

CAROLINE FEIJÃO XIMENES

**TAXONOMIA E FILOGENIA DOS REPRESENTANTES DO
GÊNERO *Halimeda* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) NO
BRASIL**

RECIFE

2015

CAROLINE FEIJÃO XIMENES

**TAXONOMIA E FILOGENIA DOS REPRESENTANTES DO
GÊNERO *Halimeda* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) NO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

ORIENTADORA:

Dra. Sonia Maria Barreto Pereira

CO-ORIENTADORAS:

Dra. Maria Elizabeth Bandeira-Pedrosa

Dra. Valéria Cassano

RECIFE

2015

TAXONOMIA E FILOGENIA DOS REPRESENTANTES DO GÊNERO

Halimeda J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) NO BRASIL

Caroline Feijão Ximenes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica. Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientadora: _____

Dra. Sonia Maria Barreto Pereira

Titular / UFRPE

Examinadores: _____

Dra. Margareth Ferreira Sales

Titular / UFRPE

Dra. Enide Eskinazi Leça

Titular / UFPE

Dra. Ana Maria Benko Iseppon

Titular / UFPE

Dra. Juliana Santos Silva

Suplente / UNEB

Data da aprovação: 25/02/2015

RECIFE
2015

Dedicatória
Aos meus pais, Rosário e Pedro, por
serem pilares da construção do meu ser.

AGRADECIMENTOS

Por algum acaso, Deus me colocou sempre diante de surpresas na minha trajetória, e uma dessas, foi ter chegado ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, vindo de uma Graduação em Engenharia de Pesca. Muitas pessoas nunca entenderam bem como e por que cheguei nesse lugar, mas eu acredito que não foi por engano e nunca me arrependi dessa escolha.

Acima de qualquer coisa, agradeço a Deus pela dádiva de viver, por nunca me ter desamparado diante de momentos difíceis e nunca ter desistido de mim até quando eu mesma não acreditava.

Agradeço aos meus pais, Rosário e Pedro, por todo apoio a mim dado nessa trajetória. Principalmente pela compreensão da minha ausência em momentos familiares. Também agradeço aos demais familiares por existirem, levo-os no meu coração onde quer que eu vá.

À minha estimada orientadora Sonia Maria Barreto Pereira, por toda confiança depositada em mim, desde o começo e por ter me dado a oportunidade de executar um projeto de tão alto nível. Também agradeço pelo suporte afetivo e financeiro, pela compreensão e amizade.

À minha co-orientadora Valéria Cassano, por todo apoio científico dado à execução do projeto, na área de biologia molecular, por ter participado de todas as etapas de obtenção de resultados como também pelas valiosas correções e contribuições na parte escrita.

À minha co-orientadora Maria Elizabeth Bandeira-Pedrosa, não somente por ter compartilhado comigo seus conhecimentos, como também pela amizade, passeios e companhia.

À banca examinadora, às professoras Enide Eskinazi-Leça, Margareth Sales, Ana Benko e Juliana Santos pelas sugestões dadas para melhoria deste trabalho.

À minha amiga pessoal e grande colega de trabalho, Maria de Fátima de Oliveira Carvalho, por toda atenção a mim dedicada na qualidade de pesquisadora, pela confiança depositada e amizade sincera. Tenho certeza que não estaria aqui hoje, se não fosse com você. Você é inspiração de mulher guerreira e forte para todos nós.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, em especial as Professoras Carmem Zickel (Coordenadora) e Ariadne Moura (ex-vice-coordenadora) e também a Secretária Kênia Muniz, por toda dedicação em atender as necessidades de cada aluno.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD/CAPES (Proc. 02991/09-8) pelo suporte financeiro nas coletas realizadas nos diversos pontos do litoral brasileiro.

Aos colegas de laboratório Cássio, Mayara, Alanne, Samara, Vanessa, Leonardo, Fernando, Douglas e Manoel, pela vivência diária, por toda ajuda concedida em diversos momentos.

Aos alunos e técnicos do Laboratório de Algas Marinhas, em especial: Fernando, Mariana, Beatriz, Jana, Cintia Iha, Fábio, Talita, André, Fabiana, Alexandre, Vanessa, Karoline Magalhães, Amanda, William, Rosário e André Nakasato, por terem me recebido com afeto e terem acompanhado a minha trajetória durante os três meses e meio que estive na Universidade de São Paulo. Vocês foram imensamente importantes nesta etapa, pelos conhecimentos compartilhados e pela companhia em todos os momentos.

Aos professores do PPGB, em especial, às professoras Elcida, Margareth, Enide, e Patrícia, e aos professores Ênio e Ulysses, não somente pelas aulas ministradas, mas pelos ensinamentos que me trouxeram boas reflexões na minha vida acadêmica.

Aos amigos do grupo de dança de forró e gafieira do Instituto Oceanográfico da USP, por terem alegrado meu estágio nas horas vagas, vocês deram leveza aos meus dias e um colorido diferente nesta etapa tão difícil, em especial aos professores Daniel Hiroshi, Evandro Sanches e Roberto Valer e amigos Natasha Hoff e Rafael Vicente, os quais levarei no meu coração para o resto da vida.

Aos colegas de mestrado Rafael Prôta, Danilo, Diego, Raydrich, Silmar, Vanessa, Marcílio, Paulo, Rafaela e André Santos pelo companheirismo na caminhada.

As minhas amigas de Fortaleza, Renata Noronha e D'vila Maciel, por terem sido meus ombros amigos durante todo o percurso. Vocês serão sempre lembradas.

Ao meu querido Vilmes de Sena Trettel, pela amizade, carinho e disponibilidade de sempre, por ter me apresentado muitas coisas boas em São Paulo.

Enfim, todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente à execução deste trabalho, não cheguei até aqui sozinha, sempre tive muitas pessoas me ajudando nessa trajetória.

XIMENES, Caroline Feijão (MSc). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2015. TAXONOMIA E FILOGENIA DOS REPRESENTANTES DO GÊNERO *Halimeda* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) NO BRASIL. Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Barreto Pereira (UFRPE).

Resumo

Os representantes do gênero *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) possuem talo constituído por segmentos calcificados conectados entre si em junção nodal não calcificada. São contribuintes de sedimento calcário na plataforma continental, por apresentar carbonato de cálcio em forma de aragonita em suas paredes celulares. No Brasil, são reconhecidas sete espécies: *H. opuntia* (L.) J. V. Lamour., *H. tuna* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., *H. gracilis* Harv. ex J. Agardh, *H. incrassata* (J. Ellis) J. V. Lamour., *H. discoidea* Decne., *H. cuneata* K. Hering e *H. simulans* M. Howe. No entanto, devido à plasticidade fenotípica apresentada pelo gênero e à presença de espécies crípticas, este estudo teve como objetivo revisar o gênero *Halimeda* no litoral brasileiro com base em marcadores moleculares e morfológicos. Para isso, foram utilizadas amostras coletadas no litoral brasileiro no trecho compreendido entre o estado do Maranhão até o Espírito Santo, na região entremarés até 24 metros de profundidade. Para as análises moleculares dois marcadores plastidiais, *tufA* e *rbcL*, foram utilizados para inferir as relações filogenéticas das espécies que ocorrem no litoral brasileiro do gênero, bem como avaliar seus limites de variação inter e intraespecíficos. Foi gerado um total de 40 novas sequências, sendo 30 sequências de *tufA* e 10 de *rbcL*. As análises filogenéticas divergiram da morfologia para algumas espécies, mostrando que há espécies crípticas citadas para o Brasil, que podem ser novas espécies para o gênero. Das espécies previamente registradas para a costa brasileira, neste estudo foram confirmadas apenas as ocorrências de *H. opuntia*, *H. incrassata* e *H. simulans*. As demais divergiram geneticamente das amostras procedentes das localidades-tipo de cada uma, indicando tratar-se de novos táxons.

Palavras-chave: *tufA*, *rbcL*, espécies crípticas,

XIMENES, Caroline Feijão (MSc). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2015. TAXONOMY AND PHYLOGENY OF REPRESENTANTIVES OF GENUS *Halimeda* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) IN BRASIL. Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Barreto Pereira (UFRPE).

Abstract

The represents of the genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) present thalli composed of calcified segments interconnected by noncalcified nodal junctions. They contribute to the carbonate sediment on the continental shelf, due to the presence of calcium carbonate in the form of aragonite in their cell walls. In Brazil, seven species are recognized: *H. opuntia* (L.) J. V. Lamour., *H. tuna* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., *H. gracilis* Harv. ex J. Agardh, *H. incrassata* (J. Ellis) J. V. Lamour., *H. discoidea* Decne., *H. cuneata* K. Hering e *H. simulans* M. Howe. However, due to phenotypic plasticity showed by the genus and to the presence of cryptic species, this study aimed to confirm the occurrence of the species of the genus *Halimeda* on the Brazilian coast, based on molecular and morphological markers. For this, the samples were collected at Brazilian coast, from Maranhão to Espírito Santo, in the intertidal zone up to 24 meters deep. For molecular analyzes two plastid markers, *tufA* and *rbcL* were used to infer the phylogenetic relationships of species of the genus, and to evaluate their limits of variation inter- and intraspecific. A total of 40 new sequences were generated for both molecular markers, of which 30 sequences regarded *tufA* and 10 *rbcL*. Phylogenetic analysis diverged from morphology, showing that there are cryptic species cited for Brazil, which may be new species of the genus. From the species previously recorded for the Brazilian coast only occurrences of *H. opuntia*, *H. incrassata* and *H. simulans* were confirmed. The other diverged genetically from samples obtained from the type-localities of each, indicating the presence of new taxa.

Key-words: *tufA*, *rbcL*, cryptic species

Lista de Figuras

- Figura 1 – Mapa com a distribuição das espécies por localidade na qual foram obtidas as amostras. Fonte: Modificado de Oliveira-Carvalho *et al.* (2010)..... 36
- Figura 2 – Aspecto geral das espécies estudadas. (1) *Halimeda simulans*; (2) *H. incrassata*; (3) *H. gracilis*; (4) *H. cuneata*; (5) *H. discoidea*; (6) *H. tuna*; (7) *H. opuntia*. Escala: 1 cm..... 38
- Figura 3 – Árvore consenso de *Neighbour-joining* (NJ) enraizada pelos grupos externos *Caulerpa racemosa*, *Bryopsis plumosa* e *Derbesia marina* construída para as sequências do *tufA* de diferentes amostras de *Halimeda*. As sequências de *Bryopsis plumosa* e *Derbesia marina* foram omitidas da figura, para melhor visualização da árvore. Os valores de bootstrap maiores que 70% estão indicados nos ramos, Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) em itálico (2000 réplicas), máxima verossimilhança (ML) em negrito (100 réplicas) – NJ/MP/ML. As probabilidades *a posteriori* (*pp*) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda na figura. Os ramos com * indicam valores máximos de suporte para as quatro análises. As amostras brasileiras geradas nesse trabalho estão em negrito. O número de acesso para as amostras obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido pela localidade de coleta. LT indica a localidade-tipo..... 42
- Figura 4 - Árvore consenso de *neighbour-joining* (NJ) enraizada pelo grupo externo *Caulerpa racemosa* e *Bryopsis vestita* construída para as sequências do *rbcL* de diferentes amostras de *Halimeda*. Os valores de bootstrap estão indicados nos ramos, Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) em itálico (2000 réplicas), máxima verossimilhança (ML) em negrito (100 réplicas) – NJ/MP/ML. As probabilidades *a posteriori* (*pp*) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda na figura. Os ramos com * indicam que apresentaram valores máximos de suporte. As amostras brasileiras geradas nesse trabalho estão em negrito. O número de acesso das amostras obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido pela localidade de coleta. LT indica localidade tipo..... 43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação de <i>primers</i> direto (F) e reverso (R) para os marcadores utilizados na PCR e sequenciamento.....	33
Tabela 2 – Valores de divergência interespecífica para os representantes do gênero <i>Halimeda</i> coletados no litoral brasileiro, para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	41
Tabela 3 – Valores de divergência interespecífica para os representantes do gênero <i>Halimeda</i> coletados no litoral brasileiro, para o marcador <i>rbcL</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	44
Tabela 4 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de espécies de <i>H. opuntia</i> do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	46
Tabela 5 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de <i>H. opuntia</i> do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>rbcL</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	47
Tabela 6 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de <i>H. tuna</i> do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	49
Tabela 7 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de <i>H. tuna</i> do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>rbcL</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	50
Tabela 8 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de <i>H. cuneata</i> e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	51

Tabela 9 – Valores de divergência intraespecífica de <i>H. cuneata</i> para o marcador <i>rbcL</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	52
Tabela 10 – Valores de divergência intraespecífica de <i>H. discoidea</i> para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	53
Tabela 11 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de <i>H. gracilis</i> e espécies proximalmente relacionadas para o marcador <i>tufA</i> . Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.....	54

Sumário

1. Introdução Geral.....	13
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1. Revisão Taxonômica.....	16
2.2. Uso de Marcadores Moleculares na Taxonomia.....	18
Referências Bibliográficas.....	23
Manuscrito: Taxonomia e Filogenia dos representantes do gênero <i>Halimeda</i> J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Atlântico Sul Ocidental.....	27
Resumo.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	36
Referências.....	57
Apêndices.....	63
Apêndice 1 – Listagem das amostras brasileiras do gênero <i>Halimeda</i> obtidas no presente trabalho.....	63
Apêndice 2 - Sequências do gênero <i>Halimeda</i> J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador <i>tufA</i> , utilizadas nas análises filogenéticas.....	67
Apêndice 3 - Sequências do gênero <i>Halimeda</i> J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador <i>rbcL</i> , utilizadas nas análises filogenéticas.....	72
Normas da Revista European Journal of Phycology.....	73

1. Introdução Geral

A ordem Bryopsidales pertence ao filo Chlorophyta sendo representada por 540 espécies, agrupadas em 12 famílias, estando a família Halimedaceae, representada pelo gênero *Halimeda* J. V. Lamour., o qual engloba 43 espécies, distribuídas na região tropical e subtropical no mundo (GUIRY; GUIRY, 2015). Em relação à sua classificação infragenérica, as espécies estão agrupadas em cinco Seções com base em caracteres morfológicos e moleculares: *Rhipsalis* J. Agardh ex De Toni, *Opuntia* J. Agardh ex De Toni, *Halimeda* J. Agardh ex De Toni, *Micronesicae* Hillis e *Pseudo-opuntia* J. Agardh ex De Toni (KOOISTRA *et al.*, 2002).

As espécies do referido gênero possuem talo constituído por segmentos calcificados conectados entre si por sífões medulares em junção nodal não calcificada. A estrutura interna é constituída de filamentos medulares que se ramificam até o cortéx, terminando em utrículos periféricos (DIJOUX *et al.*, 2012). Podem crescer em substratos arenoso-lamosos, fixas por um apressório bulboso maciço de filamentos não organizados, circundados por areia, ou em substrato rochoso ou arenoso presas por filamentos frouxos ou emaranhados que saem da região medular do talo (HILLIS-COLINVAUX *et al.*, 1988).

Os representantes do gênero *Halimeda* são importantes contribuintes de sedimento calcário na plataforma continental de regiões tropicais e subtropicais (RIES, 2009), por apresentar carbonato de cálcio em forma de aragonita em suas paredes celulares, pois seus segmentos acumulam-se após a morte formando calcário recifal (HILLIS-COLINVAUX, 1980), o qual pode ser extraído para produção de cal e utilizado em rações para animais (BANDEIRA-PEDROSA *et al.*, 2004a).

Devido à sua importância nos ecossistemas marinhos, o gênero *Halimeda* tem recebido uma grande atenção na sua taxonomia, pois seus representantes apresentam diversidade de formas e habitat, além de marcado polimorfismo, dificultando a identificação e delimitação das espécies (VERBRUGGEN *et al.*, 2005a, b; DIJOUX *et al.*, 2012). Além disso, o gênero apresenta espécies crípticas (KOOISTRA *et al.*, 2002) e pseudo-crípticas (VERBRUGGEN *et al.*, 2005c).

Para a separação das espécies de *Halimeda* são levados em consideração caracteres morfológicos externos (hábito da planta, tamanho do talo, tipo de ramificação, formato do apressório, formato e tamanho dos segmentos basais e

superiores e grau de calcificação), internos (número de camadas da região cortical, formato, largura e comprimento dos utrículos primários, secundários e terciários, padrão de fusão nodal, aparência dos filamentos medulares) e reprodutivos (morfologia das estruturas de reprodução). No entanto, estes caracteres, só têm validade se forem abordados em conjunto, uma vez que isolados podem levar a identificações errôneas, tendo em vista a plasticidade morfológica apresentada pelo gênero (BANDEIRA-PEDROSA *et al.*, 2004a). Alguns autores hipotetizam que tal plasticidade seja uma resposta a influências ambientais. Hillis-Conlivaux (1980) observou diferenças entre exemplares mantidos em aquários e espécimes coletados em seu habitat natural. Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004a) atribuíram essa variação morfológica à exposição às ondas, enquanto Kooistra e Verbruggen (2005) relacionaram a plasticidade com a proximidade às áreas de manguezais.

No Brasil, são reconhecidas sete espécies: *H. opuntia* (L.) J. V. Lamour., *H. tuna* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., *H. gracilis* Harv. ex J. Agardh, *H. incrassata* (J. Ellis) J. V. Lamour., *H. discoidea* Decne., *H. cuneata* K. Hering e *H. simulans* M. Howe. (BANDEIRA-PEDROSA *et al.* 2004a), ocorrendo desde o litoral do Maranhão até Rio de Janeiro, sendo encontrada da zona entremarés até 116 metros de profundidade.

Devido à dificuldade de delimitar espécies de algas e estabelecer relações evolutivas entre linhagens fenotípicas com base apenas em caracteres tradicionais, como morfologia, anatomia, histórico de vida, entre outros, a tendência atual é utilizar dados moleculares, pois esses contêm informações obtidas direta ou indiretamente do genótipo (OLIVEIRA; MILSTEIN, 2010).

