geradas neste trabalho estão identificadas pelas siglas conforme a Anexo 2, e as sequências retiradas do GenBank (grupos externos) estão identificadas pelos números de acesso conforme a Anexo 3.



GQ 917684T.A.....T...T.A.....A...T...A...T.....A.T.....A.....G.T.....C....
 GQ 917531TT.A.....T.T.....A.....T...A.....T...A.....G.....A.T.....T...G.....
 HM1903026T.A.C.....T.....A.G.G.....A...T...A.....A.....T...G.T.....G.....
 HM1916656TT.G.....T.G.....T.....A.....A.....A.....A.T.....T...G.....

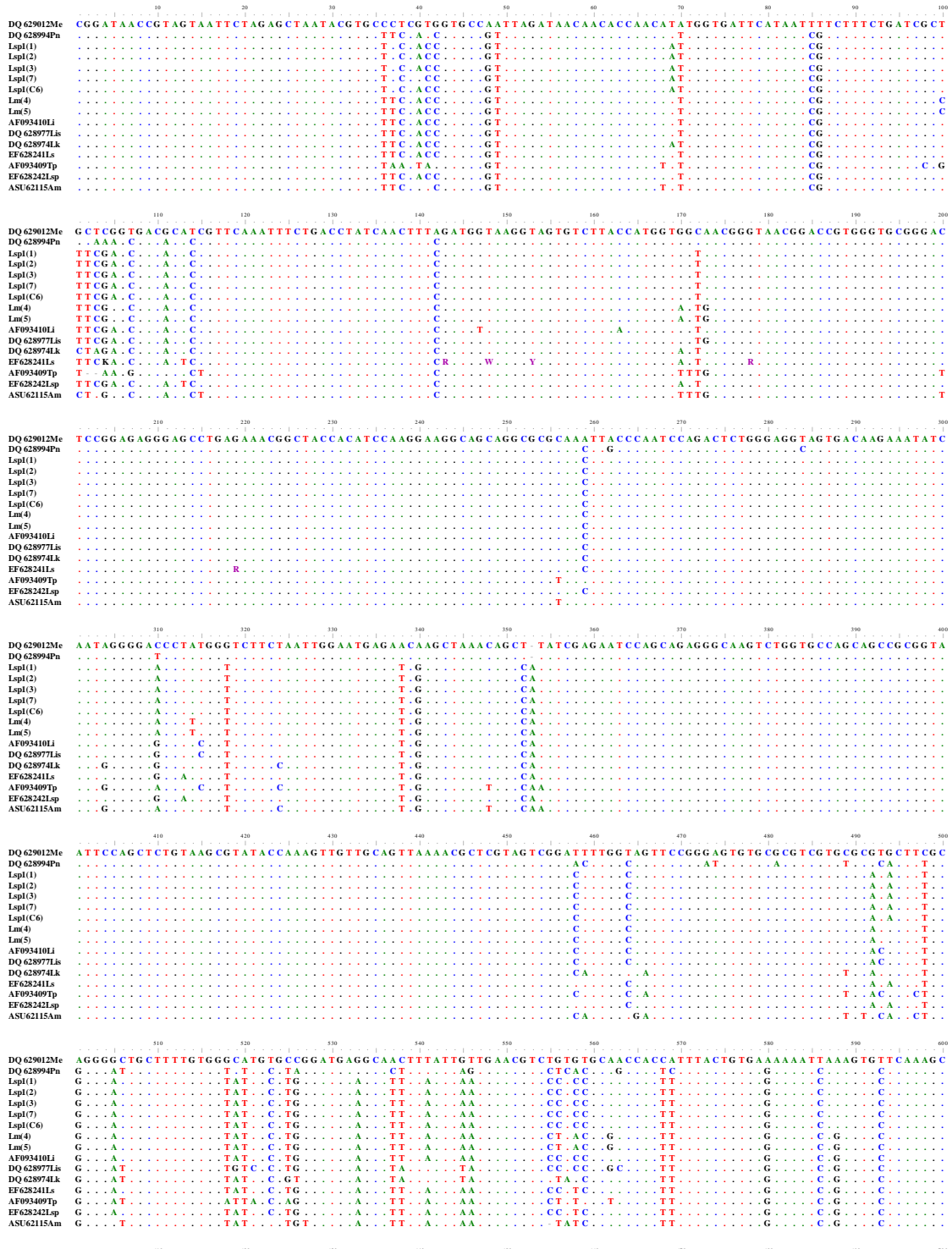
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

