

MARCELLA GUENNES TAVARES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GÊNERO *Bryopsis*
J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) NO LITORAL DE
PERNAMBUCO-BRASIL**

Recife

2020

MARCELLA GUENNES TAVARES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GÊNERO *Bryopsis*
J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) NO LITORAL DE
PERNAMBUCO-BRASIL**

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

Área de concentração: Diversidade e conservação de algas e plantas

Orientadora: Prof. Dra. Sonia Maria Barreto Pereira-PPGB/UFRPE

Coorientadora: Prof. Dra. Valéria Cassano-IB/USP

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M314d de Oliveira, Marcella Guennes
DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GÊNERO Bryopsis J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES,
CHLOROPHYTA) NO LITORAL DE PERNAMBUCO-BRASIL / Marcella Guennes de Oliveira. - 2020.
86 f. : il.

Orientadora: Sonia Maria Barreto Pereira.
Coorientadora: Valeria Cassano.
Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife,
2020.

1. cpDNA. 2. macroalga. 3. rbcL. 4. taxonomia. 5. tufA. I. Pereira, Sonia Maria Barreto, orient. II. Cassano, Valeria,
coorient. III. Título

CDD 581

MARCELLA GUENNES TAVARES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GÊNERO *Bryopsis*
J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) NO LITORAL DE
PERNAMBUCO-BRASIL**

Aprovada em: 21/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: _____

Dra. Sonia Maria Barreto Pereira
(Titular/UFRPE)

Examinadores: _____

Dra. Enide Eskinazi Leça
(Titular/UFRPE)

Dra. Maria da Glória Gonçalves da Silva Cunha
(Titular/ UFPE)

Dr. Reginaldo de Carvalho
(Suplente/UFRPE)

Dra. Sigrid Neumann Leitão
(Suplente/ UFPE)

Recife

2020

Dedico este trabalho aos meus avós, mãe e irmã, pela vida que tenho.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças...”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB/UFRPE) pela formação;

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

Aos Membros da banca, pelas críticas e sugestões;

À Profa. Sonia Maria Barreto Pereira, na condição de orientadora, pela oportunidade e confiança para realização desse trabalho;

À Profa. Valéria Cassano, na condição de coorientadora e colaboradora do Laboratório de Algas Marinhas da USP, pela paciência, apoio e profissionalismo em todas as etapas;

À Profa. Ana Benko, pelo suporte estrutural e técnico no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE;

À Profa. Enide Eskinazi Leça, pelo exemplo e dedicação a qual tenho muito carinho, admiração e respeito;

À Profa. Glória, pelo carinho, confiança e principalmente pelos ensinamentos e dias compartilhados;

À Michael Wynne por revisar o manuscrito e ajudar com seus comentários;

Aos profissionais do Departamento de Botânica, em especial a Teresa Buriel e Cynara Leleu pela disposição e cuidado;

À Mayara, Samara e Sebastiana, pela oportunidade de dividir vários momentos;

À Wilson do Laboratório de Bioinformática da UFPE, pelas contribuições com as análises dos dados e pela paciência;

Ao Nuno e Victor do Laboratório de Algas Marinhas da USP, pela receptividade, disponibilidade e companheirismo;

Aos alunos do Laboratório de Genética e Biologia Vegetal da UFPE, em especial a Will e Diogo pelo apoio técnico;

Aos amigos do Departamento de Oceanografia da UFPE, em especial a Amanda, Nane e Nayana pela convivência, amizade, aprendizados e sorrisos;

À Brunna, Mari e Ivo, amigos que permaneceram desde a graduação;

Ao meu companheiro Jamerson, por estar presente antes, durante e depois desse processo, participando não só como companheiro, mas também como, incentivador. Agradeço imensamente pela paciência, apoio e compreensão;

À tia Simone Suruagy (in memoriam) e tio Hermann Suruagy, pelo acolhimento, ternura, sorrisos e dias compartilhados durante minha estadia em São Paulo;