Vários estudos moleculares têm sido empregados na delimitação das espécies do gênero *Halimeda* em todo o mundo (KOOISTRA *et al.*, 2002; VERBRUGGEN *et al.*, 2005d; VERBRUGGEN *et al.*, 2007; DIJOUX *et al.*, 2012). Esses estudos ajudaram na compreensão das relações evolutivas entre os táxons, na descoberta de novas espécies e no diagnóstico de espécies crípticas (VERBRUGGEN *et al.*, 2005c) e pseudo-crípticas (VERBRUGGEN *et al.*, 2005d).

No Brasil, os estudos taxonômicos prévios realizados com este gênero, utilizaram caracteres morfo-anatômicos e ultraestruturais para identificação das espécies. Contudo, devido a plasticidade morfológica, Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004a) sugeriram o uso de técnicas de biologia molecular para confirmação da identificação das espécies no litoral brasileiro.

Neste contexto, esse trabalho tem por objetivo realizar um estudo taxonômico e filogenético visando contribuir para o conhecimento da diversidade e o esclarecimento das relações taxonômicas de espécies do gênero no litoral brasileiro com base em marcadores moleculares plastídias (*tufA* e *rbcL*) e morfológicos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Revisão Taxonômica

A primeira espécie descrita para o gênero *Halimeda* foi *H. tuna*, inicialmente denominada *Sertolara* pelo naturalista Imperato (1599), em um trabalho sobre a flora do Mar Mediterrâneo (HILLIS-COLINVAUX, 1980). Sloane (1707), em seu trabalho sobre a história natural da Jamaica, descreveu cinco espécies para o gênero *Corallina* L.: *C. incrassata* J. Ellis, *C. tridens* J. Ellis & Sol., *C. monile* J. Ellis & Sol., *C. opuntia* L. e *C. tuna* J. Ellis & Sol., as quais foram aceitas por Linnaneus (1767). Enquanto, Lamouroux (1816) separou as algas coralíneas em dois grupos *Corallina* (Corallinales – Rhodophyta) e *Halimeda*, transferindo as espécies descritas por Sloane (1707) para este gênero.

Após as descrições das primeiras espécies de *Halimeda*, J. Agardh (1887) reconheceu para o gênero quatro subcategorias informais de espécies, com base no formato dos segmentos e hábito, sendo eles denominados: *Tunae*, *Pseudo-opuntiae*, *Opuntiae* e *Rhipsales*. De Toni (1889) usou as descrições de Agardh (1887) e chamou essas subcategorias de Seções. Askenasy (1888) foi o pioneiro no uso de caracteres anatômicos na taxonomia do gênero, pois notou diferenças significativas nas dimensões e formas dos utrículos primários (periféricos).

A primeira revisão taxonômica para o gênero *Halimeda* no mundo foi realizada por Barton (1901) utilizando, de maneira pioneira, caracteres anatômicos para distinção de sete espécies do leste do Oceano Índico. A autora concluiu que o padrão de fusão dos filamentos medulares nodais era a característica mais consistente e com valor taxonômico significativo. A autora estabeleceu três padrões de fusão nodal: (1) todos os filamentos fundidos em um, às vezes com poros conspícuos entre filamentos adjacentes e, então, se separando; (2) filamentos fusionados aos pares, em curta distância e, então, se separando; (3) filamentos fusionados completamente em grupos de dois ou três e não se separando, se ramificando no segmento acima do nó.

Além do padrão de fusão nodal, a autora incluiu duas características para distinção das espécies: extensão da adesão dos utrículos periféricos e formato dos segmentos. Com isso, espécies com o mesmo padrão de fusão nodal, foram separadas pelo formato dos segmentos. No entanto, algumas espécies que apresentavam filamentos medulares não fusionados, como *H. cryptica* Hillis-Col. & E. A. Graham e

H. micronesica Yamada foram problemáticas para Barton, pois não se encaixavam em nenhum dos três padrões por ela estabelecidos.

Após a publicação de Barton (1901), vários pesquisadores passaram a examinar as coleções de herbários para testar a validade do sistema criado pela autora. Howe (1907) adicionou outras características úteis: tamanho dos utrículos secundários e diâmetro dos utrículos periféricos em vista superficial. Yamada (1941) acrescentou um novo padrão de fusão nodal: filamentos permanecendo separados no nó. Hillis-Collinvaux e Graham (1964) acrescentaram o padrão de nó composto de um único filamento (uniaxial).

A segunda revisão taxonômica para o gênero foi realizada por Hillis (1959) com coleções do Caribe, das Ilhas Marshall e do Oceano Pacífico, reconhecendo 21 espécies. Nessa revisão, a autora utilizou os caracteres já existentes e incluiu outros para a distinção das espécies, como: formato do apressório, aparência do talo, formato e tamanho dos utrículos e espessura do córtex.

Esse trabalho foi ampliado por Hillis-Collinvaux (1980) incluindo espécimes dos Oceanos Indo-Pacífico e Atlântico. Para a separação das espécies, a autora utilizou além dos caracteres macroscópicos e microscópicos usuais, a distribuição geográfica e aspectos ecológicos das espécies. Separou as espécies do Indo-Pacífico e do Atlântico, sendo poucas consideradas pantropicais. Nesse trabalho, a autora usou os padrões de fusão nodal para validar três Seções estabelecidas por De Toni (1889): *Halimeda*, *Opuntia* e *Rhipsalis*, extinguiu a Seção *Pseudo-opuntia*, migrando as espécies para a Seção *Halimeda* e criou duas novas Seções: *Crypticae* e *Micronesicae* para agrupar as espécies que possuem filamentos não fusionados na junção nodal, e se diferenciam por apresentarem distribuição restrita, enquanto *Crypticae* reunia as espécies que ocorriam no Mar do Caribe, *Micronesicae* continha espécies do Pacífico.

No Brasil, até o início de 2000 os representantes de *Halimeda* foram citados apenas em levantamentos florísticos gerais, dentre estes, podemos destacar Nassar (1994); Nunes (1998); Pereira; Accioly (1998); Pereira *et al.* (2002); Oliveira-Carvalho *et al.* (2003), entre outros.

Bandeira-Pedrosa *et al.*, (2004a) realizaram uma revisão do gênero para a costa brasileira com base em dados morfológicos e anatômicos, utilizado material coletado em médio e infralitoral, até a profundidade de 116 metros, e também examinaram exsicatas depositadas em herbários institucionais do Brasil. Nesse estudo foram registradas as ocorrências das seguintes espécies: *H. cuneata*, *H. opuntia*, *H. incrassata*,

H. gracilis, *H. tuna*, *H. discoidea*, *H. simulans* pertencentes às três Seções: *Rhipsalis*, *Opuntia* e *Halimeda*. Os autores ressaltaram a plasticidade morfológica observada entre as espécies, recomendando a realização de novas pesquisas para a delimitação segura delas.

Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004b) registraram, pela primeira vez, a ocorrência de *H. cuneata* para o Atlântico brasileiro. Os autores comentaram sobre abundância de material dessa espécie depositado em herbários brasileiros e identificado erroneamente como *H. discoidea* e *H. tuna* e, até mesmo, como *Halimeda* sp. Além da descrição morfológica detalhada, os autores descreveram pela primeira vez o gametângio e incluíram informações sobre ultraestrutura e histoquímica da espécie. Os autores sugeriram que a descoberta de *H. cuneata* no Brasil forneceu evidências adicionais sobre as semelhanças entre a flora marinha do Oceano Índico e do Sudoeste tropical do Atlântico.

De acordo com a revisão taxonômica realizada para o gênero a nível mundial por Hillis-Colinvaux (1980), foram reconhecidas 30 espécies, as quais foram agrupadas em cinco Seções: *Micronesicae*, *Cryptica*, *Opuntia*, *Halimeda* e *Rhipsalis* tendo como critério o padrão de fusão nodal. No Brasil, das sete espécies reconhecidas, estas foram agrupadas em três Seções (*Opuntia*, *Halimeda* e *Rhipsalis*) descritas por Hillis-Colinvaux (1980). As espécies brasileiras se distribuem do Maranhão ao Rio de Janeiro, no meso e infralitoral. Verifica-se que a maioria dos estudos referentes aos representantes do gênero *Halimeda* na costa brasileira foram baseados apenas nos caracteres morfológicos, e pouquíssimos com estudos ultraestruturais. Até o presente momento, nenhum estudo utilizou marcadores moleculares para confirmar a ocorrência das espécies brasileiras.

2.2. Uso de Marcadores Moleculares na Taxonomia

Há pelo menos duas décadas, houve a incorporação de métodos de filogenia molecular nos estudos de sistemática de algas e, com isso, vários estudos têm mostrado que o conhecimento taxonômico pode não corresponder à história evolutiva inferida a partir de sequências de DNA (VERBRUGGEN *et al.*, 2005b).

Hillis *et al.* (1998) iniciaram o uso da taxonomia molecular como ferramenta para inferir a validade das espécies tradicionalmente reconhecidas do gênero *Halimeda*. Os autores sequenciaram espécimes dos oceanos Atlântico, Pacífico e Mar

Mediterrâneo, utilizando a região 18S da subunidade pequena do ribossomo (SSU), e adotando 23 caracteres morfológicos na elaboração de análises cladísticas. Foram geradas árvores de máxima parcimônia com dados morfológicos e máxima verossimilhança com dados moleculares que, por sua vez, apresentaram topologia semelhante. No entanto, a gerada por sequências do 18S foi melhor resolvida. Os resultados apresentados neste trabalho, demonstraram o monofiletismo do gênero e das Seções *Halimeda* e *Rhipsalis*, e polifiletismo da Seção *Opuntia* incluindo representantes da Seção *Micronesicae* no mesmo clado. Estas Seções apresentam padrões nodais diferentes, enquanto a Seção *Opuntia* apresenta fusão nodal curta aos pares, a Seção *Micronesicae* apresenta filamentos não fusionados, mostrando que o marcador utilizado apresentou falhas na distinção destas Seções.

Com o mesmo marcador molecular utilizado por Hillis *et al.* (1998), Kooistra *et al.* (1999) inferiram a filogenia de 48 amostras de *Halimeda*, a qual revelou uma separação da Seção monofilética *Rhipsalis* entre o Atlântico Ocidental e Pacífico Ocidental. Além disso, os resultados apontaram que espécies morfológicamente semelhantes dentro desta Seção, como *H. monilis* (J. Ellis & Sol.) J.V. Lamour. (Atlântico Ocidental) e *H. cylindracea* Decne. (Pacífico Ocidental), não eram táxons irmãos, sugerindo que houve eventos vicariantes que separaram as regiões tropicais do Atlântico e Indo-Pacífico, explicando o padrão biogeográfico observado na Seção *Rhipsalis*.

Ainda utilizando o mesmo marcador, Kooistra *et al.* (2002) ampliaram o estudo de Hillis *et al.* (1998) e Kooistra *et al.* (1999) com 1250 pares de bases do gene SSU nrDNA, 5.8S rDNA e regiões espaçadoras internas (ITS-1 e ITS-2), para um número maior de espécies do gênero, inferindo extensas filogenias para examinar a evolução do fenótipo com traços do histórico de vida, e avaliar se a biogeografia e a ecologia dos recifes afetaram a evolução das espécies. A árvore inferida por análises multi-*loci* mostrou clados bem suportados correspondentes às cinco Seções do gênero *Halimeda*, mas algumas espécies permaneceram mal posicionadas. Os agrupamentos formados confirmaram a separação de espécies do Atlântico das do Indo-Pacífico, com exceção de *Halimeda opuntia*, que é uma espécie pantropical e formou um clado monofilético. Os autores constataram que as sinapomorfias morfológicas para cinco linhagens são bem suportadas; o último ancestral comum da Seção *Rhipsalis* invadiu substratos arenosos; os das Seções *Halimeda* e *Micronesicae* se estabeleceram em habitats com

hidrodinamismo moderado, e das Seções *Pseudo-opuntia* e *Opuntia* foram adaptados a ambientes fortemente protegidos e pastejados.

A mais recente revisão do gênero foi realizada por Verbruggen e Kooistra (2004) utilizando caracteres morfológicos e os mesmos marcadores nucleares e regiões espaçadoras internas utilizados por Kooistra *et al.* (2002). Os autores revisaram as identificações das espécies verificando as sinapomorfias dentro das linhagens e correlacionaram cada linhagem criada por Kooistra *et al.* (2002) com as Seções criadas por Hillis-Conlivaux (1980), reorganizando-as dentro de cada Seção.

Na tentativa de resolver problemas taxonômicos dentro do gênero, Verbruggen *et al.* (2005a) testaram a utilização de dados morfométricos aliados à filogenia inferida com marcadores nucleares. Com base em análises estatísticas, foi verificado que segmentos apicais não calcificados apresentam medidas fora dos padrões em morfologia e/ou anatomia, demonstrando a influência negativa destes segmentos sobre o valor taxonômico dos dados e que a omissão da morfometria dos segmentos não calcificados e apicais, bem como dos segmentos da região basal do talo produziu resultados melhores, levando os autores a recomendar a exclusão desses tipos de segmentos em estudos posteriores.

Com a recomendação da morfometria como ferramenta eficaz na distinção das espécies, Verbruggen *et al.* (2005b) incluíram em seu estudo filogenético, dados morfométricos, usando exemplares das cinco Seções do referido gênero (*Rhipsalis*, *Halimeda*, *Opuntia*, *Micronesicae* e *Pseudo-opuntia*), testando o uso da morfometria aliada às sequências parciais de ITS1–5.8S–ITS2. Os autores confirmaram a importância da morfometria junto à taxonomia clássica, não somente para problemas com espécies existentes como também na identificação de fósseis de espécies do gênero.

Devido a maior representatividade de espécies e maior dispersão da Seção *Halimeda*, Verbruggen *et al.* (2005c) sequenciaram a região ITS1–5.8S–ITS2 da SSU e sequências parciais do marcador plastidial UCP7 (*rps19–rps3*) de espécimes pertencentes à Seção *Halimeda*, para examinar os padrões biogeográficos dentro da Seção como um todo, avaliando o *status* filogenético de *H. cuneata*, *H. discoidea* e *H. tuna* e os padrões filogeográficos em *H. discoidea* e *H. cuneata*. Os resultados deste trabalho apontaram que cada uma das espécies, *H. cuneata*, *H. discoidea* e *H. tuna* compreendeu dois ou mais grupos de genótipos não reconhecidos primeiramente pela

taxonomia clássica. Isso mostrou que a morfologia não resolve problemas de divergência genotípica, confirmando a presença de diversidade críptica.

Com o intuito de delimitar as espécies da Seção *Rhipsalis*, Verbruggen *et al.* (2005d) sequenciaram regiões do DNA ribossomal nuclear (ITS1–5.8S–ITS2) e plastidial (*rps3*) e obtiveram dados morfométricos externos e anatômicos seguindo a metodologia proposta Verbruggen *et al.* (2005a). Análises filogenéticas foram inferidas a partir das sequências de DNA e os dados morfométricos foram submetidos a análises estatísticas: análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante (AD). Os resultados mostraram agrupamentos bem definidos, sem sobreposição de espécies, que foram nomeados com base em aspectos morfológicos. As análises estatísticas mostraram que a morfometria é uma ferramenta adequada para distinção de espécies dentro desta Seção e os caracteres anatômicos representam melhores marcadores do que a morfologia externa.

Tendo em vista as dificuldades na separação de alguns representantes da Seção *Opuntia* com base nas descrições dos “tipos”, Kooistra e Verbruggen (2005) sequenciaram regiões do DNA ribossomal nuclear (ITS1–5.8S–ITS2 SSU) das espécies *H. opuntia*, *H. distorta* (Yamada) Hillis-Col., *H. hederacea* Hillis-Col. e *H. minima* (W. R. Taylor) Hillis-Col. Os grupos morfológicos obtidos foram comparados com os cladogramas na filogenia para definir táxons monofiléticos e identificar seus limites. Com os dados morfológicos, os autores separaram as espécies em *H. opuntia* e o complexo “distorta-hederacea” e através dos dados de filogenia, separaram uma linhagem com *H. opuntia* e, uma segunda, contendo o complexo “distorta-hederacea”, corroborando os dois principais grupos morfológicos. Diante dos resultados, os autores sinonimizaram *H. hederacea* com *H. distorta* e a estrutura filogeográfica obtida indicou que *H. opuntia* se dispersou do Indo-Pacífico para o Atlântico.

Verbruggen *et al.* (2007) descreveram duas novas espécies: *H. pygmaea* H. Verbruggen, D.S. Littler & M.M. Littler e *H. pumila* H. Verbruggen, D.S. Littler & M.M. Littler, a partir de material coletado nas ilhas Fiji e Bahamas, respectivamente. Embora as espécies se assemelhassem à *H. cryptica* Hillis-Col. & E. A. Graham por ter um único sifão percorrendo os nós entre os segmentos calcificados, elas diferiram por apresentar medidas menores nos segmentos do talo, diâmetro dos filamentos na região nodal e no meio do segmento e nas dimensões dos utrículos (comprimento e diâmetro). Dados de DNA do cloroplasto sustentaram a identidade de *H. pygmaea* e revelaram sua posição filogenética como um táxon irmão de *H. cryptica* na Seção *Micronesicae*.

Dijoux *et al.* (2012) realizaram um levantamento florístico do gênero *Halimeda* na Nova Caledônia, usando os caracteres morfológicos (tipo de apressório, hábito da planta, forma da região basal do talo, formato do segmento, padrão de fusão nodal, camada de utrículos, dimensões dos utrículos primários, adesão dos utrículos após descalcificação e formato dos utrículos periféricos em vista superficial) e marcadores moleculares plastidiais (*tufA* e *rbcL*). Nesse trabalho, os autores observaram que os caracteres morfológicos externos podem ser usados para classificação primária dos indivíduos em morfotipos. Padrão de fusão nodal, tamanho e forma dos utrículos foram os caracteres mais confiáveis para separação das espécies. Os autores validaram o *tufA* como marcador do tipo DNA barcode para o delineamento de espécies de *Halimeda*, indicando novas ocorrências e revelando espécies crípticas.