AY970625Ne TACCTTTATTGGATGATCTATTTTGTAACTGCATTTTGTTATTATTAGCAGTTCCTGTTTAGCAGGTGCAATTACTATGCTTTTAACTGATCGAAA
 Lsp1(2) .G...C.....T.....T...C...A...A...C.T.....T...A...AC...G...T...A.....A.....
 Lsp1(3) .G...C.....T.....T...C...A...A...C.T.....T...A...AC...G...T...A.....A.....
 Lsp1(C6) .G...C.....T.....T...C...A...A...C.T.....T...A...AC...G...T...A.....A.....
 Lsp1(C2) .G...C.....T.....T...C...A...A...C.T.....T...A...AC...G...T...A.....A.....
 Lm5) .G...G.....T.....A.....C.G.....A.A.C.A.A.C...G...T...A...A...A.....A.T...G...A...A...
 Lm4) .G...G.....T.....A.....C.G.....A.A.C.A.A.C...G...T...A...A...A.....A.T...G...A...A...
 Lsp2) .G...G.....T.....A.....C.G.....A.A.C.A.A.C...G...T...A...A...A.....A.T...G...A...A...
 Lsp3) .G...G.....T.....A.....A...C.C.A...G...T...A...A...A.....G...T...A...T...A...A...
 Lsp4) .G...G.....T.....A.....A...C.C.A...G...T...A...A...A.....G...T...A...T...A...A...
 Sp4) .G...C.....T.....T...C...A...A...C.T.....T...A...AC...G...T...A...T...A...A...
 Spr2) .G...C.....T.....C...T...C...T...G...A...A...G...C...A...A...A...A...T...
 Aspp19) .T...A.....T...A...C...A...T.G...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...A...
 HQ 544116) .G.T.....G...G...A...C...A...T.G...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 HQ 544086) .G.T.....G...G...A...C...A...T.G...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 GQ 917524)G...G...A...C...A...T.G...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 GQ 917507)C...A.....A.....A...T.A...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...G...T...A...
 GQ 917684)C...T.....A.....C...A...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 GQ 917531)G...G...A...C...A...T.A...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 HM1903026)G...G...A...C...A...T.A...A...C.T.....G...A...A...A...T...A...T...A...
 HM1916656) .G...A.C...C...T...G...A...T...C...T.A...A...C.T.....G...C...C...A.C...T...A...T...A...G...

610 620 630 640 650 660

AY970625Ne TTTTAACTTCTTTTGTGACCCGGCAGGTGAGGGTATCCFATTTTGTATCAACATTTATTT
 Lsp1(2) C.....A.....C.....T...A...T.....T.....A.....C.....
 Lsp1(3) C.....A.....C.....T...A...T.....T.....A.....C.....
 Lsp1(C6) C.....A.....C.....T...A...T.....T.....A.....C.....
 Lsp1(C2) C.....A.....C.....T...A...T.....T.....A.....C.....
 Lm5)A...G.....T...T.....C.....A.....G.....
 Lm4)A...A.....T...T.....C.....A.....G.....
 Lsp2)A...A.....T...T.....A.....A.....A.....G.....
 Lsp3)A...A.....T...T.....A.....A.....A.....G.....
 Lsp4)A...A.....T...T.....A.....A.....A.....G.....
 Sp4)A...G...A...C.....T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 Spr2)A...A...A...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 Aspp19)A...A...C...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 HQ 544116)A...A...C...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 HQ 544086)A...A...C...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 GQ 917524)A...A...C...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 GQ 917507)A...A...C...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 GQ 917684)G...C.....A...T...T...A...A...A...A...C...A...C.....
 GQ 917531)A...A...T...T...A...A...A...A...A...G...C...C.....
 HM1903026)G...A...T...T...G...A...G...A...C...A...G...C...C.....
 HM1916656)A...A...T...C...A...A...A...A...A...G...C...C.....

Anexo 12. Alinhamento das sequências da Matriz SSU rDNA. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências geradas neste trabalho estão identificadas pelas siglas conforme a Anexo 2, e as sequências retiradas do GenBank estão identificadas pelos números de acesso conforme a Anexo 3.