À minha mãe, Nazaré Guennes e minha irmã Manoella Guennes, elas que mesmo distantes são meu porto seguro e exemplos de mulheres batalhadoras, fortes e independentes, meu muito obrigada pelo amor e cuidado desde que nasci, vocês são essenciais na minha vida;

Em especial agradeço aos meus avós maternos, exemplos de amor, cuidado e respeito. Aos dois, só tenho a agradecer, vocês sempre serão os donos do meu sorriso mais sincero. Vovô tenho muitas saudades. Vovó um dia você vai se esquecer de mim, mas deixo aqui registrado, o meu amor por você. Eu amo vocês, minhas eternas crianças;

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para que este trabalho fosse concluído, eu só tenho a agradecer;

Por fim, agradeço a Deus por acordar todos os dias e saber que Ele tem colocado pessoas especiais e iluminadas no meu caminho.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Revisão Taxonômica de <i>Bryopsis</i>	15
2.2 Marcadores e Estudos Moleculares em <i>Bryopsis</i>	20
REFERÊNCIAS	25
ARTIGO	34
Introdução	36
Materiais e métodos	37
Resultados	40
Discussão	52
Referências	57
ANEXOS	66
NORMAS DA REVISTA	81

OLIVEIRA, Marcella Guennes Tavares de (MSc). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2020. DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GÊNERO *Bryopsis* J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) NO LITORAL DE PERNAMBUCO-BRASIL. Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Barreto Pereira (UFRPE).

RESUMO

O gênero *Bryopsis* possui morfologia simples e elevada plasticidade fenotípica dificultando a identificação morfológica de suas espécies. Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de *Bryopsis* no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, com base em dados morfológicos e, pela primeira vez, utilizando os marcadores moleculares *tufA* e *rbcL*. As análises moleculares foram incongruentes com a morfologia, demonstrando que há espécies crípticas e polimórficas para o gênero. Dos quatro táxons citados para a área baseados em dados morfológicos (*Bryopsis corymbosa*, *B. pennata*, *B. plumosa*, *Bryopsis* sp.), apenas *B. pennata* foi registrada. Os resultados obtidos mostraram que espécimes típicos de *B. pennata* e *B. plumosa* se agruparam com baixa divergência genética, 0-0.21% para o *tufA* e nenhuma divergência para o *rbcL*, indicando que *B. pennata* é uma espécie extremamente plástica que inclui espécimes com morfotipo “*B. plumosa*”. *Bryopsis pennata* var. *secunda* é citada pela primeira vez para o nordeste do Brasil, divergindo da variedade típica de 0,96-1,57% para o *tufA* e em 0,4% para o *rbcL*. Este estudo mostrou que uma amostragem mais ampla do gênero *Bryopsis* é necessária, visando confirmar o *status* taxonômico das espécies referenciadas para o Brasil, cuja plasticidade fenotípica pode superestimar sua diversidade ou revelar espécies crípticas.

Palavras-Chave: cpDNA; macroalga; *rbcL*; taxonomia; *tufA*

OLIVEIRA, Marcella Guennes Tavares de (MSc). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). February, 2020. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DIVERSITY OF THE GENUS *Bryopsis* J.V.Lamouroux (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) ON THE PERNAMBUCO COAST-BRAZIL. Advisor: PhD. Sonia Maria Barreto Pereira (UFRPE).