Diante do exposto, pode-se observar que o uso de marcadores moleculares possibilitou esclarecer relações evolutivas das espécies, mostrando padrões biogeográficos de dispersão, os quais promoveu uma especiação reticulada que levou ao surgimento de novas espécies, bem como, à descoberta de espécies crípticas (HILLIS *et al.*, 1980; KOOISTRA; COPPEJANS; PAYRI, 2002; VERBRUGGEN *et al.*, 2005c; VERBRUGGEN, LITTLER, LITTLER, 2007; DIJOUX *et al.*, 2012). De acordo com os trabalhos abordados pode-se observar que os marcadores plastidiais corroboraram na delimitação das espécies dentro do gênero. No entanto, marcadores nucleares também foram úteis para separação de espécies dentro das Seções *Opuntia* e *Rhipsalis*.

Entre as Seções, a Seção *Halimeda* é a que engloba o maior número de espécies, muitas representadas por espécies crípticas e com ampla dispersão, sendo encontradas tanto no Oceano Pacífico como no Atlântico. Nos estudos moleculares, as Seções *Opuntia* e *Rhipsalis* encontram-se bem definidas. As Seções *Micronesicae* e *Pseudo-opuntia*, seus representantes ainda não foram objeto de estudo direcionado como as demais.

Atualmente, o gênero encontra-se representado por 43 espécies, mas sabe-se que devido a separação das linhagens do Indo-Pacífico das do Atlântico, há espécies citadas para o Atlântico, que ocorrem apenas no Indo-Pacífico, ocasionando numa subestimação no número de táxons infragenéricos (KOOISTRA; COPPEJANS; PAYRI, 2002; GUIRY; GUIRY, 2015). Para delimitação precisa do número de espécies contidas no gênero *Halimeda* são necessários estudos taxonômicos com uso de marcadores moleculares com novas descrições de espécies com locais de distribuição melhor definidos.

3. Referências Bibliográficas

AGARDH, J. G. Till algernes systematik. VIII. Siphoneae. **Acta Universitets Lund**, v. 3, n. 2, p. 1-174, 1887.

ASKENASY, E. Algen in der Forschungsreise SMS Gazelle. **Botanik**4, Berlin, 54pp, 1888.

BANDEIRA-PEDROSA, M. E.; PEREIRA, S. M. P., BOUZON, Z. L., OLIVEIRA, E. C. *Halimeda cuneata* (Bryopsidales, Chlorophyta), a new record for the Atlantic Ocean. **Phycologia**, v. 43, n. 1, p. 50-57, 2004.

BANDEIRA-PEDROSA, M. E.; PEREIRA, S. M. P.; OLIVEIRA, E. C. Taxonomy and distribution of the green algal genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.363-377, 2004.

BARTON, E. S. The genus *Halimeda*. **Monografia of the Siboga Expedition 60**. Brill, Leiden, 32pp, 1901.

DE TONI, G. B. Sylloge Algarum. **I Sylloge Chlorophycearum**, Padua, 1315 pp, 1889.

DIJOUX, L.; VERBRUGGEN, H.; MATTIO, L.; DOUNG, N.; PAYRI, C. Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: A combined morphological and molecular study. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 1465–1481, 2012.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. 2014. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 29 de fevereiro de 2015.

HILLIS-COLINVAUX, L. Ecology and taxonomy of *Halimeda*: Primary producer of coral reefs. In: BLAXTER, J. H. S.; RUSSEL, S. F. S.; YOUNGE, S. M. (Orgs.) **Advances in Marine Biology**, Londres: Academic Press Inc. Ltd., 1980, v. 17, p. 1-327.

HILLIS-COLINVAUX, L.; GRAHAM, E. A. A new species of *Halimeda*. **Nova Hedwigia**, v. 7, n. 1-2, p. 5-10, 1964.

HILLIS, L. A revision of the genus *Halimeda* (order Siphonales). **Publications of the Institute of Marine Science**, v. 6, p. 321–403, 1959.

HILLIS, L.W.; ENGMAN, J.A.; KOOISTRA, W.H.C.F. Morphological and molecular phylogenies of *Halimeda* (Chlorophyta, Bryopsidales) identify three evolutionary lineages. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 669–681, 1998.

HOWE, M. A. Phycological studies III. Further notes on *Halimeda* and *Avrainvillea*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 34, p. 491-516, 1907.

IMPERATO, F. **Dell' Historia Naturale, nella quale Ordinatamente si Tratta della Diversa Conditione di Miniere, e Pietre. Com Alcune Histoire de Piante e Animalli; sin' hora non data in Luce**, Naples, 1599. v. 28, 791 p.

KOOISTRA, W. H. C. F.; CALDERÓN, M; HILLIS, L.W. Development of the extant diversity in *Halimeda* is linked to vicariant events. **Hydrobiologia**, v. 398/399, p. 39–45, 1999.

KOOISTRA, W. H. C. F.; COPPEJANS, E. G. G.; PAYRI, C. Molecular systematics, historical ecology, and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p. 121–138, 2002.

KOOISTRA, W. H. C. F.; VERBRUGGEN, V. Genetic patterns in the calcified tropical seaweeds *Halimeda opuntia*, *H. distorta*, *H. hederacea*, and *H. minima* (Bryopsidales, Chlorophyta) provide insights in species boundaries and interoceanic dispersal. **Journal of Phycology**, v. 41, p. 177–187, 2005.

LAMOUREUX, J. V. F. Extrait d'un mémoire sur la classification des Polypiers coralligènes non entièrement pierreux. **Nouveaux Bulletin des Sciences, par la Société Philomathique de Paris**, v. 3, p. 181-188, 1816.

LINNANEUS, C. A. **Systema Naturae**. 10th Edn., Stockholm, v. 1, 1758, 828p.

OLIVEIRA, M. C.; MILSTEIN, D. Taxonomia Molecular. In: PEDRINI, A. G. (Org.) **Macroalgas: uma introdução à taxonomia**, Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010, 1 ed., p. 72-82.

OLIVEIRA-CARVALHO, M.F.; PEREIRA, S.M.B.; ZICKEL, C.S. 2003. Florística e distribuição espaço-temporal das clorofíceas bentônicas em trechos recifais do litoral norte do estado de Pernambuco, Brasil. **Hoehnea**, v. 30, n. 3, p. 201-212, 2003.

NASSAR, CRISTINA A. G. An assesment to the benthic marine algae at Trindade Island, Espírito Santo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3-4, p. 623, 1994.

NUNES, J.M. de C. Catálogo de algas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Malacitana**, v. 23, p. 5-21, 1998.

PEREIRA, S. M. B; M.C. ACCIOLY. Clorofíceas marinhas bentônicas da Praia de Serrambi, Pernambuco. **Acta Botânica Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 25-52, 1998.

PEREIRA, S.M.B., M.F. OLIVEIRA-CARVALHO, J.A. ANGEIRAS, M.E. BANDEIRA-PEDROSA, N.M.B. OLIVEIRA, J. TORRES, L.M.S. GESTINARI, A.L.M. COCENTINO, M.D. SANTOS, P.R.F. NASCIMENTO & D.R. CAVALCANTI. Algas marinhas bentônicas do Estado de Pernambuco 1. In: TABARELLI, M. & J.M.C. SILVA (Orgs.). **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**, Massangana, 2002.

SLOANE, H. **A Voyage to the Islands, Madera, Barbados, Nieves, St. Christophers and Jamaica**, v.1, 264 pp. Londres. 1907.

VERBRUGGEN, H.; KOOISTRA, W. H.C.F. Morphological characterization of lineages within the calcified tropical seaweed genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 213 – 228, 2004.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; COPPEJANS, E. G. G. Deviant segments hamper a morphometric approach towards *Halimeda* taxonomy. **Cryptogamie, Algologie**, v. 26, n. 3, p. 259-274, 2005a.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; COCQUYT, E.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. Morphometric taxonomy of siphonous green algae: A methodological study within the genus *Halimeda* (Bryopsidales), **Journal of Phycology**, v. 41, p. 126–139, 2005b.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; SCHILS, T.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. Evolution and phylogeography of *Halimeda* section *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 789–803, 2005c.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in *Halimeda* section *Rhpsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 41, p. 606–621, 2005d.

VERBRUGGEN, H.; LITTLER, D. S.; LITTLER, M. M.; *Halimeda pygmaea* and *Halimeda pumila* (Bryopsidales, Chlorophyta): two new dwarf species from fore reef slopes in Fiji and the Bahamas. **Phycologia**, v. 46, n. 5, p. 513–520, 2007.

VERBRUGGEN, H.; TYBERGHEIN, L.; PAULY, K.; VLAEMINCK, C.; VAN NIEUWENHUYZE, K.; KOOISTRA, W. H. C. F.; LELIAERT, F.; DE CLERCK, O. Macroecology meets macroevolution: evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda*. **Global Ecology and Biogeography**, v. 18, p. 393–405, 2009.

YAMADA, Y. Species of *Halimeda* in the South Sea. **Kagaku Nanyo**, v. 4, n.2, p. 108-121, 1941.

ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA:
EUROPEAN JOURNAL OF PSYCHOLOGY

Qualis Capes: B1
Fator de Impacto: 2.338

Taxonomia e Filogenia dos representantes do gênero *Halimeda* J. V. Lamour.

(Bryopsidales, Chlorophyta) no Atlântico Sul Ocidental

Caroline Feijão Ximenes^{ab}, Valéria Cassano^c, Maria Elizabeth Bandeira-Pedrosa^a,
Mariana Cabral de Oliveira^c, Sonia Maria Barreto Pereira^{ad}

^aPrograma de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

^bAutor correspondente. Email: carolinefeijao@gmail.com

^cInstituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, nº 277, 05508-090, São Paulo, Brasil

^dCentro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, S/N, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

O gênero *Halimeda* tem recebido uma grande atenção na sua taxonomia, pois apresenta marcado polimorfismo, dificultando a identificação e delimitação das espécies, além da ocorrência de espécies crípticas e pseudo-crípticas. Estudos recentes vêm utilizando a técnica DNA *barcoding* para distinção de espécies de clorofíceas, utilizando o marcador plastidial *tufA*. Este estudo teve como objetivo revisar o gênero para o Atlântico Sul Ocidental, baseado em marcadores morfológicos e moleculares. Amostras do litoral brasileiro desde o Maranhão até o Espírito Santo foram utilizadas para estudos moleculares. Foram obtidas sequências parciais dos marcadores *tufA* e *rbcL* as quais subsidiaram análises filogenéticas utilizando-se os métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Análise Bayesiana. *H. opuntia*, *H. simulans* e *H. incrassata* foram confirmadas por convergência filogenética com as sequências dos exemplares da localidade-tipo. *H. tuna*, *H. cuneata* e *H. gracilis* não se agruparam com as sequências das localidades-tipo, sugerindo serem novas espécies. *H. discoidea* tem sua localidade-tipo desconhecida, impossibilitando confirmação da sua identificação para o litoral brasileiro. Por sua vez, sequências nomeadas como *H. discoidea* se distribuíram em quatro clados diferentes. Devido ao conhecimento sobre a vicariância das espécies do Indo-Pacífico e do Atlântico e, sabendo-se que algumas espécies de macroalgas sofreram especiação reticulada, pode-se inferir que talvez tenha sido o que ocorreu com espécies *H. cuneata*, *H. tuna* e *H. gracilis* que foram previamente registradas no Brasil por apresentarem morfologia semelhante às descrições destas espécies, que foram primeiramente descritas no Indo-Pacífico. No presente trabalho, a eficiência do *tufA* como marcador do tipo Barcode foi corroborada, tendo sido eficiente na delimitação de espécies, inclusive revelando espécies novas, e, também, espécies crípticas.

Palavras-Chave: *DNA-barcoding*, *tufA*, *rbcL*, Brazil, macroalga, especiação

Introdução

O gênero *Halimeda* J. V. Lamour. (Bryopsidales – Chlorophyta), representado por 43 espécies (Guiry & Guriy, 2015), é um importante contribuinte de sedimento calcário na plataforma continental das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Ries, 2009) por apresentar carbonato de cálcio em forma de aragonita em suas paredes celulares (Hillis-Colinvaux, 1980), pois seus segmentos acumulam-se após a morte (Verbruggen *et al.*, 2009), formando calcário recifal, o qual pode ser extraído para produção de cal e utilizado em rações para animais (Bandeira-Pedrosa *et al.*, 2004a).

Devido à sua importância nos ecossistemas marinhos, o gênero *Halimeda* tem recebido uma grande atenção na sua taxonomia, pois estas macroalgas apresentam uma grande diversidade de formas e habitat, além de marcado polimorfismo, dificultando a identificação e delimitação das espécies (Verbruggen *et al.*, 2005a; Dijoux *et al.*, 2012). Além disso, o gênero contém espécies crípticas (Kooistra *et al.*, 2002) e pseudo-crípticas (Verbruggen *et al.*, 2005b). Estudos moleculares recentes vêm utilizando a técnica DNA *barcoding* para definição das espécies de macroalgas (Famá *et al.*, 2002; Saunders; Kucera, 2010). Dijoux *et al.* (2012) utilizaram o marcador plastidial *tufA* para delimitar espécies do gênero *Halimeda* na Nova Caledônia, comprovando a eficácia desse marcador para distinguir espécies crípticas.

No Brasil, os estudos previamente realizados sobre *Halimeda* utilizaram caracteres morfológicos e ultraestruturais para identificação das espécies, registrando a sua distribuição do Maranhão até o Rio de Janeiro, na zona entremarés até 166 metros de profundidade (Bandeira-Pedrosa *et al.*, 2004a, b). Sete espécies são reconhecidas no litoral brasileiro: *H. opuntia* (L.) J. V. Lamour., *H. tuna* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., *H. gracilis* Harv. ex J. Agardh, *H. incrassata* (J. Ellis) J. V. Lamour., *H. discoidea*

Decne., *H. cuneata* K. Hering e *H. simulans* M. Howe. No entanto, devido grande à plasticidade morfológica, à presença de espécies crípticas e, principalmente, pela falta de dados moleculares para as espécies do litoral brasileiro, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão do gênero *Halimeda* para o Brasil acrescentando análises moleculares com os marcadores plastidiais *tufA* e *rbcL*.

Material e Métodos

Área de Estudo

A costa brasileira possui 7.491 km, a qual foi dividida por Horta *et al.* (2001) em três províncias ficoflorísticas: Tropical, Zona de Transição e Temperada Quente. A região Tropical compreende o litoral do Nordeste e é caracterizada por águas oligotróficas que propiciam uma alta transparência, permitindo uma alta diversidade de espécies de macroalgas se estabelecerem em grandes profundidades da plataforma continental. A Zona de Transição compreende o litoral do Espírito Santo, que é caracterizada por apresentar características distintas devido ser banhado pela Corrente de Bengala oriunda da África, se constituindo num veículo de dispersão de espécies acarretando no alto grau de endemismo. A região Temperada Quente compreendendo desde o litoral do Rio de Janeiro até o Sul do Rio Grande do Sul, o qual apresenta períodos ressurgência na região de Cabo Frio (RJ).

Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas em diversos pontos do litoral brasileiro, durante o período de 2009 à 2014 (Apêndice 1) desde o litoral do Estado do Maranhão (02° 31' 47" S; 44° 18' 10" W) até o litoral do Estado do Espírito Santo (20° 19' 10" S; 40° 20' 16" W). As coletas foram realizadas na região entremarés e, quando possível, no infralitoral em profundidade de até 24 metros, através de mergulhos autônomos. Os espécimes foram acondicionados em etanol absoluto ou sílica gel para estudos morfológicos e moleculares.

Análise morfológica

A identificação taxonômica foi realizada no Laboratório de Ficologia do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram analisados os caracteres morfológicos internos e externos de acordo com Hillis-Conlivaux (1980) e Bandeira-Pedrosa *et al.*, (2004a). Para a análise da morfologia interna, as amostras foram descalcificadas com HCl (20%) e os filamentos foram dissociados com auxílio de estiletos. As observações e medições dos utrículos foram realizadas com auxílio de microscópio óptico (Zeiss Axioskop) com ocular micrométrica (Zeiss) e microscópio estereoscópico (Leica S6D). Os espécimes foram tombados e incorporados no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Extração de DNA e PCR.

Para a extração do DNA total, foram retirados fragmentos dos ápices dos talos das amostras coletadas (Apêndice 1), os quais foram escovados com escova de cerdas flexíveis para a retirada de epífitas. As amostras foram secas em papel absorvente e maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de pó fino. A extração do DNA foi realizada através de protocolo manual CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamonio) (Oliveira-Carvalho *et al.*, 2012).

Para a amplificação do gene *tufA*, foram utilizadas amostras de diferentes morfotipos e diferentes localidades. Para o *rbcL* foram sequenciadas apenas espécies diferenciadas geneticamente pelo *tufA*. Os *primers* utilizados para amplificar ambos marcadores estão listados na Tabela 1.