DQ 629012Me AGGCATTTGTCATGAATACATTAGCATGGAAATAATGAATAGGACTTGGTCTTATTTTGGTTGGTTTGTATGGCCGAGTAATGATTTAAAGGGACAGTTG
DQ 628994PaC.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LspI(1)C.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LspI(2)C.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LspI(3)C.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LspI(7)C.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LspI(C6)C.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
LmI(4)C.G.....GT.....A.....C.....TC.....GG.A.T.....G.....
LmI(5)C.G.....GT.....A.....C.....TC.....GG.A.T.....G.....
AF093410LIC.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
DQ 628977LsC.G.....GT.....A.....TC.....GG.A.T.....G.....
DQ 628974LkC.G.....GT.....A.....TC.....GGAA.T.....G.....
EF628241LsC.G.....GT.....A.....TC.....GG.AAT.....G.....
AF093409TpC.G.....GT.....A.....TC.....GG.AAT.....G.....
EF628242LspC.G.....GT.....A.....TC.....GG.AAT.....G.....
ASU62115AmG.....GA.....A.....TC.....G.G.AAT.....G.....

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
DQ 629012Me GGGGCATTGTATCCAGAGCTAGAGGTGAAATTCITTAGATTTCTGG AAGCAAAACAGCTGCGAAAGCGTCTGCCAAGGATGTTTTTCATGATCAAGAAC
DQ 628994PaT.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LspI(1)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LspI(2)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LspI(3)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LspI(7)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LspI(C6)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LmI(4)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
LmI(5)T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
AF093410LIT.G.C.....G.C.A.....T.....A.....G.....
DQ 628977LsT.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
DQ 628974LkT.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
EF628241LsT.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
AF093409TpT.....A.G.C.....G.C.T.....T.....A.....
EF628242LspT.....T.G.C.....G.C.A.....T.....G.....
ASU62115AmNNNNNNNNN.....G.....CTCCA.....T.....

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
DQ 629012Me GAAAGTAAAGGGATCGAAGACGATACAGATACCGTCGTAGTCTTTACTATAAACAATGAGGACTGGGGATCGGGGAGGAAATTCGATGACCCGCCGGCA
DQ 628994PaG.....C.....AA.....
LspI(1)G.....C.....AA.....
LspI(2)G.....C.....AA.....
LspI(3)G.....C.....AA.....
LspI(7)G.....C.....AA.....
LspI(C6)G.....C.....AA.....
LmI(4)G.....C.....AA.....
LmI(5)G.....C.....AA.....
AF093410LIG.....C.....A.....
DQ 628977LsG.....C.....A.....
DQ 628974LkG.....C.....A.....
EF628241LsG.....C.....A.....
AF093409TpG.....C.....A.....
EF628242LspG.....C.....A.....
ASU62115AmG.....C.....A.....

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
DQ 629012Me CCCTCCGGGAAACAAAGTGTITGCTTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTCACGGGAGGATCACCGGGTGTGGAGCCTG
DQ 628994PaT.A.....T.....T.....
LspI(1)T.A.....T.....T.....
LspI(2)T.A.....T.....T.....
LspI(3)T.A.....T.....T.....
LspI(7)T.A.....T.....N.....N.....
LspI(C6)T.A.....T.....T.....
LmI(4)T.A.....T.....T.....
LmI(5)T.A.....T.....T.....
AF093410LIT.A.....T.....T.....
DQ 628977LsT.A.....T.....T.....
DQ 628974LkT.A.....T.....T.....
EF628241LsT.A.....T.....T.....
AF093409TpT.A.....T.....T.....
EF628242LspT.A.....T.....T.....
ASU62115AmT.A.....T.....C.....A.....

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
DQ 629012Me CGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCAGGACATAGTGAGGATTCAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGTTGGTGGTGCAT
DQ 628994PaN.....
LspI(1)N.....
LspI(2)N.....
LspI(3)N.....
LspI(7)N.....
LspI(C6)N.....
LmI(4)N.....
LmI(5)N.....
AF093410LIA.....T.....
DQ 628977LsA.....T.....
DQ 628974LkA.....T.....
EF628241LsA.....T.....
AF093409TpA.....T.....
EF628242LspA.....T.....
ASU62115AmA.....T.....