ABSTRACT

Bryopsis genus has simple morphology and high phenotypic plasticity, making difficult to identify its species based on morphological characteristics. This study aimed to evaluate the diversity of *Bryopsis* in northeastern Brazil (state of Pernambuco), based on morphological data and, for the first time, using the molecular markers *tufA* and *rbcL*. The molecular analyzes were incongruent with the morphology, demonstrating that there are cryptic and polymorphic species for the genus. Of the four taxa cited for the area based only on morphological data (*Bryopsis corymbosa*, *B. pennata*, *B. plumosa*, *Bryopsis* sp.), only *B. pennata* was recorded. Our results showed that typical specimens of *B. pennata* and *B. plumosa* were grouped with low genetic divergence, 0-0.21% for *tufA* and no divergence for *rbcL*, indicating that *B. pennata* is an extremely plastic species that includes specimens with morphotype "*B. plumosa*". *Bryopsis pennata* var. *secunda* is cited for the first time for northeastern Brazil, diverging from the typical variety by 0.96-1.57% for *tufA* and by 0.4% for *rbcL*. This study showed that a larger sampling of *Bryopsis* is necessary, in order to confirm the taxonomic status of the species referenced for Brazil, whose phenotypic plasticity may overestimate its diversity or reveal cryptic species.

Keywords: cpDNA, macroalgae, *rbcL*, taxonomy, *tufA*

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Bryopsis* J.V.Lamouroux está inserido no filo Chlorophyta (*chloro*= verde; *phyton*= planta), na ordem Bryopsidales e engloba 58 espécies (sp.), oito variedades (var.) e cinco formas (f.) (GUIRY; GUIRY, 2020). Com ampla distribuição dos trópicos às regiões polares, as espécies de *Bryopsis* constituem um grupo com hábitat predominantemente marinho, que se desenvolvem principalmente em áreas de costões rochosos e recifes de corais, em temperaturas que variam entre 5 a 27°C (HORTA et al., 2001; PORTUGAL et al., 2017). Geralmente ocorrem em locais mais abrigados, como poças de maré, fixadas às paredes verticais de pedras ou em raízes de mangue e em profundidades de até cinco metros (GUIRY; GUIRY, 2020).

Com morfologia simples, o gênero *Bryopsis* abriga organismos constituídos basicamente por filamentos cenocíticos não-calcificados e talos com ramos uniaxiais eretos com estruturas laterais menores, denominadas de pínulas (Fig. 1) (JOLY; PEREIRA, 1972). O conjunto dessas estruturas é denominado fronde, que se assemelham a uma pena. Na base da fronde há uma região rizomatosa, na qual os rizomas são desenvolvidos para permitir a fixação ao substrato, que geralmente são grãos de areias (Fig. 1) (MIOSSI et al., 2004). O conjunto de frondes constitui um indivíduo e, cada indivíduo, dependendo da espécie, pode medir de 2 a 40 cm, ou mais, durante a fase reprodutiva (KRELLWITZ et al., 2001).

A parede do corpo vegetativo é composta de substâncias celulósicas e pécnicas, interna à parede está a camada citoplasmática que reveste um vacúolo (DOMOZYCH et al., 2012). O citoplasma contém numerosos núcleos, pequenos cloroplastos e presença ou ausência de pirenoides (CIANCIA et al., 2012). A forma, posição e quantidade de pirenoides são tidas como características distintivas das espécies de *Bryopsis*, porém não validadas por modificarem-se em condições ambientais distintas (CORMACI et al., 2014).