A reação de PCR foi realizada com volume final de 50 µL, sendo 37,25 µL de água mili-q autoclavada, 5 µL de 10x PCR buffer, 1,5 µL 50nM MgCl₂, 1 µL de dNTP, 1 µL de primer F, 1 µL de primer R, 3 µL de DNA total, 1,25 µL de *Taq* DNA polimerase (Promega Corp., Madison, WI, EUA). A reação foi realizada no termociclador Techne TC-4000 (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK). Para o *tufA* foi utilizado o ciclo seguindo Famá *et al.* (2002). Para o *rbcL*, o ciclo de PCR adotado foi de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto por 11 ciclos, em que a cada ciclo, a temperatura de anelamento diminuía 1 °C até atingir 45 °C de temperatura de anelamento dos *primers*, e 72 °C por 5 minutos para extensão final, mantendo-se assim por mais 24 ciclos, totalizando 35 ciclos (modificado de Curtis *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Relação de *primers* direto (F) e reverso (R) para os marcadores utilizados na PCR e sequenciamento.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
<i>tufAF</i>	5'- TGAAACAGAAMA WCGTCATTATGC-3'	Famá <i>et al.</i> , 2002
<i>tufAR</i>	5'- CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3'	Famá <i>et al.</i> , 2002
<i>rbcL</i> F22-41	5'- AAAGCNGGKGTWAAAGAYTA- 3'	Curtis <i>et al.</i> , 2008
<i>rbcL</i> F623-603	5'- TCWCAACCHTYTATGCGTTGG- 3'	Modificado de Curtis <i>et al.</i> , 2008
<i>rbcL</i> R689-667	3'- GCTTGWGM TTTTRTARATWGCTTC-5'	Dijoux <i>et al.</i> , 2012
<i>rbcL</i> R905-886	3'- TCAATAACCGCATGCATTGC-5'	Dijoux <i>et al.</i> , 2012
<i>rbcL</i> F427-449a	5'-CTTATGCWAAAACATTYCAAGG-3'	Modificado de Dijoux <i>et al.</i> , 2012
<i>rbcL</i> R1396-1372	3'- AATTTCTTTCCAAACTTCACAAGC-5'	Dijoux <i>et al.</i> , 2012

Os produtos de PCR foram purificados usando-se o Kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) segundo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados, utilizando-se o Kit de sequenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA), usando-se os mesmos *primers* da PCR. A reação foi feita com volume final de 10 µL (1 a 4 µL de produto purificado da PCR, 2 µL de 5x buffer, 2 µL de dideoxynucleosídeos, 2 a 5 µL de água mili-q autoclavada) e realizada no mesmo termociclador da PCR com 40 ciclos a 96 °C por 10 seg, 54 °C por 20 seg e 60 °C por 4 min.

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados em EDTA 125 mM, Acetato de Sódio 3M e etanol 100%, seguido de lavagem em etanol 70%, segundo recomendação da Applied Biosystems para a remoção de resíduos. As amostras foram sequenciadas nos sequenciadores automáticos ABI PRISM™ 3100 ou ABI PRISM™ 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas usando o programa BioEdit (Hall, 1999).

Um total de 87 sequências de *tufA* (Apêndice 2) e 36 de *rbcL* (Apêndice 3), geradas neste estudo e obtidas do Genbank, foi utilizado para compor as matrizes de sequências do gênero *Halimeda* para o mundo. Para as análises filogenéticas, o modelo de evolução foi selecionado pelo MrModeltest 3.06 (Posada; Crandall, 1998) usando-se o Akaike Information Criterion (AIC). As análises moleculares foram feitas utilizando-se o método de distância (Neighbour-Joining, NJ, com modelo de substituição Tamura; Nei, 1993, com 2000 réplicas de bootstrap), máxima parcimônia (MP, com busca heurística, com 2000 réplicas de bootstrap), e máxima verossimilhança (ML, com 100 réplicas de bootstrap) utilizando-se o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002); e

análise Bayesiana com o programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck; Ronquist, 2001), utilizando-se de 2 corridas com 4 cadeias de Markov, 4.000.000 de gerações com amostragens a cada 100, e as gerações iniciais correspondentes ao “burn in” foram descartadas. “Gaps” foram considerados dados faltantes e todas as posições foram consideradas com o mesmo peso.

Foram adotadas como grupo externo sequências de *Derbesia marina* (Lyngb.) Solier (JN645169), *Bryopsis plumosa* (Huds.) C. Agardh (JQ755423), *B. vestita* J.V. Lamour. (HF549172) e *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (AB038486). Para as matrizes tanto do *tufA* como do *rbcL*, foram calculadas as porcentagens de divergência intraespecíficas e interespecíficas usando-se uncorrected ‘p’ distances no PAUP.

Resultados e Discussão

Morfologia

Foram obtidas 37 amostras de *Halimeda* provenientes de seis estados brasileiros: Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Espírito Santo, coletadas na região entremarés e até 24 metros de profundidade (Fig. 1).

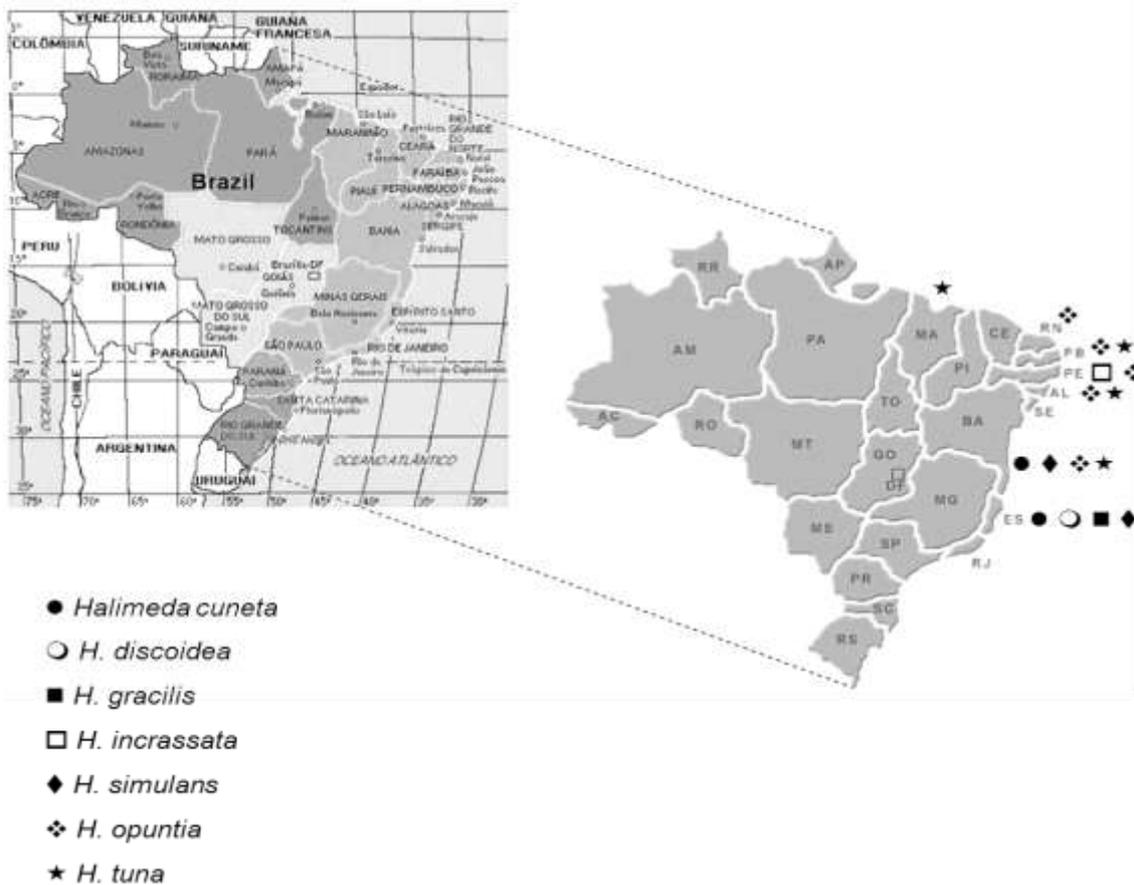


Figura 1 – Mapa com a distribuição geográfica das espécies do gênero *Halimeda* no litoral do Brasil (Adaptado de Oliveira-Carvalho *et al.* 2010).

Sete espécies tiveram suas ocorrências confirmadas para o Brasil, por dados morfológicos: *Halimeda incrassata* e *H. simulans* (Seção *Rhipsalis*); *H. opuntia* (Seção *Opuntia*); *H. discoidea*, *H. tuna* e *H. cuneata* (Seção *Halimeda*) e *H. gracilis* (Seção

Pseudo-opuntia) (Fig. 2), corroborando com os dados morfológicos apontados por Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004a).

As espécies da Seção *Rhipsalis* são distinguíveis das demais pela presença de apressório bulboso e de poros nodais na região nodal dos filamentos medulares (Hillis-Conlivaux, 1980; Bandeira-Pedrosa *et al.*, 2004a; Verbruggen; Kooistra, 2004). *Halimeda simulans* se distingue de *H. incrassata* por possuir apressório maior e por apresentar segmentos com formato diferentes, enquanto que *H. simulans* apresenta segmentos basais subcuneados e segmentos apicais reniformes e estriados; *H. incrassata* apresenta segmentos basais subcilíndricos. Anatomicamente, há diferença no aspecto dos utrículos primários entre essas espécies: *H. simulans* apresenta utrículos alongados e *H. incrassata* apresenta utrículos arredondados.

A Seção *Opuntia*, representada no Brasil apenas por *Halimeda opuntia*, é reconhecida pela presença de multiapressórios e por apresentar fusão nodal curta aos pares e, ocasionalmente, em grupo de três. *H. opuntia* apresentou uma maior área de distribuição, sendo registrada na costa do Nordeste, do litoral do Rio Grande do Norte até a Bahia, formando extensos bancos. Morfológicamente, essa espécie apresenta a maior plasticidade fenotípica com relação ao hábito e formato dos segmentos (Bandeira-Pedrosa *et al.* 2004a). Barton (1901) estabeleceu categorias infraespecíficas para agrupar a variação morfológica apresentada por essa espécie. Contudo, esses táxons foram elevados a categoria de espécies, como por exemplo, *Halimeda opuntia* var. *hederacea* (E.S.Barton) Hillis que passou a ser *H. hederacea* (E.S.Barton) Col. E, atualmente, está como sinônimo de *H. distorta* (Yamada) Hillis-Col. (Kooistra & Verbruggen, 2005).

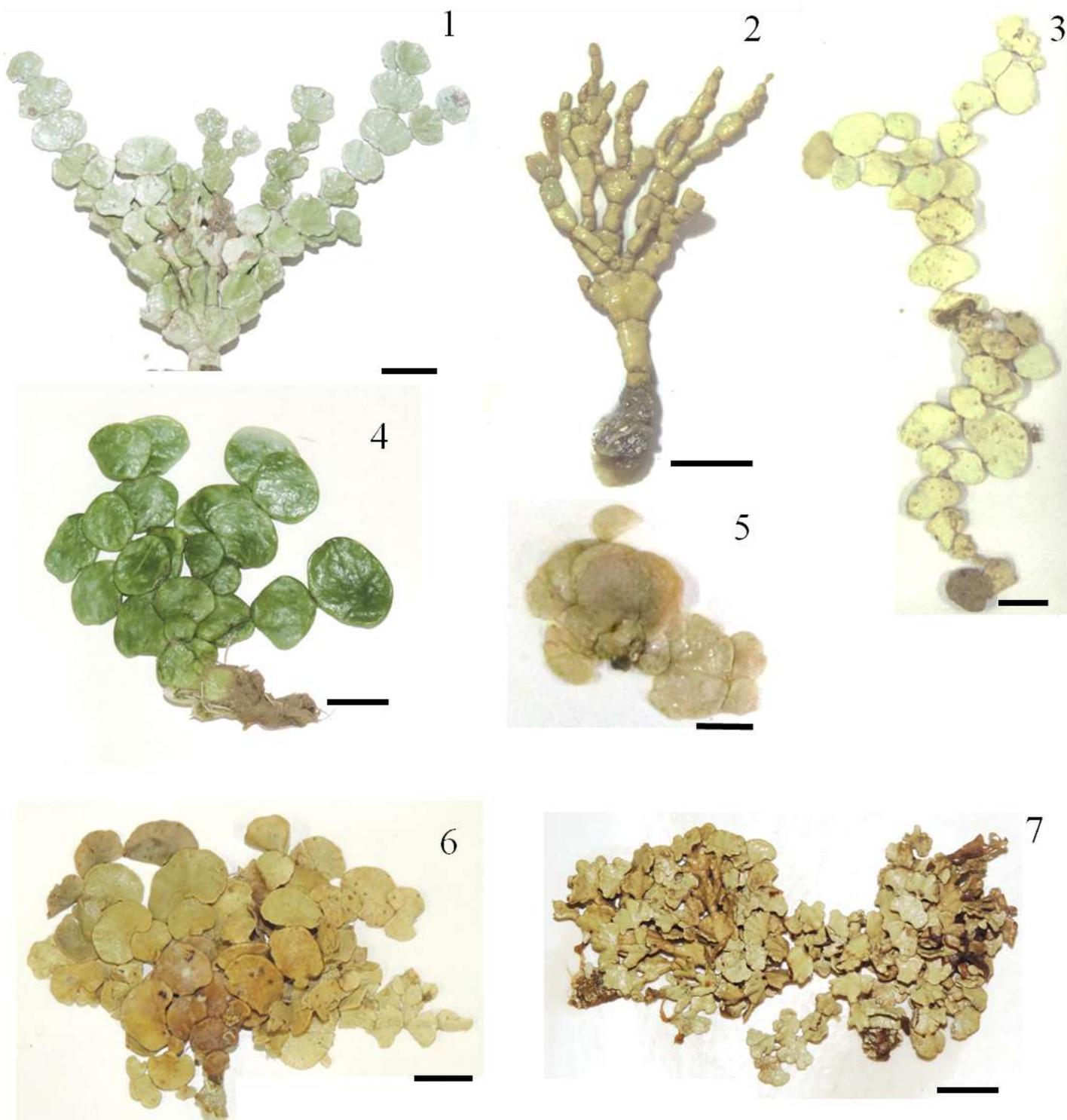


Figura 2 – Aspecto geral das espécies estudadas. (1) *Halimeda simulans*; (2) *H. incrassata*; (3) *H. gracilis*; (4) *H. cuneata*; (5) *H. discoidea*; (6) *H. tuna*; (7) *H. opuntia*.

Escala: 1 cm.

A Seção *Halimeda*, representada por *Halimeda cuneata*, *H. tuna* e *H. discoidea*, apresenta fusão nodal completa. *H. cuneata*, referida para o Atlântico por Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004b), apresenta apressório distinto, pequeno, filamentosos, talo pouco calcificado, medindo entre 4,8-9,7 cm de comprimento, ramificação di, tricotômica até policotômica e segmentos basais cilíndricos a subcilíndricos e, em grande parte, segmentos arredondados, subcuneados e discoides, medindo de 0,5-1,9 cm de largura e 0,4-1,4 cm de comprimento. É constituída por quatro ou cinco camadas de utrículos. Utrículos secundários medindo de 75-175 μm de comprimento, ramificando-se dicotomicamente. Utrículos primários, eventualmente fusionados, com formatos variados, medindo de 60-162,5 μm de comprimento e 50-75 μm de diâmetro. Filamentos medulares se fusionando completamente aos pares.

Halimeda tuna apresenta apressório distinto, cilíndrico, talo calcificado medindo entre 3,8-5 cm de comprimento, ramificação predominantemente dicotômica, podendo apresentar-se tricotômica e politômica, em vários planos, formando tufos densos, eretos, segmentos basais subcuneados e segmentos medianos e apicais reniformes, discoides e subcuneados, medindo de 0,5-1,1 cm de comprimento e 0,7-1,5 cm de largura. Anatomicamente, é constituída por três camadas de utrículos. Utrículos secundários medindo de 52,5-90 μm de comprimento, ramificando em dois ou quatro utrículos primários, alogados em forma de taça, medindo de 50-125 μm de comprimento e 27,5-50 μm de diâmetro. Filamentos medulares se fusionando completamente aos pares.

Halimeda discoidea apresenta apressório distinto, filamentosos, talo moderadamente calcificado medindo até 2,5 cm de comprimento, pouca ramificação, apresentando dicotomias e tricotomias, em mais de um plano, formando tufos densos, eretos, segmentos reniformes, grandes, medindo de 0,9-1,6 cm de comprimento e 1,5-2 cm de

largura. Anatomicamente, é constituída por duas camadas de utrículos. Utrículos secundários medindo de 115-225 μm de comprimento, ramificando em quatro utrículos primários, com ápice truncado, medindo 47,5-75 μm de diâmetro e 25-85 μm de comprimento. Utrículos primários fusionados em grupo de dois ou três. Filamentos medulares se fusionando curtamente ou completamente aos pares.

Halimeda gracilis, representante da Seção *Pseudo-opuntia*, também apresenta fusão longa aos pares ou em grupos de três; são fortemente calcificadas, medindo de 6-17 cm de comprimento do talo, sendo amostrada apenas em profundidade no litoral do Espírito Santo. Apresenta segmentos reniformes, cuneados e multilobados, medindo de 5,5-9 cm de comprimento e 7-13 cm de largura. É diferenciada das demais espécies por apresentar vários utrículos primários saindo de cada utrículo secundário, em alguns casos, não é possível mensurar pela sobreposição dos utrículos.

Análises moleculares

Um total de 37 sequências de *tufA* e 10 sequências de *rbcL* foram obtidas para o gênero *Halimeda* do litoral do Brasil. Não foi possível obter sequências de qualidade do marcador *rbcL* para as espécies *Halimeda gracilis* e *H. discoidea* e, por isso, essas espécies foram excluídas das análises. Para o gene *tufA* foi construída uma matriz com 120 sequências, acrescidas 83 sequências obtidas do GenBank (Apêndice 2), gerando um alinhamento final de 792 nucleotídeos. Para o gene *rbcL* foi construída uma matriz com 45 sequências, acrescidas 35 do GenBank (Apêndice 3) com um alinhamento final de 734 nucleotídeos.

As análises das 120 sequências do *tufA* (Fig. 3) e 45 sequências de *rbcL* (Fig. 4) confirmaram que o gênero *Halimeda* é monofilético com alto suporte para todas as

análises (99% de NJ; 100% de MP, 91% de ML, 100% de PP para o *tufA*) e (100% de NJ; 100% de MP, 95% de ML, 100% de PP para o *rbcL*). Cinco clados foram formados para ambos marcadores correspondentes às Seções do gênero *Halimeda*, com altos a moderados valores de suporte (> 70%), confirmando o monofiletismo das linhagens, exceto para a Seção Micronesicae que não teve suporte na análise de ML para o marcador *rbcL* e para a Seção *Halimeda*, que não apresentou suporte nas análises do *tufA* e teve suporte baixo para o *rbcL*.

A Tabela 2 mostra os valores de divergência interespecífica para o marcador *tufA*, que variou entre 0,9% (*Halimeda simulans* – *H. incrassata*) e 12,7% (*H. tuna* – *H. gracilis*). Para o *rbcL* (Tabela 3), a divergência interespecífica variou entre 0,8% (*H. simulans* – *H. incrassata*) e 11,7% (*H. simulans* – *H. cuneata*).