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
DQ 629012Me GGCCTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTCTGGTTAATTCGGTTAACGAGCGAGACCTGGGCGTGCTAAATAGGGGCTATTACCGTTTTTGGTAGTACGT
DQ 628994PaC.....C.....A.....C.....
LspI(1)C.....G.....C.....A.CAAT.....T.T.....
LspI(2)C.....G.....C.....A.CAAT.....T.T.....
LspI(3)C.....G.....C.....A.CAAT.....T.T.....
LspI(7)C.....G.....C.....A.CAAT.....T.T.....
LspI(C6)C.....G.....C.....A.CAAT.....T.T.....
LmI(4)C.....G.....C.....A.....AC.....
LmI(5)C.....G.....C.....A.....AC.....
AF093410LIC.....G.....C.....A.....G.....C.....
DQ 628977LsC.....TG.....G.....A.....C.....C.....
DQ 628974LkC.....G.....C.....A.....C.....C.....
EF628241LsC.....G.....C.....A.....C.....C.....
AF093409TpC.....T.G.C.....T.C.....G.....GTTT.C.....
EF628242LspC.....G.....C.....T.C.....G.....GTTT.C.....
ASU62115AmC.....T.G.C.....G.....GTTT.C.....

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

```

DQ 629012Me T T C T T C T T A G A C G G A C T G C G G G C G T C T A G T C C G C G G A A G C T C C A G G C A A T A A C A G G T C T G A G A T G C C C T T A G A T G T T C T G G G C C G C A C G C G T G C T A C A C T
DQ 628994Pa . C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
Lspl(1) C C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
Lspl(2) C C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
Lspl(3) C C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
Lspl(7) C C . . . . . T . . . . . C . A . . . . . C . . . . .
Lspl(C6) C C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
Lm(4) . C . . . . . G . . . . . C . C . . . . .
Lm(5) . C . . . . . G . . . . . C . C . . . . .
AF093410L1 . C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
DQ 628977Ls A C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
DQ 628974Lk A C . . . . . G . . . . . C . C . . . . .
EF628241Ls . C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
AF093409Tp G C . . . . . G . . . . . C . T . . . . .
EF628242Lsp . C . . . . . T . . . . . C . A . . . . .
ASU62115Am A . . . . . G . . . . . C . C . . . . .

```

```

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
DQ 629012Me G A G T G G A T C A G C G G G T C A G G T T G C G C G A A A G T T T C C T A A T C T T G A A A T C C G C T C G T G A T G G G G A T T G A G G G T T G C A A T T C C C C T C A T G A A C G A G G A A
DQ 628994Pa . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lspl(1) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lspl(2) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lspl(3) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lspl(7) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lspl(C6) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lm(4) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
Lm(5) . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
AF093410L1 . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
DQ 628977Ls . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
DQ 628974Lk . . . . . T . . . . . A A T A . . . . . G . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
EF628241Ls . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
AF093409Tp . . . . . T . . . . . A A A C . . . . . G T . G . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
EF628242Lsp . . . . . T . . . . . A A . A . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .
ASU62115Am . . . . . A . . . . . T . . . . . A A . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . .

```

```

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
DQ 629012Me T A C C T T G T A A G C G T G G G T C A T C A T C C G C G C T G A A T A C G T C C C T G C C C T T T G T A C A C A C C G C C C G T C G C T C C T A C C G A T T G A G T G G T C C G G T G A G G C T T
DQ 628994Pa . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lspl(1) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lspl(2) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lspl(3) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lspl(7) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lspl(C6) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lm(4) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
Lm(5) . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
AF093410L1 . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
DQ 628977Ls . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
DQ 628974Lk . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
EF628241Ls . M . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . .
AF093409Tp . . . . . G . . . . . C . A T . . . . . A T . . . . . C . . . . .
EF628242Lsp . . . . . C . . . . . T T . . . . . A A . . . . .
ASU62115Am . . . . . G . . . . . C G A T . . . . . A T . . . . . C . . . . .

```

```

1510
DQ 629012Me T G G G A T T G C A G C G
DQ 628994Pa . . . . . C T G G . . .
Lspl(1) . . . . . C C T G G . . .
Lspl(2) . . . . . C C T G G . . .
Lspl(3) . . . . . C C T G G . . .
Lspl(7) . . . . . C C T G G . . .
Lspl(C6) . . . . . C C T G G . . .
Lm(4) . . . . . C T G G A . .
Lm(5) . . . . . C T G G A . .
AF093410L1 . . . . . C C T A . . .
DQ 628977Ls . . . . . C C T A . . .
DQ 628974Lk . . . . . C C T G . A . .
EF628241Ls . . . . . C T A . . . .
AF093409Tp . . . . . C C T G G . . .
EF628242Lsp . . . . . C T G . . . .
ASU62115Am . . . . . C T G . . . .

```