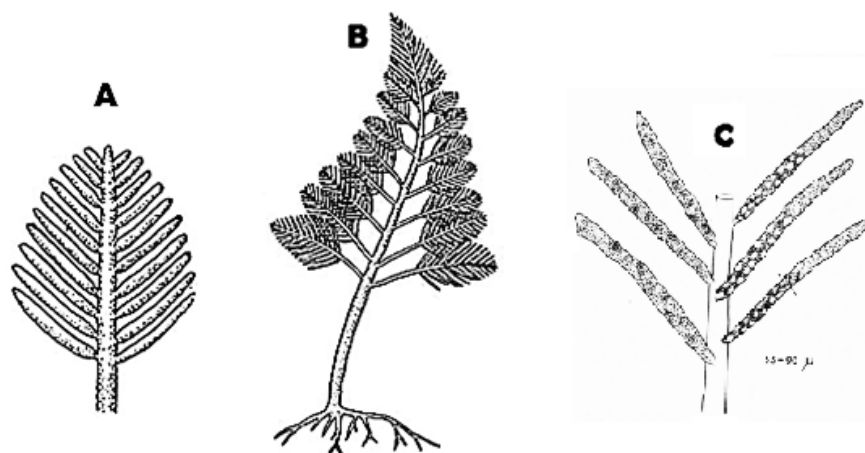


Figura 1. Estruturas morfológicas das espécies de *Bryopsis*. (A) Fronde com pínulas simples; (B) Fronde com pínulas ramificadas; (C) Distribuição das pinulas (adaptado de Rietema, 1971).

Espécies de *Bryopsis* apresentam alternância de gerações heteromórficas com reprodução assexuada por propagação vegetativa do talo, ou a partir de esporos (zoósporos ou aplanósporos), na qual um elemento de reprodução se solta e, ao fixar-se em algum substrato, origina novos indivíduos (RIETEMA, 1971). Como também, podem apresentar reprodução sexuada anisogâmica, onde os gametas haploides são diferentes no aspecto morfológico, sendo o feminino maior que o masculino, que se fundem para formar um zigoto que germina para formar um novo talo (Fig. 2) (RIETEMA, 1975).

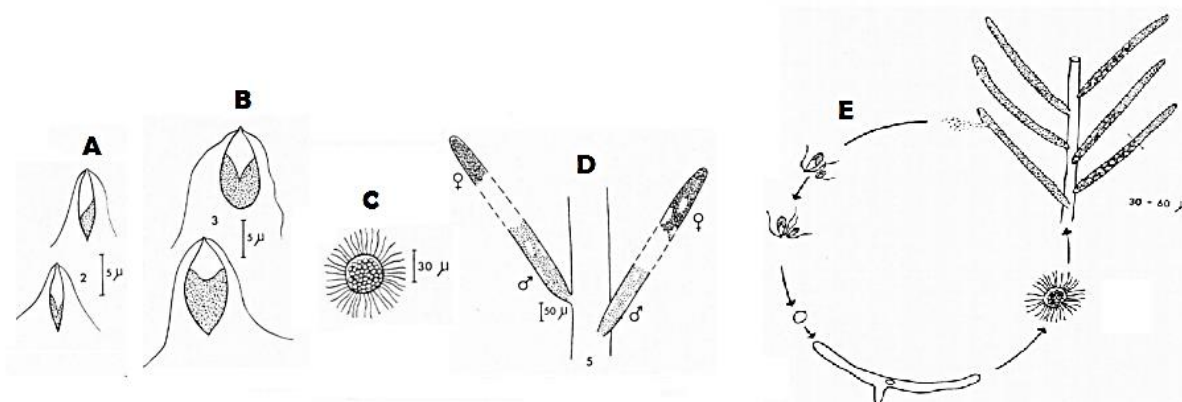


Figura 2. Estruturas reprodutivas presentes em espécies de *Bryopsis*. (A) Gameta masculino; (B) Gameta feminino; (C) Zoósporo; (D) Parte de uma planta com gametângio (gametas masculinos produzido na metade superior e gametas femininos na metade inferior); (E) Diagrama do histórico de vida de *Bryopsis hypnoides* (adaptado de Rietema, 1971).

Considerando o ciclo de vida curto e o alto poder de propagação dos seus indivíduos, o gênero abriga espécies potencialmente invasoras que dominam o ambiente em condições favoráveis como águas ricas em nutrientes (WILLIAMS; SMITH, 2007). Quando encontradas em abundância, indica que o ambiente pode estar em desequilíbrio por influências antrópicas (VASCONCELOS, 2016). Desta forma, são excelentes bioindicadoras e podem ser utilizadas no monitoramento de ecossistemas marinhos, uma vez que respondem rapidamente às modificações ambientais (SOARES, 2011).