Tabela 2 – Valores de divergência interespecífica para os representantes do gênero *Halimeda* coletados no litoral brasileiro, para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>H. simulans</i>	ID	7	78	96	96-97	75	97
2. <i>H. incrassata</i>	0,9	ID	76	94	95-96	75	95
3. <i>H. opuntia</i>	9,9	9,6	ID	76	86-88	65	84
4. <i>H. tuna</i>	12,3	12	9,6	ID	68-72	100	68
5. <i>H. cuneata</i>	12,4	12	10,9-11,2	8,6-9,1	ID	97-98	70-73
6. <i>H. gracilis</i>	9,5	9,5	9,9	12,7	12,3	ID	96
7. <i>H. discoidea</i>	12,3	12	10,7	8,6	8,9-9,3	12,2	ID

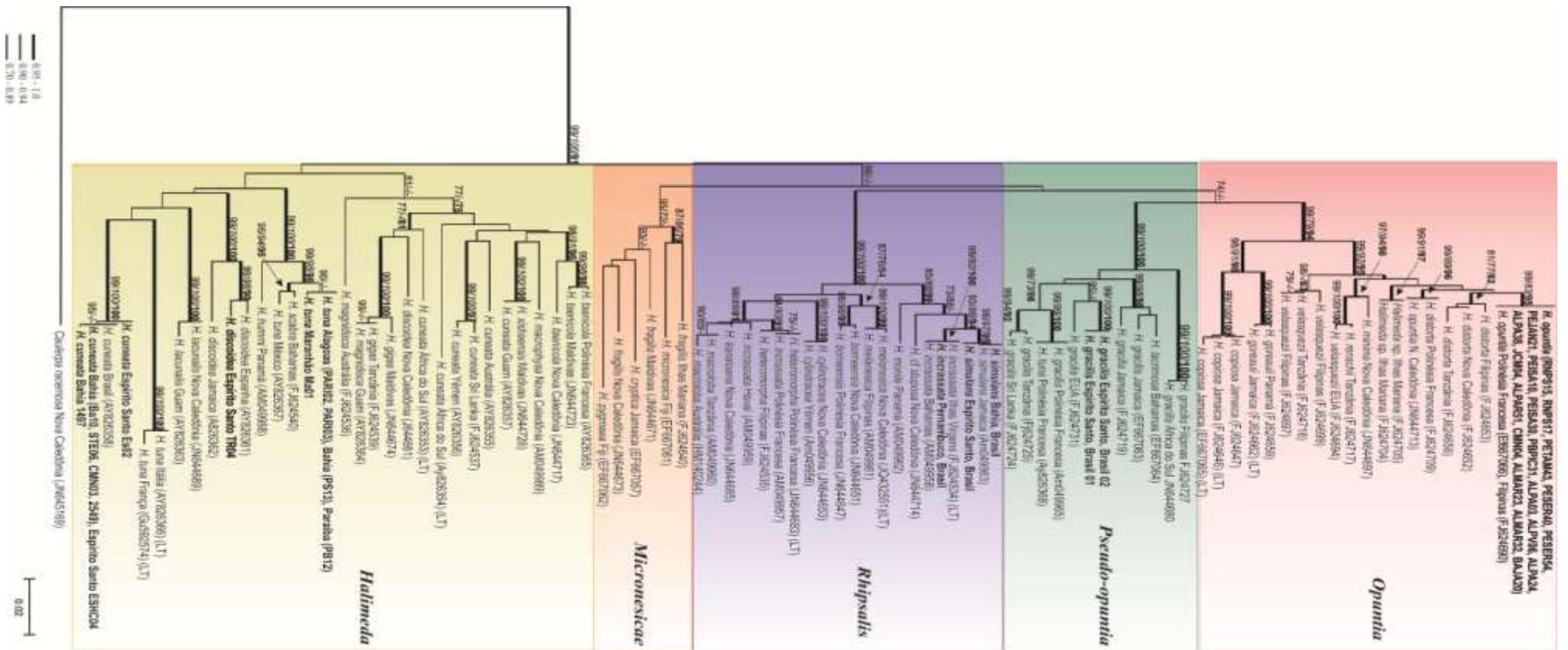


Figura 3 – Árvore consenso de *Neighbour-joining* (NJ) enraizada pelos grupos externos *Caulerpa racemosa*, *Bryopsis plumosa* e *Derbesia marina* construída para as 42 sequências do *tufA* de diferentes amostras de *Halimeda*. Os táxons *Bryopsis plumosa* e *Derbesia marina* foram omitidos da figura, para melhor visualização da árvore. Os valores de bootstrap maiores que 70% estão indicados nos ramos, Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) em itálico (2000 réplicas), máxima verossimilhança (ML) em negrito (100 réplicas) – NJ/MP/ML. As probabilidades *a posteriori* (pp) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda na figura. Os ramos com * indicam valores máximos de suporte para as quatro análises. As amostras brasileiras geradas nesse trabalho estão em negrito. O número de acesso para as amostras obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido pela localidade de coleta. LT indica a localidade-tipo.

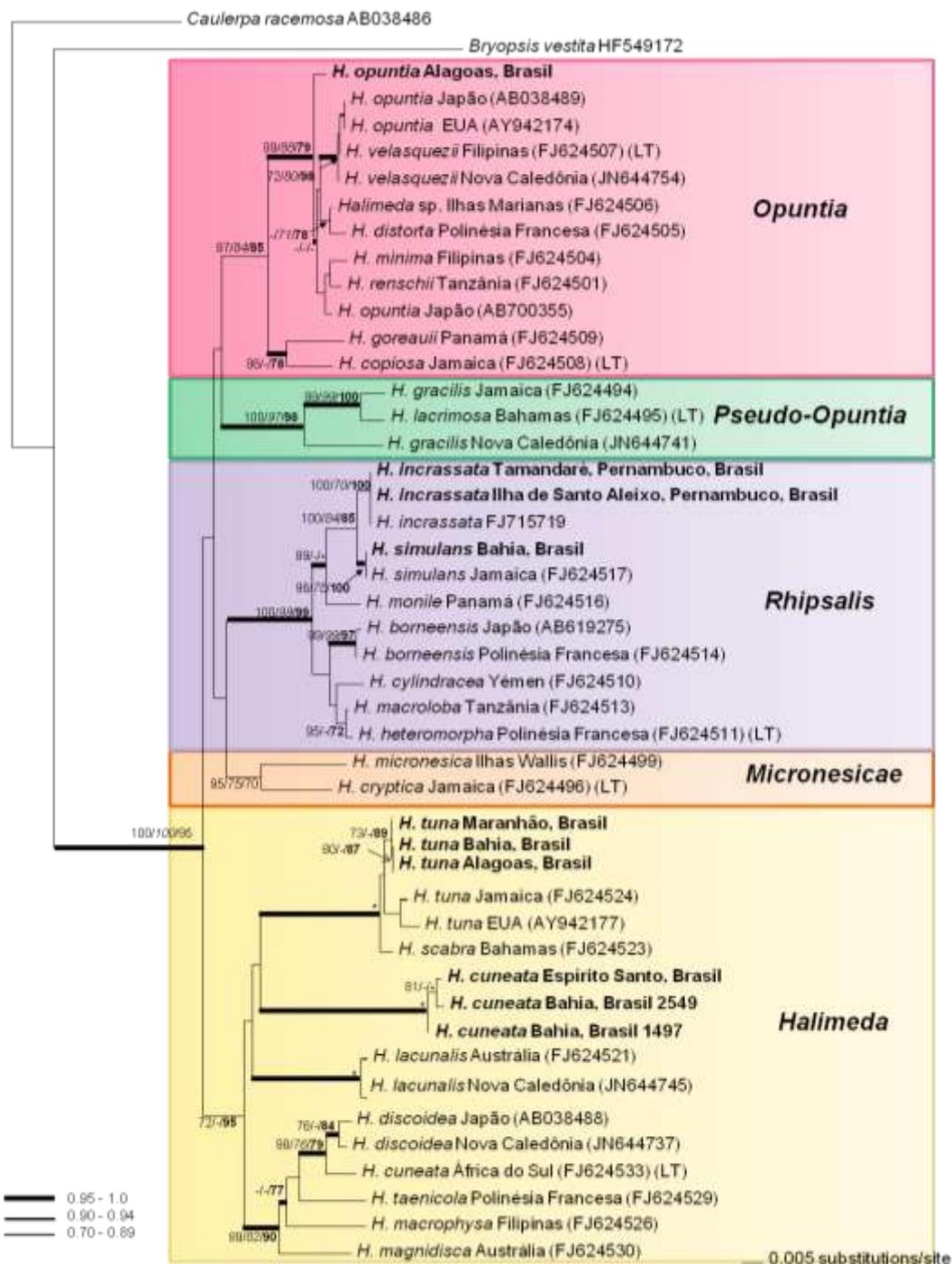


Figura 4 - Árvore consenso de *neighbour-joining* (NJ) enraizada pelo grupo externo *Caulerpa racemosa* e *Bryopsis vestita* construída com as sequências do *rbcL* de diferentes amostras de *Halimeda*. Os valores de bootstrap estão indicados nos ramos, Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) em itálico (2000 réplicas), máxima verossimilhança (ML) em negrito (100 réplicas) – NJ/MP/ML. As probabilidades *a*

posteriori (*pp*) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda na figura. Os ramos com * indicam que apresentaram valores máximos de suporte. As amostras brasileiras geradas nesse trabalho estão em negrito. O número de acesso das amostras obtidas no GenBank está entre parênteses, seguido pela localidade de coleta. LT indica localidade tipo.

Tabela 3 – Valores de divergência interespecífica para os representantes do gênero *Halimeda* coletados no litoral brasileiro, para o marcador *rbcL*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5
1. <i>H. opuntia</i>	ID	46	48-49	38	39
2. <i>H. tuna</i>	8,2	ID	47-48	54	53
3. <i>H. cuneata</i>	8,5-8,7	8,4-8,5	ID	65-66	64-64
4. <i>H. simulans</i>	6,8	9,6	11,6-11,7	ID	4
5. <i>H. incrassata</i>	7	9,4	11,4-11,6	0,8	ID

A Seção *Rhipsalis* representada pelas sequências de *Halimeda simulans* e *H. incrassata* do Brasil agruparam-se com suas respectivas sequências do banco de dados para ambos os marcadores, confirmando a identificação morfológica. A localidade-tipo de *H. simulans* é Porto Rico (Hillis-Colinvaux, 1980) e as sequências disponíveis no banco de dados para ambos marcadores são referidas para a Jamaica, portanto, região próxima à localidade tipo, ambas pertencentes ao Mar do Caribe. *Halimeda incrassata* possui como localidade-tipo as Ilhas Virgens Britânicas no Caribe (Guiry & Guiry, 2015). A sequência brasileira dessa espécie proveniente de Pernambuco não diferiu da sequência da localidade-tipo disponível no banco de dados para o *tufA* (FJ624534), confirmando que o material brasileiro corresponde de fato à *H. incrassata* (Fig. 3). A

sequência do *rbcL* de *H. incrassata* (FJ715719) não possui identificação de localidade, embora se agrupe com as sequências brasileiras dessa espécie, ambas de Pernambuco. *Halimeda simulans* e *H. incrassata* apresentaram as menores divergências interespecíficas para ambos os marcadores estudados, 0,9% para o *tufA* e 0,8% para o *rbcL* (Tabelas 2, 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Verbruggen *et al.* (2006) e Dijoux *et al.* (2012) com o *tufA* e também por Verbruggen *et al.* (2009) através de análises concatenadas de *rbcL*, *tufA*, UCP3, UCP7, 18S e ITS. Como verificado neste trabalho, essas espécies se agruparam em clados irmãos, confirmando a estreita relação entre elas (Hillis-Colinvaux, 1980).

A Seção *Opuntia*, representada neste estudo apenas por *H. opuntia*, formou um clado com suporte alto a moderado para ambos marcadores (Figs 3, 4). *Halimeda opuntia* é uma espécie pantropical, sendo a Jamaica sua localidade-tipo (Hillis-Colinvaux, 1980). As sequências do *tufA* de *H. opuntia* para diferentes estados brasileiros foram 100% idênticas e agruparam-se com duas outras amostras de *H. opuntia* do banco de dados (Polinésia Francesa e Filipinas), com valores de suporte altos (99% de NJ, 95% ML, 100% PP) a moderado (83% de MP), confirmando sua identificação morfológica e que a variação observada é apenas fenotípica, talvez influenciada por fatores ambientais (Hillis-Colinvaux, 1980; Bandeira-Pedrosa *et al.*, 2004a; Kooistra; Verbruggen, 2005). As porcentagens de divergência de *H. opuntia* e espécies molecularmente relacionadas são mostradas na Tabela 4.

De acordo com a divergência intraespecífica de *Halimeda opuntia* para o *tufA*, as sequências do Brasil foram 100% idênticas às amostras da Polinésia Francesa e Filipinas. Entretanto, as amostras brasileiras divergiram em 0,9% de *H. opuntia* da Nova Caledônia, que se agrupou com *H. distorta* da Polinésia Francesa (Fig. 3) com 0%

de divergência, indicando que são a mesma espécie e que, possivelmente, houve um erro de identificação dessa amostra.

Tabela 4 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de espécies de *H. opuntia* do Brasil e espécies proximamente relacionadas para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>H. opuntia</i> Polinésia Francesa	ID	0	7	0	7	8	12	9	10
2. <i>H. opuntia</i> Filipinas	0	ID	7	0	7	8	12	9	10
3. <i>H. opuntia</i> Nova Caledônia	0,9	0,9	ID	7	0	9	13	10	7
4. <i>H. opuntia</i> Brasil	0	0	0,9	ID	7	8	12	9	10
5. <i>H. distorta</i> Polinésia Francesa	0,9	0,9	0	0,9	ID	9	13	10	7
6. <i>H. distorta</i> Nova Caledônia	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	ID	4	3	8
7. <i>H. distorta</i> Tanzânia	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7	0,6	ID	7	10
8. <i>H. distorta</i> Filipinas	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	0,4	0,9	ID	11
9. <i>Halimeda</i> sp. Ilhas Marianas	1,3	1,3	0,9	1,3	0,9	1,1	1,3	1,4	ID

Para o *rbcL*, *Halimeda opuntia* foi agrupada com suporte alto (99% de NJ; 95% de PP) a moderado (88% de MP; 79% ML) e formou dois subclados, no qual *H. opuntia* do Brasil ocupou uma posição divergente inicial em relação a todas as demais (Fig. 4). Os dois subclados agruparam amostras de *H. opuntia* provenientes do Japão e dos Estados Unidos e outras amostras de *H. velasquezii* W. R. Taylor. As porcentagens de divergência deste clado são mostradas na Tabela 5.

Para o marcador *rbcL*, *Halimeda opuntia* do Brasil divergiu em 0,9% das demais sequências da mesma espécie depositadas no banco de dados e em 0,3% de *Halimeda* sp. das Ilhas Marianas e *H. distorta* da Polinésia Francesa. Considerando que a menor divergência interespecífica para o Brasil é 0,8% entre *H. simulans* e *H. incrassata*, então

H. opuntia estaria mais próxima de *Halimeda* sp. e *H. distorta*. Como observado, *H. distorta* da Polinésia Francesa é idêntica a *H. opuntia* da Nova Caledônia para o *tufA* (Tab. 4) e muito próxima a *H. opuntia* do Brasil para o *rbcL*, reafirmando que pode ter havido um erro na identificação dessa espécie. Ambas sequências de *tufA* e *rbcL* de *H. distorta* se referem ao mesmo voucher, portanto as sequências foram geradas a partir da mesma amostra.

Tabela 5 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de *H. opuntia* do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador *rbcL*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>H. opuntia</i> Brasil	ID	3	3	3	2	2	1	1	4	3
2. <i>H. opuntia</i> Japão 1	0,9	ID	4	4	3	3	2	2	3	3
3. <i>H. opuntia</i> Japão 2	0,9	1,2	ID	0	1	1	2	2	3	2
4. <i>H. opuntia</i> EUA	0,9	1,2	0	ID	1	1	2	2	3	2
5. <i>H. velasquezii</i> Filipinas	0,6	0,9	0,3	0,3	ID	0	1	1	4	2
6. <i>H. velasquezii</i> Nova Caledônia	0,6	0,9	0,3	0,3	0	ID	1	1	4	2
7. <i>Halimeda</i> sp. Ilhas Marianas	0,3	0,6	0,6	0,6	0,3	0,3	ID	0	3	2
8. <i>H. distorta</i> Polinésia Francesa	0,3	0,6	0,6	0,6	0,3	0,3	0	ID	3	3
9. <i>H. minima</i> Filipinas	1,2	0,9	0,9	0,9	1,2	1,2	0,9	0,9	ID	2
10. <i>H. renschii</i> Tanzânia	0,9	0,9	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,9	0,6	ID

A Seção *Halimeda*, na qual está incluída a maior parte das espécies do Brasil, apresentou de alto a baixo valores de *bootstrap* para as análises com o *rbcL* (95% ML; 72% NJ), assim como para a análise bayesiana (73%), e não apresentou suporte para nenhuma análise como marcador *tufA* (Fig. 4).

Nas análises do *tufA*, os representantes de *Halimeda tuna* do Brasil apresentaram baixa divergência intraespecífica (0% a 0,2%) e aparecem como grupo irmão do subclado formado por *H. tuna* do México e por *H. scabra* das Bahamas, com valores altos de *bootstrap* (99% NJ, 95% MP e 98% ML), porém com baixo suporte para a análise bayesiana (87%). Os valores de divergência para esse marcador são mostrados na Tabela 6. *Halimeda tuna* do Brasil apresentou menor divergência intraespecífica com *H. tuna* do México (1,2%) e divergiu em 0,7% de *H. scabra*, indicando que pode ter havido um erro de identificação dessa amostra ou que molecularmente podem se tratar de uma mesma espécie, embora sejam bem distintas com base em caracteres morfológicos (Hillis-Colinvaux, 1980). Os espécimes brasileiros não se agruparam com *H. tuna* da Itália e da França, países banhados pelo Mar Mediterrâneo, que é referido como sua localidade-tipo. A divergência entre os espécimes brasileiros e os da localidade tipo variou de 10,5%-19,9% (83-157pb). Vale ressaltar que as amostras da localidade tipo disponíveis no GenBank divergem entre si em 10% (79 pb). Uma mais alta divergência foi observada entre as amostras de *H. tuna* da localidade tipo e da Polinésia Francesa (15,5-24,3%, 122-192pb). A amostra da Polinésia Francesa (AY826368) agrupou-se com uma amostra de *H. gracilis*, da mesma localidade, com altos valores de *bootstrap*, dentro de outra Seção, *Pseudo-Opuntia* (Fig. 3). Possivelmente há um erro na identificação destes espécimes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kooistra *et al.* (2002) utilizando sequências de ITS e SSU (marcadores nucleares) e por Verbruggen *et al.* (2005) com o marcador plastidial *rps*, que ao estudar a evolução e filogeografia da Seção *Halimeda* encontraram uma divergência de 20% entre *Halimeda tuna* (Caribe) e *H. tuna* (Mar Mediterrâneo), sua localidade-tipo. Ambos trabalhos mostraram uma clara separação

entre *H. tuna* do Atlântico e do Mar Mediterrâneo. Verbruggen *et al.* (2005) observaram também que há separação entre as espécies do Indo-Pacífico e as do Atlântico, confirmando a hipótese de vicariância proposta por Kooistra *et al.* (1999) ocasionada pelo Istmo do Panamá.

Tabela 6 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de *H. tuna* do Brasil e espécies proximamente relacionadas para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6
1. <i>H. tuna</i> Itália (*)	ID	122	87	83	79	84
2. <i>H. tuna</i> Polinésia Francesa	15,5	ID	101	100	192	99
3. <i>H. tuna</i> México	11	12,8	ID	9	160	5
4. <i>H. tuna</i> Brasil	10,5	12,7	1,2	ID	157	6
5. <i>H. tuna</i> França (*)	10	24,3	20,3	19,9	ID	157
6. <i>H. scabra</i> Bahamas	10,7	12,5	0,7	0,8	19,9	ID

(*) Sequência da localidade-tipo: Mar Mediterrâneo.

Para o *rbcL*, as sequências brasileiras *H. tuna* se agruparam em um subclado, porém sem suporte para as análises de MP e PP e com baixo valor de *bootstrap* para NJ e ML (73% e 89%, respectivamente). Os espécimes brasileiros aparecem como grupo irmão do subclado formado por *H. tuna* da Jamaica e dos Estados Unidos, porém sem suporte para todas as análises. Nesse agrupamento, *H. scabra* das Bahamas ocupa uma posição divergente inicial formando um clado com alto suporte para todas as análises (Fig. 3). Os valores de divergência para esse agrupamento são mostrados na Tabela 7.

As sequências de *H. tuna* do Brasil apresentaram uma variação intraespecífica de (0,2-0,9%). A divergência intraespecífica entre os espécimes brasileiros e os da Jamaica e dos Estados Unidos variou de 0,62-0,93% (4-6 pb), indicando que todas se tratam da

mesma espécie. As sequências da Jamaica e dos Estados Unidos tiveram a menor divergência intraespecífica observada (0,31%, 2 pb). *Halimeda scabra* das Bahamas mostrou baixa divergência interespecífica com *H. tuna*, variando de 0,78-1,09% (5-7 pb), corroborando os resultados obtidos com o *tufA*, cuja divergência observada com os espécimes brasileiros foi de 0,7%. Não há sequências da localidade-tipo disponíveis no Genbank que permita uma comparação para o *rbcL*.

Tabela 7 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de *H. tuna* do Brasil e espécies proximalmente relacionadas para o marcador *rbcL*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4
1. <i>H. tuna</i> Brasil	ID	4	6	5
2. <i>H. tuna</i> Jamaica	0,62	ID	2	5
3. <i>H. tuna</i> EUA	0,93	0,31	ID	7
4. <i>H. scabra</i> Bahamas	0,78	0,78	1,09	ID

Os representantes brasileiros de *H. cuneata*, cuja distribuição foi ampliada para o Oceano Atlântico por Bandeira-Pedrosa *et al.* (2004b), se agruparam com alto suporte (99% NJ; 100% MP; 100% ML e 100% PP) para as análises com o *tufA* (Fig. 2) e se mantiveram separados dos demais espécimes sequenciados para outras partes do mundo, incluindo a localidade tipo, África do Sul. Os valores de divergência para esse marcador são mostrados na Tabela 8.

Halimeda cuneata apresentou uma variação intraespecífica de 0,2-0,7% (1-5 pb) para as sequências do Brasil; estas divergiram das sequências de diferentes países de 8,5-12,5% (67-99 pb). A maior divergência observada (12,5%) ocorreu entre amostras do Brasil e da África do Sul, que representa a localidade tipo de *H. cuneata*. Este valor é

considerado alto em comparação com a divergência interespecífica do gênero para o Brasil, indicando que a chamada *H. cuneata* brasileira possivelmente não é autêntica.

Tabela 8 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de *H. cuneata* e espécies proximamente relacionadas para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>H. cuneata</i> Sri Lanka	ID	77	80	78	60	74	46	51	6
2. <i>H. cuneata</i> Espírito Santo*	9,8	ID	4	1	67	97	74	72	78
3. <i>H. cuneata</i> Espírito Santo	10,2	0,6	ID	5	69	99	75	73	81
4. <i>H. cuneata</i> Bahia 1497	9,9	0,2	0,7	ID	68	98	75	73	79
5. <i>H. cuneata</i> África do Sul 1**	7,6	8,5	8,8	8,6	ID	65	46	43	58
6. <i>H. cuneata</i> África do Sul 2**	9,4	12,3	12,5	12,4	8,3	ID	59	59	76
7. <i>H. cuneata</i> Austrália	5,9	9,4	9,5	9,5	5,9	7,5	ID	37	45
8. <i>H. cuneata</i> Guam	6,5	9,1	9,3	9,3	5,5	7,5	4,7	ID	50
9. <i>H. cuneata</i> Yémen	0,8	9,9	10,3	10	7,4	9,6	5,7	6,4	ID

(*) Sequência retirada do Genbank. (**) Sequências da localidade-tipo: Natal, África do Sul.

Verbruggen *et al.* (2005) apontaram resultados semelhantes utilizando o marcador plastidial *rps* e o marcador nuclear ITS. Para o *rps*, *H. cuneata* do Brasil, divergiu em torno de 10% das demais, e em torno de 5% para o ITS, corroborando nossos dados. No presente trabalho, *H. cuneata* se posicionou em cinco clados diferentes nas análises com o *tufA*, inclusive as duas amostras da localidade tipo, que não se agruparam, posicionando-se em dois subclados distintos (Fig. 2). Em todas as análises realizadas, *H. cuneata* do Brasil não se agrupa com *H. cuneata* de outros lugares, incluindo a localidade tipo, reforçando a ideia de que *H. cuneata* do Brasil pode ser uma espécie nova.

Para o gene *rbcL*, *H. cuneata* formou um agrupamento com alto suporte em todas análises (Fig. 4). Os valores de divergência para esse marcador são mostrados na Tabela 9. A divergência intraespecífica entre os espécimes brasileiros variou de 0,17-0,34% (1-2 pb) e com a sequência da localidade tipo de 8,74-8,91% (52-53 pb).

Tabela 9 – Valores de divergência intraespecífica de *H. cuneata* para o marcador *rbcL*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4
1. <i>H. cuneata</i> Espírito Santo	ID	2	1	53
2. <i>H. cuneata</i> Bahia, 2549	0,34	ID	1	53
3. <i>H. cuneata</i> Bahia, 1497	0,17	0,17	ID	52
4. <i>H. cuneata</i> África do Sul (*)	8,91	8,91	8,74	ID

(*) Sequências da localidade-tipo: Natal, África do Sul.

Igualmente para o *rbcL*, as amostras brasileiras não se agruparam com *H. cuneata* da localidade-tipo, África do Sul, como também não se agruparam com nenhuma outra espécie do banco de dados, corroborando os resultados obtidos com o *tufA* e reforçando que o material brasileiro pode se tratar de uma espécie nova para o gênero *Halimeda*.

Para o marcador *tufA*, *Halimeda discoidea* formou agrupamento com a sequência proveniente da Espanha (AY826361) e apareceu como clado-irmão de *H. discoidea* da Jamaica (AY826362) com altos valores de suporte para as todas análises, e separada de *H. discoidea* da Nova Caledonia. A localidade-tipo referida para esta espécie é Kamtschatka, Rússia. Contudo, esta informação é duvidosa segundo Hillis-Conlivaux (1980). Sendo assim, não há como comparar a sequência do Brasil com a da localidade-

tipo a fim de confirmar a identificação desta espécie. A Tabela 10 apresenta os valores de divergência intraespecífica para as sequências disponíveis.

Tabela 10 – Valores de divergência intraespecífica de *H. discoidea* para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4
1. <i>H. discoidea</i> Espírito Santo	ID	8	34	80
2. <i>H. discoidea</i> Espanha	1	ID	30	79
3. <i>H. discoidea</i> Jamaica	4,3	3,8	ID	79
4. <i>H. discoidea</i> Nova Caledonia	10,1	10	10	ID

Halimeda discoidea apresentou divergência intraespecífica variando de 1-10,1% (8-80pb) em relação às sequências de diferentes países. A maior divergência observada (10,1%) ocorreu entre a amostra do Brasil e da Nova Caledonia e a menor (1%) entre Brasil e Espanha. Comparando estes valores, com a divergência interespecífica das espécies do Brasil, possivelmente estas quatro sequências, tratam-se de espécies diferentes. Verbruggen *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes, observando que houve formação de mais de um clado para as sequências de *Halimeda discoidea*, sendo a Seção *Halimeda*, um grupo formado por diversas espécies em processo de especiação reticulada e por apresentar espécies crípticas. Podemos perceber que as quatro espécies contidas nessa Seção, que ocorrem no Brasil, estão sob essa situação.

Para a Seção *Pseudo-opuntia*, cujos representantes foram agrupados com altos valores de *bootstrap* e probabilidade *a posteriori* para ambos marcadores, apenas

Halimeda gracilis ocorre no Brasil (Fig. 3). No entanto, não foi possível obter sequências de *rbcL* para essa espécie.

Nas análises com *tufA*, *H. gracilis* do Brasil não se agrupou com a sequência da localidade-tipo, Sri Lanka, sugerindo que talvez não sejam a mesma espécie. Os valores de divergência para esse marcador são mostrados na Tabela 11. Não houve divergência intraespecífica entre as sequências de *H. gracilis* do Brasil. A divergência intraespecífica para essa espécie variou de 0,3-7,2 % (2-57 pb). *Halimeda gracilis* do Brasil apresentou menor divergência intraespecífica com *H. gracilis* do EUA (2,4%, 19 pb) e divergiu em 3,8% (30 pb) de *H. gracilis* da localidade-tipo.

Tabela 11 – Valores de divergência intraespecífica e interespecífica de *H. gracilis* e espécies proximalmente relacionadas para o marcador *tufA*. Porcentagem de divergência está indicada na porção inferior e o número de nucleotídeos divergentes na porção superior. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>H. gracilis</i> EUA	ID	30	33	52	32	19	30	49	30
2. <i>H. gracilis</i> Jamaica 1	3,8	ID	14	57	34	25	32	55	31
3. <i>H. gracilis</i> Jamaica 2	4,2	1,8	ID	53	32	29	33	51	32
4. <i>H. gracilis</i> Filipinas	6,6	7,2	6,7	ID	51	53	51	4	49
5. <i>H. gracilis</i> Polinésia Francesa	4,1	4,3	4,1	6,5	ID	32	17	48	19
6. <i>H. gracilis</i> Brasil	2,4	3,2	3,7	6,7	4,1	ID	30	50	30
7. <i>H. gracilis</i> Tanzânia	3,8	4,1	4,2	6,5	2,2	3,8	ID	48	2
8. <i>H. gracilis</i> África do Sul	6,2	7,0	6,5	0,6	6,1	6,4	6,1	ID	46
9. <i>H. gracilis</i> Sri Lanka (*)	3,8	4,0	4,1	6,2	2,4	3,8	0,3	5,9%	ID

(*) Sequências da localidade-tipo.

O posicionamento filogenético e os valores de divergência encontrados indicam que *H. gracilis* do Brasil pode ser uma nova espécie. *Halimeda gracilis* das Filipinas (FJ624727) e da África do Sul (JN644680) foram as mais divergentes em relação às

demais amostras desta espécie (7-7,2%, 55-57 pb), e formaram um clado divergente inicial dentro de *Pseudo-opuntia* (Fig. 2), indicando que essas amostras podem não se tratar de *H. gracilis* e precisam ser revistas.

O percentual de divergência intraespecífica variou de 0-0,9% para o *tufA* e 0-1,2% para *rbcL*, enquanto que a variação interespecífica variou de 0,9-12,7% para o *tufA* e 0,8-11,7% para o *rbcL*.

De acordo com o conceito de espécies crípticas, que são espécies impossíveis de se definir com base apenas em caracteres morfológicos, e com o conhecimento prévio de que o gênero apresenta espécies crípticas e pseudo-crípticas, pode-se afirmar que das seis espécies estudadas nesse trabalho, três se encaixam no grupo das espécies crípticas (*H. cuneata*, *H. tuna* e *H. gracilis*), pois são morfológicamente compatíveis com as suas descrições, mas geneticamente diferentes das sequências das suas respectivas localidade-tipo. Dado o relato de que houve um evento vicariante que promoveu a divergência das espécies do Indo-Pacífico das do Atlântico (Kooistra *et al.*, 1999, 2002), e que algumas sofreram especiação reticulada, pode-se inferir que talvez tenham ocorrido com tais espécies no Brasil.

O marcador *tufA*, utilizado para inferências filogenéticas, também foi proposto como um marcador padrão para DNA *Barcoding* de macroalgas verdes marinhas (Saunders; Kucera, 2010), e tem sido utilizado no delineamento de espécies de *Halimeda* (Verbruggen *et al.*, 2009; Dijoux *et al.*, 2012). No presente trabalho, a eficiência do *tufA* como marcador do tipo Barcode foi corroborada, uma vez que este foi eficiente na delimitação de espécies, inclusive relevando espécies novas, e também na distinção de espécies crípticas.

Através do presente estudo, pode-se concluir que a utilização de marcadores moleculares mostrou-se bastante eficaz na delimitação taxonômica das espécies estudadas. Observou-se que das sete espécies previamente registradas para a costa brasileira (Bandeira-Pedrosa *et al.*, 2004a) apenas três foram confirmadas (*Halimeda opuntia*, *H. incrassata* e *H. simulans*) com base nos caracteres morfológicos e em sequências geradas para ambos marcadores plastidiais. As espécies previamente identificadas como *H. cuneata* e *H. gracilis* para o Brasil, tratam-se de táxons novos para o gênero. *Halimeda tuna* não se agrupou com as sequências da localidade tipo, Mar Mediterrâneo, e apareceu no mesmo clado que *H. scabra* e *H. tuna* do México, da Jamaica e dos Estados Unidos, indicando ser um epíteto mal aplicado para o Oceano Atlântico, e requer estudo mais aprofundado para alocar esse táxon (*Halimeda tuna*) sob novo epíteto. No entanto, *Halimeda discoidea*, que possui sua localidade-tipo desconhecida, apareceu em três agrupamentos distintos para o marcador *tufA*, sugerindo tratar-se três novos táxons.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia pela concessão de bolsa da primeira autora e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior através do Programa Nacional de Pós-Doutorado (Processo 02991/09-8) pelo suporte financeiro na obtenção de material botânico coletado no litoral brasileiro.

Referências

BANDEIRA-PEDROSA, M. E.; PEREIRA, S. M. P.; OLIVEIRA, E. C. (2004a).

Taxonomy and distribution of the green algal genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, **27** (2): 363-377.

BANDEIRA-PEDROSA, M. E.; PEREIRA, S. M. P.; BOUZON, Z. L.; OLIVEIRA, E.

C. (2004b). *Halimeda cuneata* (Bryopsidales, Chlorophyta), a new record for the Atlantic Ocean. *Phycologia*, **43** (1): 50-57.

BARTON, E. S. (1901) The genus *Halimeda*. *Monografia of the Siboga Expedition* 60.

Brill, Leiden, 32pp.

COCQUYT, E.; VERBRUGGEN, H.; LELIAERT, F.; DE CLERCK, O. (2010).

Evolution and cytological diversification of the green seaweeds (Ulvophyceae).

Molecular Biology and Evolution, **27**: 2052-2061.

CIANCIA, M., ALBERGHINA, J., ARATA, P. X., BENAVIDES, H., LELIAERT, F.,

VERBRUGGEN, H., ESTEVEZ, J. M. (2012) Characterization of cell wall

polysaccharides of the coenocytic green seaweed *Bryopsis plumosa* (Bryopsidaceae,

Chlorophyta) from the Argentine coast. *Journal of Phycology*, **48**: 326-335.

CURTIS, N.E., DAWES, C.J., PIERCE, S.K. (2008). Phylogenetic analysis of the large

subunit rubisco gene supports the exclusion of *Avrainvillea* and *Cladocephalus* from the

Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*. **44**: 761–767.

DIJOUX, L.; VERBRUGGEN, H.; MATTIO, L.; DOUNG, N.; PAYRI, C. (2012)

Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: A combined morphological and molecular study. *Journal of Phycology*, **48**: 1465–1481.

FAMÀ, P., WYSOR, B., KOOISTRA, W. H., ZUCCARELLO, G. C. (2002).

Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene1. *Journal of Phycology*, **38**(5): 1040-1050.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. (2015). **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 23 de Janeiro de 2015.

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

HANYUDA, T., ARAI, S., UEDA, K. (2000). Variability in the *rbcL* introns of Caulerpalean algae (Chlorophyta, Ulvophyceae). *Journal of Plant Research*. **113**: 403–413.