O gênero *Bryopsis* está entre um dos grupos de algas mais bem representados em riqueza de espécies (Chlorophyta) (PEREIRA et al., 2011), desta forma apresentam importância ecológica como produtores primários dos sistemas aquáticos, e conseqüentemente contribuem com a estruturação dos ecossistemas costeiros e oceânicos (RIETEMA, 1972). Além de contribuir como produtores primários marinhos, as espécies de *Bryopsis*, servem de abrigo e proteção para pequenos invertebrados, principalmente os das ordens Amphipoda, Isopoda, Tanaidacea e Decapoda, devido às suas estruturas ramificadas, que favorecem a formação de microhabitats (SILVA, 2018).

Algumas espécies de *Bryopsis*, como *B. plumosa* e *B. maxima* Okamura ex Segawa, fazem simbiose com espécies de *Elysia* sp. (Sacoglossa-Gastropoda), conhecidas como lesmas-do-mar, que por sua vez sequestram seus cloroplastos através de um processo chamado de cleptoplastia (Fig. 3) (CHRISTA et al., 2014). Nesse processo de relação harmônica interespecífica, a lesma utiliza os metabólitos secundários da alga para inibir a ação de predadores a partir de estratégia mimética, além de permitir sua sobrevivência em períodos de escassez de alimentos (HÄNDELER et al., 2010).



Figura 3. Ilustração do processo de cleptoplastia entre *Elysia* sp. e *Bryopsis* sp. (adaptado de Rauch et al., 2015).

Devido à importância dos seus compostos bioativos, algumas espécies, como *Bryopsis plumosa* e *B. pennata* apresentam importância farmacológica, com atividades antifúngica, antibacteriana e anticoagulante (IBRAHIM et al., 2017). Além dessas aplicações, servem como matéria prima em estudos para os tratamentos de câncer de pulmão e de próstata, tumores e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ZHANG et al., 2010; LEFRANC et al., 2019) e, no desenvolvimento de drogas contra os mosquitos *Aedes aegypti* L., 1762 e *A. albopictus* Skuse, 1894, vetores de arboviroses como a dengue, chikungunya, zika e febre amarela (YU et al., 2015).

Estudos voltados para o conhecimento taxonômico das espécies de *Bryopsis* são necessários devido a sua importância em diferentes áreas do conhecimento, tais como, ecologia, química, genética, medicina, microbiologia e farmacologia (MALCATA et al., 2018). Até o momento, a maioria dos trabalhos realizados foi focada em estudos morfológicos, reprodutivos e citogenéticos. Porém, alguns autores consideram que, devido a plasticidade fenotípica das espécies de *Bryopsis*, a classificação a partir de análises morfológicas, podem oferecer uma identificação errônea (WYNNE, 2005; MORABITO et al., 2010). Do mesmo modo, análises dos ciclos de vida e cromossômicas contribuem para a resolução a níveis taxonômicos

superiores, tornando essas análises insuficientes para resolução dos problemas relacionados a arranjos taxonômicos em nível de espécie (KAPRAUN; SHIPLEY, 1990).

Diante dos avanços tecnológicos e do crescente interesse científico em delimitar adequadamente as categorias infragenéricas e infraespecíficas das espécies de *Bryopsis*, têm-se desenvolvido pesquisas a partir da utilização de ferramentas moleculares, como a aplicação de marcadores, que identificam organismos a partir de regiões específicas do DNA (HEBERT et al., 2003; HEBERT. GREGORY, 2005; HALL et al., 2010; LELIAERT et al., 2014; MOHAN et al., 2018). A aplicação de marcadores moleculares somada às técnicas da taxonomia clássica, com descrição e identificação de caracteres morfológicos, vem preenchendo lacunas no que diz respeito ao conhecimento e delimitação das espécies crípticas (espécies que não apresentam diferenças morfoanatômicas, mas que são geneticamente distintas) e polimórficas (espécies que apresentam diferenças morfoanatômicas, mas que são geneticamente semelhantes) (WOOLCOTT et al., 2000; SAUNDERS; KUCERA, 2010).