HANDELER, K., WAGELE, H., WAHRMUND, U., RUDINGER, M., KNOOP, V.

(2010). Slugs' last meals: molecular identification of sequestered chloroplasts from different algal origins in *Sacoglossa* (Opisthobranchia, Gastropoda). *Molecular Ecology Resources*, **10** (6): 968-978.

HILLIS-COLINVAUX, L. (1980). Ecology and Taxonomy of *Halimeda*: Primary Producer of Coral Reefs. *Advances in marine biology*, **17**: 1-327.

HORTA, P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. (2001) Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea*, **28**: 243-265.

HUELSENBECK J. P.; RONQUIST F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**: 754-755.

KOOISTRA, W. H. C. F.; CALDERIÓN, M; HILLIS, L.W. (1999). Development of the extant diversity in *Halimeda* is linked to vicariant events. *Hydrobiologia*, **398/399**: 39–45.

KOOISTRA, W. H. C. F.; COPPEJANS, E. G. G.; PAYRI, C. (2002) Molecular systematics, historical ecology, and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **24**: 121–138.

LAM, D.W., ZECHMAN, F.W. (2006). Phylogenetic analyses of the Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on rubisco large subunit gene sequences. *Journal of Phycology*. **42**: 669–678.

MAEDA, T., HIROSE, E., CHIKARAISHI, Y., KAWATO, M., TAKISHITA, K., YOSHIDA, T., VERBRUGGEN, H., TANAKA, J., SHIMAMURA, S., TAKAKI, Y.,

TSUCHIYA, M., IWAI, K. MARUYAMA, T. (2012). Algivore or phototroph? *Plakobranchnus ocellatus* (Gastropoda) continuously acquires kleptoplasts and nutrition from multiple algal species in nature. *PloS one*, 7(7), e42024.

OLIVEIRA-CARVALHO, M. D. F., OLIVEIRA, M. C., PEREIRA, S. M. B., VERBRUGGEN, H. (2012). Phylogenetic analysis of *Codium* species from Brazil, with the description of the new species *C. pernambucensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 47(4): 355-365.

POSADA, D., CRANDALL, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-8.

RIES, J. B. (2009). Effects of secular variation in seawater Mg/Ca ratio (calcite–aragonite seas) on CaCO₃ sediment production by the calcareous algae *Halimeda*, *Penicillus* and *Udotea* – evidence from recent experiments and the geological record. *Terra Nova*, 21: 323–339.

SAUNDERS, G. W., KUCERA, H. (2010). An evaluation of *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie. Algologie*, 31(4): 487-528.

SAUVAGE, T., PAYRI, C. E., DRAISMA, S. G. A., PRUD'HOMME VAN REINE, W. F., VERBRUGGEN, H., BELTON, G.S., GURGEL, C.F.D., GABRIEL, D., SHERWOOD, A. R., FREDERICQ, S. (2013). Molecular diversity of the *Caulerpa*

racemosa-Caulerpa peltata complex (Caulerpaceae, Bryopsidales) in New Caledonia, with new Australasian records for *C. racemosa* var. *cylindracea*. *Phycologia*, **52**: 6-13.

SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parismony, version 4.08a. *Computerprogram distributed by the Illinois Natural History Survey*, Champaign, Ill.

TAMURA, N.; 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 – 526.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; COCQUYT, E.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. (2005a). Morphometric taxonomy of siphonous green algae: A methodological study within the genus *Halimeda* (Bryopsidales). *Journal of Phycology*, **41**, 126–139.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; SCHILS, T.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. (2005b). Evolution and phylogeography of *Halimeda* section *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 789–803.

VERBRUGGEN, H.; DE CLERCK, O.; KOOISTRA, W. H.C.F.; COPPEJANS, E. (2005c). Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in *Halimeda* section *Rhipsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **41**, 606–621.

VERBRUGGEN, H., DE CLERCK, O., N'YEURT, A. D., SPALDING, H., VROOM, P. S. (2006). Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassata*, including descriptions of *H. kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, **41**(3): 337-362.

VERBRUGGEN, H., LITTLER, D. S., & LITTLER, M. M. (2007). *Halimeda pygmaea* and *Halimeda pumila* (Bryopsidales, Chlorophyta): two new dwarf species from fore reef slopes in Fiji and the Bahamas. *Phycologia*, **46**(5): 513-520.

VERBRUGGEN, H.; TYBERGHEIN, L.; PAULY, K.; VLAEMINCK, C.; VAN NIEUWENHUYZE, K.; KOOISTRA, W. H. C. F.; LELIAERT, F.; DE CLERCK, O. (2009) Macroecology meets macroevolution: evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda*. *Global Ecology and Biogeography*, **18**: 393–405.

WÄGELE, H., DEUSCH, O., HÄNDELER, K., MARTIN, R., SCHMITT, V., CHRISTA, G., PINZGER, B., GOULD, S. B., DAGAN, T., KLUSSMANN-KOLB, A. MARTIN, W. (2011). Transcriptomic evidence that longevity of acquired plastids in the photosynthetic slugs *Elysia timida* and *Plakobranthus ocellatus* does not entail lateral transfer of algal nuclear genes. *Molecular biology and evolution*, **28**(1): 699-706.

Apêndices

Apêndice 1 – Listagem das amostras brasileiras do gênero *Halimeda* obtidas no presente trabalho.

Estado	Espécie	Local de coleta (Praia, Município, Latitude, Longitude)	Coletor(es)	Marcadores		Voucher
				<i>tufA</i>	<i>rbcL</i>	
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia da Pajuçara, Pajuçara, 09°40'21"S, 35°42'43"W	S. Rodrigues	X		52096
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia da Pajuçara, Pajuçara, 09°40'21"S, 35°42'43"W	C. F. Ximenes, M. F. Oliveira-Carvalho, S. Rodrigues	X		52100
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia da Pajuçara, Pajuçara, 09°40'21"S, 35°42'43"W	C. F. Ximenes, M. F. Oliveira-Carvalho, S. Rodrigues	X		52101
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia de Maragogi, Maceió, 09°00'49"S, 35°13'04"W	C. F. Ximenes, M. F. Oliveira-Carvalho, S. Rodrigues	X		52098
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia de Paripueira, Maceió, 09°28'26"S, 35°32'37"W	C. F. Ximenes, M. F. Oliveira-Carvalho, S. Rodrigues	X	X	52099
AL	<i>H. opuntia</i>	Praia de Ponta Verde, Maceió, 09°39'39"S, 35°42'11"W	S. Rodrigues	X		52097
AL	<i>H. tuna</i>	Praia de Paripueira, Maceió, 09°28'26" S, 35°32'37"W	C. F. Ximenes, M. F. Oliveira-Carvalho, S. Rodrigues	X	X	52109
BA	<i>H. cuneata</i>	Praia do Espelho, Porto Seguro, 16°43'35.8"S, 39°07'27.8"W	B. N. Torrano-Silva, J. Pires, A. S. Santos	X	X	52075
BA	<i>H. cuneata</i>	Praia Ponta do Corumbau, Prado, 16°53'52.8"S, 39°06'34.7"W	B. N. Torrano-Silva, J. Pires, A. S. Santos	X	X	52076

(Cont.) Apêndice 1 – Listagem das amostras brasileiras do gênero *Halimeda* obtidas no presente trabalho.

Estado	Espécie	Local de coleta (Praia, Município, Latitude, Longitude)	Coletor(es)	Marcadores		Voucher
				<i>tufA</i>	<i>rbcL</i>	
BA	<i>H. cuneata</i>	Praia de Itacimirim, Camaçari, 12°36'50.0"S, 38°02'50.0"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X		52077
BA	<i>H. cuneata</i>	Praia de Stella Maris, Salvador, 12°55'51.3"S, 38°19'12.4"W	C. Azevedo, T. Vieira-Pinto, B. N. Torrano-Silva, M. Jamas	X		52079
BA	<i>H. cuneata</i>	Recifes de Caramuanos, Ilha de Itaparica, 13°07'55.3"S, 38°45'45.3"W	C. Azevedo, T. Vieira-Pinto, B. N. Torrano-Silva, M. Jamas	X		52080
BA	<i>H. opuntia</i>	Recifes de Caramuanos, Ilha de Itaparica, 13°07'55.3"S, 38°45'45.3"W	C. Azevedo, T. Vieira-Pinto, B. N. Torrano-Silva, M. Jamas	X		52102
BA	<i>H. opuntia</i>	Praia de Jauá, Camaçari, 12°49'51.0"S, 38°13'44.1"W	C. Azevedo, T. Vieira-Pinto, B. N. Torrano-Silva, M. Jamas	X		52103
BA	<i>H. opuntia</i>	Praia de Jauá, Camaçari, 12°49'51.0"S, 38°13'44.1"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X		52104
BA	<i>H. simulans</i>	Praia da Coroa, Ilha de Itaparica, 13°00'21.2"S, 38°38'16.0"W	C. Azevedo, T. Vieira-Pinto, B. N. Torrano-Silva, M. Jamas	X	X	52105
BA	<i>H. tuna</i>	Praia de Ondina, Porto Seguro, 13°00'40"S, 38°30'31"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X	X	52111

(Cont.) Apêndice 1 – Listagem das amostras brasileiras do gênero *Halimeda* obtidas no presente trabalho.

Estado	Espécie	Local de coleta (Praia, Município, Latitude, Longitude)	Coletor(es)	Marcadores		Voucher
				<i>tufA</i>	<i>rbcL</i>	
ES	<i>H. cuneata</i>	Praia de Castelhanos, Anchieta, 20°48'45.4"S, 40°38'05.6"W	F. Scherner	X		52078
ES	<i>H. cuneata</i>	Praia de Castelhanos, Anchieta, 20°48'45.4"S, 40°38'05.6"W	F. Scherner	X	X	52081
ES	<i>H. discoidea</i>	Arquipélago de Trindade, Vitória, 20°31'29"S, 29°19'29"W	M. Sissini	X		52082
ES	<i>H. gracilis</i>	Praia de Guarapari, Escalvada, 20°40'00"S, 40°29'00"W	F. Scherner	X		52083
ES	<i>H. gracilis</i>	Praia de Guarapari, Escalvada, 20°40'00"S, 40°29'00"W	F. Scherner	X		52084
ES	<i>H. simulans</i>	Arquipélago de Trindade, Vitória, 20°31'29"S, 29°19'29"W	M. Sissini	X		52106
MA	<i>H. tuna</i>	Parcel Manoel Luís, São Luiz, 00°50'00"S, 44°15'00"W	M. Sissini	X	X	52107
PB	<i>H. opuntia</i>	Picãozinho, João Pessoa, 07°06'54"S, 34°51'47.2"W	M. F. Oliveira-Carvalho, D. C. Burgos	X		52089
PB	<i>H. tuna</i>	Picãozinho, João Pessoa, 07°06'54"S, 34°51'47.2"W	M. F. Oliveira-Carvalho, D. C. Burgos	X		52108
PE	<i>H. incrassata</i>	Praia da Perua Preta, Tamandaré, 08°44'11"S, 35°05'18"W	D. C. Burgos	X	X	52085
PE	<i>H. incrassata</i>	Ilha de Santo Aleixo, Sirinhaém, 08°36'46.4"S, 35°01'22.6"W	M. F. Oliveira-Carvalho, D. C. Burgos		X	52086
PE	<i>H. opuntia</i>	Ilha de Santo Aleixo, Sirinhaém, 08°36'46.4"S, 35°01'22.6"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X		52090

(Cont.) Apêndice 1 – Listagem das amostras brasileiras do gênero *Halimeda* obtidas no presente trabalho.

Estado	Espécie	Local de coleta (Praia, Município, Latitude, Longitude)	Coletor(es)	Marcadores		Voucher
				<i>tufA</i>	<i>rbcL</i>	
PE	<i>H. opuntia</i>	Ilha de Santo Aleixo, Sirinhaém, 08°36'46.4"S, 35°01'22.6"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X		52091
PE	<i>H. opuntia</i>	Praia da Perua Preta, Tamandaré, 08°44'11"S, 35°05'18"W	D. C. Burgos , F. Scherner	X		52092
PE	<i>H. opuntia</i>	Praia do Janga, Paulista, 07°56'21"S, 34°49'35"W	D. C. Burgos	X		52093
PE	<i>H. opuntia</i>	Praia de Serrambi, Ipojuca, 08°33'30"S, 35°00'58"W	M. F. Oliveira-Carvalho	X		52094
PE	<i>H. opuntia</i>	Praia de Serrambi, Ipojuca, 08°33'30"S, 35°00'58"W	M.E. Bandeira-Pedrosa	X		52095
RN	<i>H. opuntia</i>	Recifes de Pirangi do Sul, Nísia Floresta, 05°59'01"S, 37°07'20"W	C. F. Ximenes, M. E. Bandeira-Pedrosa	X		52087
RN	<i>H. opuntia</i>	Recifes de Pirangi do Sul, Nísia Floresta, 05°59'01"S, 37°07'20"W	C. F. Ximenes, M. E. Bandeira-Pedrosa	X		52088

Apêndice 2 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Referência	Acesso Genbank
<i>Bryopsis plumosa</i> (Huds.) C. Agardh	Argentina	Ciancia <i>et al.</i> , 2012	JQ755423
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh	Nova Caledônia	Sauvage <i>et al.</i> , 2013	JN645169
<i>Derbesia marina</i> (Lyngb.) Solier	EUA	Saunders & Kucera, 2010	HQ610250
<i>Halimeda borneensis</i> W. R. Taylor	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644651
<i>H. borneensis</i>	Polinésia Francesa	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644647
<i>H. copiosa</i> Goreau & E. A. Graham	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667065
<i>H. copiosa</i>	Jamaica	Verbruggen. <i>et al.</i> , 2009	FJ624646
<i>H. copiosa</i>	Jamaica	Verbruggen. <i>et al.</i> , 2009	FJ624647
<i>H. cryptica</i> Hillis-Col. & E. A. Graham	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667057
<i>H. cuneata</i> K. Hering	África do Sul	Verbruggen. <i>et al.</i> , 2005b	AY826353
<i>H. cuneata</i>	África do Sul	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826354
<i>H. cuneata</i>	Sri Lanka	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624537
<i>H. cuneata</i>	Brasil	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826358
<i>H. cuneata</i>	Austrália	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826355
<i>H. cuneata</i>	Guam	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AY826357
<i>H. cuneata</i>	Yémen	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AY826356
<i>H. cylindracea</i> Decne.	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644653
<i>H. cylindracea</i>	Yémen	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049956
<i>H. discoidea</i> Descne.	Espanha	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826361

(cont.) Apêndice 2 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Referência	Acesso Genbank
<i>H. discoidea</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826362
<i>H. discoidea</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644661
<i>H. distorta</i> (Yamada) Hillis-Col.	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624653
<i>H. distorta</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624709
<i>H. distorta</i>	Nova Caledônia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624652
<i>H. distorta</i>	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624658
<i>H. fragilis</i> W. R. Taylor	Ilhas Mariana	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624640
<i>H. fragilis</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644673
<i>H. fragilis</i>	Maldivas	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644671
<i>H. gigas</i> W. R. Taylor	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624539
<i>H. gigas</i>	Maldivas	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644674
<i>H. goreauii</i> W. R. Taylor	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624662
<i>H. goreauii</i>	Panamá	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624659
<i>H. gracilis</i> Harv. ex J. Agardh	EUA	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624731
<i>H. gracilis</i>	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624725
<i>H. gracilis</i>	África do Sul	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624726
<i>H. gracilis</i>	Sri Lanka	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624724
<i>H. gracilis</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624719
<i>H. gracilis</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667063
<i>H. gracilis</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049965
<i>H. gracilis</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624727

(cont.) Apêndice 2 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Referência	Acesso Genbank
<i>H. gracilis</i>	África do Sul	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644680
<i>H. heteromorpha</i> N'Yeurt	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624535
<i>H. heteromorpha</i>	Polinésia Francesa	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644683
<i>H. hummii</i> D. L. Ballant.	Panamá	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AM049988
<i>H. incrassata</i> (J. Ellis) J. V. Lamour.	Havaí	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049959
<i>H. incrassata</i>	Ilhas Virgens Britânicas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	FJ624534
<i>H. incrassata</i>	Bahamas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049958
<i>H. incrassata</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049957
<i>H. kanaloana</i> Vroom	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644685
<i>H. lacrimosa</i> M. Howe	Bahamas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667064
<i>H. lacunalis</i> W. R. Taylor	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644689
<i>H. lacunalis</i>	Guam	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826363
<i>H. macroloba</i> Decne.	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049960
<i>H. macroloba</i>	Austrália	Waegele <i>et al.</i> , 2011	HM140244
<i>H. macrophysa</i> Askenasy	Nova Caledônia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AM049989
<i>H. magnidisca</i> Noble	Guam	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	AY826364
<i>H. magnidisca</i>	Austrália	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624536
<i>H. melanesica</i> Valet	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JQ432551
<i>H. melanesica</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049961
<i>H. micronesica</i> Yamada	Fiji	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667061
<i>H. minima</i> (W. R. Taylor) Hillis-Col.	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644697

(cont.) Apêndice 2 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Referência	Acesso Genbank
<i>H. monile</i> (J. Ellis & Sol.) J.V. Lamour.	Panamá	Verbruggen <i>et al.</i> , 2006	AM049962
<i>H. opuntia</i> J.V. Lamour.	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667066
<i>H. opuntia</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624690
<i>H. opuntia</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644713
<i>H. pygmaea</i> Verbruggen, Littler & Littler	Fiji	Verbruggen <i>et al.</i> , 2007	EF667062
<i>H. renschii</i> Hauck	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624717
<i>H. scabra</i> M. Howe	Bahamas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624540
<i>H. simulans</i> M. Howe	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> 2006	AM049963
<i>H. taenicola</i> W. R. Taylor	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826365
<i>H. taenicola</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644717
<i>H. taenicola</i>	Maldivas	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644723
<i>H. tuna</i> (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour.	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826368
<i>H. tuna</i>	México	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826367
<i>H. tuna</i>	Itália	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826366
<i>H. tuna</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2005b	AY826368
<i>H. tuna</i>	França	Handeler <i>et al.</i> , 2010	GU592574
<i>H. velasquezii</i> W. R. Taylor	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624718
<i>H. velasquezii</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624699
<i>H. velasquezii</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624697
<i>H. velasquezii</i>	EUA	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624694
<i>H. xishaensis</i> Tseng & Dong	Maldivas	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644728