Nesse contexto, considerando a importância das espécies de *Bryopsis*, a plasticidade morfológica dos seus indivíduos e a eficiência na aplicação dos marcadores moleculares para delimitação das espécies, esse trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade e esclarecimento das relações filogenéticas de *Bryopsis* a partir da aplicação de marcadores do cloroplasto, *tufA* e *rbcL*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Revisão Taxonômica de *Bryopsis*

Estabelecida por Schaffner (1922), a ordem Bryopsidales agrupa algas cenocíticas predominantemente marinhas. Acredita-se que seus representantes tenham surgido há pelo menos 400 a 500 milhões de anos (BOROWITZKA, 2012; GRANIER, 2018). Inserida nesta ordem está a família Bryopsidaceae, que engloba os gêneros *Bryopsidella* Feldmann ex H.Rietema, *Jaffrezocodium* B.Granier (gênero fóssil), *Lambia* Delépine, *Pseudobryopsis* Berthold, *Pseudoderbesia* E.Calderon & R.Schnetter, *Trichosolen* Montagne e *Bryopsis* (GUIRY; GUIRY, 2020).

O gênero *Bryopsis* (do grego *bryon*= musgo; *ypsis*= aparência) foi estabelecido por Lamouroux (1809), que em nota descreveu as características de *Bryopsis pennata*, *B. hypnoides*, *B. cupressina* J.V.Lamouroux, *B. muscosa* J.V.Lamouroux e *B. arbuscula* (A.P.de Candolle) J.V.Lamouroux, nom. illeg. Porém, uma espécie semelhante a *B. arbuscula* havia sido descrita por Hudson (1778) como *Ulva plumosa* Hudson, posteriormente considerada por Womersley (1984) como um tipo perdido, sendo atualmente sinônimo homotípico de *B. plumosa* (Hudson) C.Agardh e heterotípico de *B. arbuscula*.

Egerod (1952) definiu *Bryopsis pennata* como espécie tipo do gênero (lectótipo) e Børgesen (1911) reduziu *B. pennata* a uma variedade de *B. plumosa*, denominada *B. plumosa* var. *pennata* (J.V.Lamouroux) Børgesen. A reclassificação de espécie para variedade foi baseada na observação do autor que sugeriu que as características morfológicas variavam em função das altas temperaturas das águas tropicais (COPPEJANS; HEEDE, 1996).

Collins e Hervey (1917), examinando cerca de 200 espécimes de *Bryopsis* da coleção de Miss Vickers¹, verificaram que *B. pennata*, *B. lepriurii* Kützing e *B. harveyana* J.Agardh, mesmo apresentando características morfológicas típicas, são quase que impossíveis de serem identificadas, devido à alta plasticidade das espécies, que apresentavam plantas desnudas e formas intermediárias. Porém, os autores não concordaram com Børgesen (1911), que anteriormente sugeriu colocar as espécies intermediárias de *Bryopsis*, como *B. plumosa*.

Para o Atlântico ocidental tropical e subtropical estão referenciadas oito espécies e oito variedades (WYNNE, 2017). Destas, cinco táxons infragenéricos ocorrem no Brasil: *Bryopsis corymbosa* J. Agardh, *B. hypnoides* J.V.Lamouroux, *B. pennata* J.V.Lamouroux, *B. pennata* var. *secunda* Collins & Hervey e *B. plumosa* (Hudson) C.Agardh, citados da costa do estado do Pará até o Rio Grande do Sul (INCT, 2020) e, também, nas Ilhas Oceânicas: Atol das Rocas, Fernando de Noronha, São Pedro e São Paulo, Abrolhos, Trindade e Martim Vaz (VILLAÇA et al., 2006).

No Brasil, a primeira ocorrência do gênero foi registrada no século XIX, por Martius et al. (1833), que em nota, citaram *Bryopsis rosea* Gaudichaud ex C.Agardh com dados poucos precisos sobre os locais de coleta. Além deste, Zeller (1876) citou *Bryopsis rosae* var. *lepriurii* Zeller para o estado do Rio de Janeiro, porém essas e outras citações foram colocadas por Oliveira-Filho (1977) como registros errôneos, sendo posteriormente identificadas como *Bryopsis pennata* ou *B. plumosa* (Tabela 1).

Para a região costeira do estado de Pernambuco alguns trabalhos merecem destaque, como o realizado por Joly e Pereira (1972), que listaram a ocorrência de 90 gêneros de macroalgas na costa pernambucana, entre eles o gênero *Bryopsis*. Após os anos de 1980, as pesquisas ficológicas foram intensificadas na costa pernambucana e os estudos iniciais foram direcionados para pesquisas taxonômicas e florística. Posteriormente, estudos ecológicos foram agregados, o que permitiu ampliar o conhecimento da flora e da distribuição das espécies de macroalgas marinhas ao longo do estado de Pernambuco (PEREIRA et al., 2002).

¹ Anna Vickers (1852-1906) ficóloga reconhecida por participar em expedições e publicar dados sobre macroalgas marinhas, principalmente de Chlorophyta e Phaeophyceae das Ilhas Canárias (1895-1896), Barbados (1898-1899) e Índias Ocidentais (1902- 1903). A maior parte do material foi para os principais museus da Europa e os Estados Unidos (CREESE, 1998).

Tabela 1. Primeiras ocorrências de *Bryopsis* no Brasil com seus respectivos tratamentos taxonômicos segundo Oliveira-Filho (1977).

Espécies	Nomes mal aplicados para o Brasil	Referência	Ocorrência
<i>Bryopsis pennata</i>	<i>Bryopsis harveyana</i>	Howe (1928)	BA
	<i>Bryopsis indica</i> A.Gepp & E.S.Gepp	Gepp e Gepp (1908)	-
		Joly (1957)	SP
	<i>Bryopsis pennata</i> var. <i>secunda</i>	Collins e Hervey (1917)	-
		Taylor (1931)	CE, BA, RJ
	<i>Bryopsis rosea</i>	Martius et al. (1833)	-
<i>Bryopsis rosea</i> var. <i>leprieurii</i>	Zeller (1876)	RJ	
<i>Bryopsis plumosa</i>	<i>Bryopsis plumosa</i> var. <i>leprieurii</i> (Kützing) Børgesen	Luetzelburg (1922-23)	RJ
		Schmidt (1924)	CE

A partir do levantamento dos trabalhos realizados na costa de Pernambuco, foi possível identificar a ocorrência de *Bryopsis* sp., *B. plumosa* e *B. pennata*, além de uma ocorrência de *B. corymbosa* (Tabela 2 e 3). Em alguns trabalhos, os autores, relatam a dificuldade de delimitar essas espécies devido à alta plasticidade fenotípica e sobreposição de caracteres morfológicos presente nos representantes do gênero (ACCIOLY, 1989).

Bryopsis corymbosa e *B. plumosa* apresentam características semelhantes, como o tamanho irregular das pínulas e ramos com crescimento irregular. Porém, diferem quanto à diminuição gradativa das pínulas apicais em *B. plumosa* e formação de tufo de pínulas na região distal dos ramos em *B. corymbosa* (Fig. 4) (LEE et al., 1991).