(cont.) Apêndice 2 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Referência	Acesso Genbank
<i>Halimeda</i> sp.	Ilhas Marianas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624704
<i>Halimeda</i> sp.	Ilhas Marianas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624705
<i>Halimeda</i> cf. <i>stuposa</i> W. R. Taylor	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644714

Apêndice 3 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *rbcL*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Autores	Acesso Genbank
<i>Bryopsis vestita</i> J. V. Lamour.	Nova Zelândia	Hollants <i>et al.</i> , dados não publicados	HF549172
<i>Caulerpa racemosa</i>	Japão	Hanyuda <i>et al.</i> , 2000	AB038486
<i>Halimeda borneensis</i>	Japão	Maeda <i>et al.</i> , 2012	AB619275
<i>H. borneensis</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624514
<i>H. copiosa</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624508
<i>H. cryptica</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624496
<i>H. cuneata</i>	África do Sul	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624533
<i>H. discoidea</i>	Japão	Hanyuda <i>et al.</i> , 2000	AB038488
<i>H. discoidea</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644737
<i>H. distorta</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624505
<i>H. goreauii</i>	Panamá	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624509
<i>H. gracilis</i>	Jamaica	Verbruggen. <i>et al.</i> , 2009	FJ624494
<i>H. gracilis</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644741
<i>H. heteromorpha</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624511
<i>H. incrassata</i>	-	Cocquyt <i>et al.</i> , 2010	FJ715719
<i>H. lacrimosa</i>	Bahamas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624495
<i>H. lacunalis</i>	Austrália	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624521
<i>H. lacunalis</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644745
<i>H. macroloba</i>	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624513
<i>H. macrophysa</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624526
<i>H. magnidisca</i>	Austrália	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624530
<i>H. micronesica</i>	Ilhas Wallis	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624499
<i>H. minima</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624504
<i>H. monile</i>	Panamá	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624516
<i>H. opuntia</i>	Japão	Hanyuda <i>et al.</i> , 2000	AB038489
<i>H. opuntia</i>	USA	Lam & Zechman, 2006	AY942174
<i>H. opuntia</i>	Japão	Maeda <i>et al.</i> , 2012	AB700355
<i>H. renschii</i>	Tanzânia	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624501
<i>H. scabra</i>	Bahamas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624523
<i>H. simulans</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624517
<i>Halimeda</i> sp.	Ilhas Mariana	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624506

Apêndice 3 - Sequências do gênero *Halimeda* J. V. Lamour. obtidas do banco de dados GenBank do marcador *rbcL*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Localização	Autores	Acesso Genbank
<i>H. taenicola</i>	Polinésia Francesa	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624529
<i>H. tuna</i>	Flórida	Lam & Zechman, 2006	AY942177
<i>H. tuna</i>	Jamaica	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624524
<i>H. velasquezii</i>	Filipinas	Verbruggen <i>et al.</i> , 2009	FJ624507
<i>H. velasquezii</i>	Nova Caledônia	Dijoux <i>et al.</i> , 2012	JN644754

Instructions for Authors

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

European Journal of Phycology is an international journal that publishes papers on all aspects of the ecology, physiology, biochemistry, cell biology, molecular biology, systematics and uses of algae (including cyanobacteria). The criterion for publication is scientific merit. Purely descriptive papers and preliminary notes will not be accepted. Papers reporting new methods will not be considered unless they include analysis of substantial data. Submitted manuscripts must not have been accepted for publication or be under consideration elsewhere. It is the responsibility of authors to ensure that nothing in a submitted manuscript would be in breach of any copyright agreement. On acceptance of a manuscript, copyright is transferred to the journal.

Please note that **European Journal of Phycology** uses [CrossCheck™](#) software to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to **European Journal of Phycology** you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer review and production processes.

EDITORIAL POLICY

Articles submitted for publication are independently reviewed by at least two referees, an Associate Editor and the Editor-in-Chief. However, manuscripts that clearly do not meet the criteria for publication may be rejected by the Editor-in-Chief and/or the Associate Editor concerned without being sent for review. Acceptance or rejection of a manuscript is the responsibility of the Associate Editors and the Editor-in-Chief, with the Editor-in-Chief assuming final responsibility. Accepted papers will normally be published in turn according to the date of final acceptance, but the editors reserve the right to accelerate the progress of papers meriting rapid publication. Within a given volume of **EJP**, preference may be given to authors who have not already had a paper accepted for that volume. The manuscript must be prepared according to the instructions that follow; those that do not conform or are incomplete may be returned for correction prior to review.

THE MANUSCRIPT

Manuscripts may be submitted in the form of **Original Articles** or **Reviews** and should be submitted online at the [European Journal of Phycology 's Manuscript Central site](#). New users should first create an account. Once a user is logged onto the site submissions should be made via the Author Centre. Authors preparing papers in excess of 16 journal pages should contact the Editors-in-Chief in the first instance. It is essential that manuscripts are written using *double spacing throughout* (including references, tables and legends) with margins of at least 3 cm all round. Do not right-justify or divide words at the ends of lines. The laser writer font Times New Roman, (12 point) is preferred. Species names, foreign words and names of ships, should be in italics. All pages should be numbered serially, with the first page a title page, the second an abstract, followed by the text, references, tables, and legends for figures in that order. The text should normally be subdivided into six sections: Introduction, Materials and Methods, Results (or Observations), Discussion, Acknowledgements and References, although this may not be appropriate for some articles (such as some taxonomic papers).

Indent the first line of paragraphs except after headings. Latin names should be followed by the taxon authors in full, e.g. (J. Smith) Setchell & Gardner, when first used, unless a large number of names with authorities are grouped in a table; initials of taxon authors should be given as necessary according to the author information in the International Plant Name Index (<http://www.ipni.org/index.html>). However, in non-taxonomic papers and

where there is no likelihood of ambiguity, taxon authors can be omitted for species that are not the principal focus of the study. SI (metric) units must be used. Leave a space between numerals and their units (e.g. 10 mm), and between numerals and arithmetical operators (<, =, + etc), but no space between numerals and %. Abbreviations should be explained in words when first used. Symbols, units, and nomenclature should conform to international usage. Hours, minutes and seconds should be abbreviated to h, min and s, respectively. Non-English speakers should get the text checked if at all possible, as the editors cannot be expected to carry out major linguistic revision.

Authors should consider whether extensive lists of samples or specimens or GenBank accessions, supporting figures, and other details might be better given as **Supplementary information**, which would be made available online and advertised in the printed paper, but not printed.

Information about supplemental online material

Full length reviews are published. See recent issues for style. Potential contributors of reviews are invited to consult the Editors-in-Chief before preparing a submission.

Original Articles should be prepared according to the following format:

1. The title page should have only the title, the name(s) and address(es) of the author(s), any necessary footnotes, and a short running title suitable for page headings. If the name of an organism is used in the title, an indication of its taxonomic position must be given. The authors of taxon names should only be used in titles when it is essential. The address for correspondence and offprint requests will be that of the first author unless otherwise indicated by means of a footnote. The corresponding author's e-mail (or fax number) should be included.

2. The Abstract of not more than 300 words should be concise, informative and intelligible without reference to the main text. It should indicate both the main results and the main conclusions of the paper. Do not repeat information in the title or make reference to the literature. The authors of species names should be given in the Abstract only when it is essential to the understanding of the results and conclusions, e.g. for some taxonomic papers. **Key words** : immediately following the abstract, list 6 to 10 key words alphabetically, separated by commas.

3. The Introduction should give the background to the study and the purpose of the investigation in sufficient detail to introduce readers not expert in the particular area covered. It should not anticipate the Discussion.

4. Materials and Methods. If cultures are used, indicate the strain or clone number and source. For materials, equipment and supplies not secured through major scientific supply companies, indicate the source. Use metric units; for description of laboratory procedures, the terms litre (abbreviated to l) and millilitre (ml) may be used. Values for light measurements should be given in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or W m^{-2} , and referred to as photon irradiance or irradiance. Do not use dots or full-stops between parts of the term. Ensure that decimals are given as 0.5 (not 0,5) both in the text and in axis labels.

For molecular systematics papers, it is essential that all sequences are deposited in a publicly available database, e.g. GenBank, and that alignments constructed for phylogenetic analyses are made freely available to readers, preferably by deposit in a publicly available database. Phylogenetic analyses must be described in enough detail to be repeatable.

5. Results Cite each figure and table in the text in order of presentation as far as possible. Names of new taxa must be followed immediately by the Latin description or, preferably, diagnosis (using only essential characters), with citation of holotype. For new combinations, basionyms should be cited in full.

Examples of the preferred layout for taxonomic papers are shown below.

For new descriptions:

***Porphyra olivii* Orfanidis, Neefus & T. Bray, sp. nov. (Figs 1–5)**

Diagnosis: Lamina monostromatic, tenuis, 15–30 µm crassa,

Gametangial blade monostromatic, thin, 15–30 µm

[N.B. a strict English translation of the diagnosis or description is not essential if a fuller *Description*, referenced to Figures, is also given]

Holotype: Collected as an epiphyte of *Gracilaria* sp. deposited in the Natural History Museum, London, UK (BM).

Isotypes: Fisheries Research Institute, Kavala (Greece), University of Copenhagen, Copenhagen (C)....

Type locality:

Etymology: The name *olivii* is after G. Olivi (1769–1795), who was

Description

The gametangial thallus is foliose (Figs 2–5) with

For taxonomic / nomenclatural revisions:

***Gloiocladia repens* (C. Agardh) N. Sánchez & Rodríguez-Prieto, comb. nov. (Figs 1–36)**

Basionym: *Sphaerococcus repens* C. Agardh, 1822, *Species Algarum* : 244–245.

Synonyms: *Gracilaria repens* (C. Agardh) J. Agardh, 1842: 152.

Lectotype, designated here: Agardh herbarium, LD 25705.

Type locality: Atlantic coast near Cadiz, Spain.

Distribution: Mediterranean Sea and East Atlantic (Iberian Peninsula, Morocco and Canary Islands). In our opinion, records from the Maldives (Hackett, 1977) need to be verified.

Description

Thallus decumbent, to 25 cm high and 18 cm wide (Figs. 1–6), primarily attached to the substratum by a discoid holdfast (Fig. 5).

For papers incorporating comparative accounts of a series of taxa:

***Cryptochloris* sp. (Figs 2–5)**

Light microscopy. Cells are 4.8–7.2 µm long and 3.0–4.0 µm wide, elliptical in ventral view, with a rounded anterior and pointed posterior end (Figs 2, 3).

Electron microscopy. The most distinctive feature is the presence of a conspicuous furrow with thickened margins, extending for about half the cell length (Fig. 4).

Phycobiliproteins. Cells appear light brown/orange in healthy cultures.

Notes. The genus comprises a single species, *C. vittata* Schiller, which was originally described from the Adriatic Sea (Italy) as having flagella of different lengths (Schiller 1925). Like specimens observed in the North Sea

For further guidance please see recent issues of the journal or contact the editorial office (cmagill02@qub.ac.uk).

6. The Discussion evaluates the significance of the results obtained in the context of the literature in this area.

7. Acknowledgements should be given under a single heading at the end of the article.

8. References in the text are cited by author and publication date. Use "&" between pairs of authors; for three or more authors, give the first author followed by " *et al.* ." and the year. Multiple references must be listed in chronological order (e.g. Joosten & van den Hoek, 1986; Breeman, 1988; Breeman *et al.* , 1994 *a* , 1994 *b*). Only cite articles or books already published or in press, not unpublished work "in preparation". **In the list at the end of the paper**, references should be typed double spaced in alphabetical order of first author. For papers with the same first author, first list single-author papers in date order, then two-author papers ordered by the second author and then date, and then papers by three or more authors in date order. Journal names and titles of books should be underlined or italicized. Include publishers and city of publication for books. Journal titles should be given in full. References should appear in the following style (note that author names are given in small capitals with capital initials, **not** in capitals: if this is impossible, use lower case with capital initials)

Harker, M. & Young, A.J. (1995). Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology* , **30** : 179–188.

Bold, H. C. & Wynne, M.J. (1985). *Introduction to the Algae* , 2nd edition. Prentice-Hall, New Jersey.

Sheath, R.G. & Hambrook, J.A. (1990). Freshwater ecology. In *Biology of the Red Algae* (Cole, K.M. & Sheath, R.G., editors), 423–453. Cambridge University Press, Cambridge.

9. Tables should be numbered consecutively with arabic numerals, have a brief title at the top and be referred to in the text. Each table should be typed, *double-spaced throughout* , on a separate numbered page. Tables should not include vertical lines or shading – if either is essential the material must be submitted as a figure for direct reproduction. Give each column a short heading. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Include in the footnotes all non-standard abbreviations used and enough information for the table to be understood without undue recourse to the text. For footnote indicators use lower-case letters (a, b, etc.).

10. Figures should be planned so that they will fit one column (8 cm) or two columns (17 cm) in width, and be no more than 25 cm in length. Allow sufficient space so that the legend can be placed beneath the figure or group. A linear scale must be placed directly on each figure. Scale length should be indicated in the legend. Normally only previously unpublished illustrations are acceptable. Figures should be numbered consecutively in arabic numerals and, as far as possible, referred to sequentially in the text (Fig. 1), (Figs 2, 3), (Figs 1–4), etc. Full page groups of figures must *not* be referred to as plates with individual figures indicated by letters.

Legends for figures must be typed double-spaced on a separate page. Each legend should begin by describing all the figures in a plate (e.g. **Figs 3–7** . Cell walls of *Chlorella* sp.) and provide enough information for interpretation of the figure, with all abbreviations used. All terms, abbreviations, and symbols should correspond with those used in the text. List scales at the end of the legend for each plate as follows. Scale bars: Fig. 1, 20 mm; Figs 2–4, 50 nm.

Useful instructions on the preparation of figures are available

at <http://journalauthors.tandf.co.uk/preparation/artwork.asp>

Line drawings and diagrams must be prepared at a minimum of 600 dpi final size. Computer-generated figures and graphs with two vertical axes must have both labels running the same way. Letters and numerals must be large enough to be readable when printed. Figure numbers should not be encircled.

Photographs (halftones) must have good contrast. Groups of photographs forming a single page should be squared accurately and mounted with edges touching (butted) with no spaces between them and no overlapping corners; the press will rule white or black lines between individual photographs. Figures should be planned so that the all outer margins are aligned. Plates may be reduced in size, as determined by the editor and press. Individual photographs should be trimmed to show only essential features and of equal contrast and brightness. Electronic files should be prepared using standard programs (e.g. Photoshop) at a resolution of at least 300dpi (preferably 600dpi) and saved as TIFFs. (In the case of very large files, JPEGs may be submitted initially, but TIFFS are required for publication). Numbers and lettering should be in Arial font (12 bold for figure

numbers), black or white depending upon the background, and embedded in the final image. Magnification scales should be inserted on the figures; the length of the line should be given in the figure legend.

All numbers, letters, arrows and magnification scales must be inserted by the author.

Please supply all details required by any funding and grant-awarding bodies in a separate paragraph.

Colour photographs (at the same resolution as black and white images) may be printed. The journal has a limited number of free colour pages within its annual page allowance. Authors should consult the editorial office with respect to colour reproduction at submission stage. Any figure submitted as a colour original may appear in colour within the journal's online edition. Colour reproduction in print in excess of the journal's budget will only be considered on condition that authors contribute to the associated costs.

Free article access. As corresponding author, you will receive free access to your article on Taylor & Francis Online. You will be given access to the My authored works section of Taylor & Francis Online, which shows you all your published articles. You can easily view, read, and download your published articles from there. In addition, if someone has cited your article, you will be able to see this information. We are committed to promoting and increasing the visibility of your article and have provided [this guidance on how you can help](#) .

Reprints and journal copies. Corresponding authors can receive 50 free reprints and a complimentary copy of the issue containing their article. Complimentary reprints are available through Rightslink® and additional reprints can be ordered through Rightslink® when proofs are received. If you have any queries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk . To order extra copies of the issue containing your article, please contact our Customer Services team at subscriptions@tandf.co.uk .

Page Proofs. The corresponding author will receive access to PDF proofs via an email from CATS, the journal's manuscript tracking system. Through CATS, authors should also complete and return a copyright form to Taylor & Francis. Authors should pay particular attention to checking numerical material, tables, lists of names, and figure captions and markings. The corrected proofs should be returned *within 72 hours* . Author corrections should be made by annotating the PDF proof using the pdf mark-up tools and uploading to CATS.

Please note, the Taylor & Francis Journal Production Editor cannot accept initial corrections directly via email - online CATS correction lists must be used.

Copyright. It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to the British Psychological Society. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and of course the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors retain many rights under the Taylor & Francis rights policies, which can be found at http://www.tandfonline.com/authors_journals_copyright_position . Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. Exceptions are made for authors of Crown or US Government employees whose policies require that copyright cannot be transferred to other parties. We ask that a signed statement to this effect is submitted when returning proofs for accepted papers.

Open access. Taylor & Francis Open Select provides authors or their research sponsors and funders with the option of paying a publishing fee and thereby making an article permanently available for free online access – open access – immediately on publication to anyone, anywhere, at any time. This option is made available once an article has been accepted in peer review.

Full details of our Open Access programme: <http://journalauthors.tandf.co.uk/preparation/OpenAccess.asp>

Ficha catalográfica

X6t Ximenes, Caroline Feijão
Taxonomia e filogenia dos representantes do gênero
Halimeda J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no
Brasil /
Caroline Feijão Ximenes. – Recife, 2015.
78 f.: il.

Orientadora: Sonia Maria Barreto Pereira.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
Recife, 2015.
Inclui referências e apêndice(s).

1. *tufA* 2. *rbcl* 3. Espécies crípticas I. Pereira, Sonia
Maria Barreto, orientadora II. Título

CDD 581