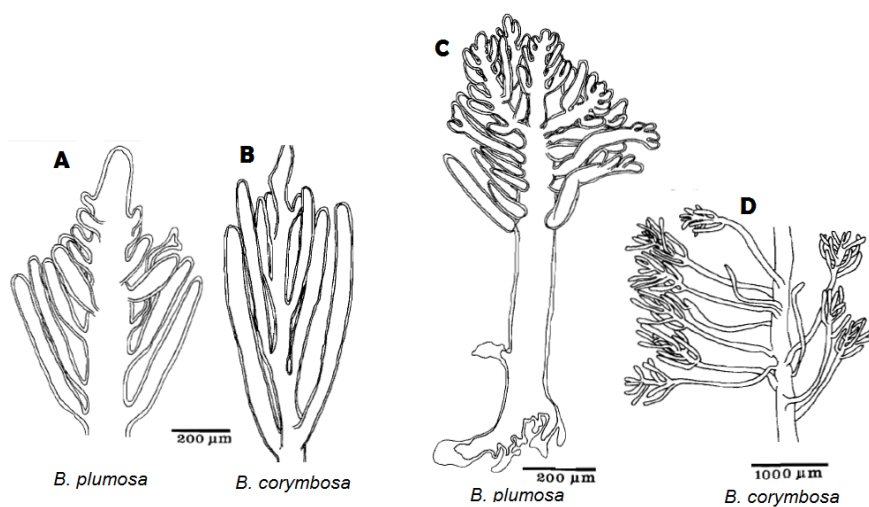


Figura 4. (A) Distribuição das pínulas na região apical de *Bryopsis plumosa*; (B) Distribuição das pínulas na região apical de *B. corymbosa*; (C) Aspecto da fronde de *B. plumosa*; (D) Parte do talo de *B. corymbosa* (adaptado de Lee et al., 1991).

Em relação à *B. plumosa* e *B. pennata*, poucas diferenças morfológicas separam essas espécies, como a forma da fronde. *Bryopsis plumosa* apresenta forma piramidal, enquanto *B. pennata*, apresenta forma lanceolada (Fig. 5) (KRELLWITZ et al., 2001). Em estudo realizado na praia de Serrambi (Ipojuca-Pernambuco), foi observado que *B. pennata* ocorre com a maior frequência no infralitoral durante os meses maio a agosto, enquanto *B. plumosa* ocorre no mesolitoral durante os meses de dezembro a maio (ACCIOLY, 1989).

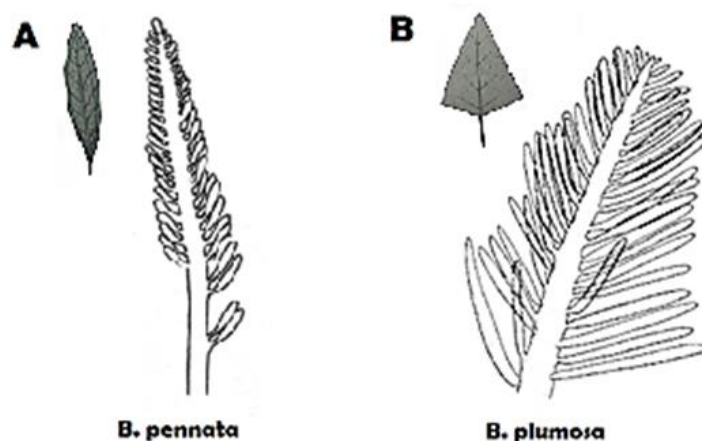


Figura 5. (A) Aspecto lanceolado da fronde de *Bryopsis pennata*; (B) Aspecto piramidal da fronde de *B. plumosa* (adaptado de Womersley, 1984; Aliya e Shameel, 1996).

Considerando as dificuldades de delimitar *Bryopsis pennata* e *B. plumosa* devido ao seu polimorfismo, alguns autores consideram a classificação em nível de variedade ainda mais conflituosa. Um exemplo é *Bryopsis plumosa* var. *secunda*, que foi descrita por Harvey (1858) e, posteriormente, transferida pelo mesmo autor, para *B. pennata* var. *secunda* (Fig. 6) (COLLINS; HERVEY, 1917).

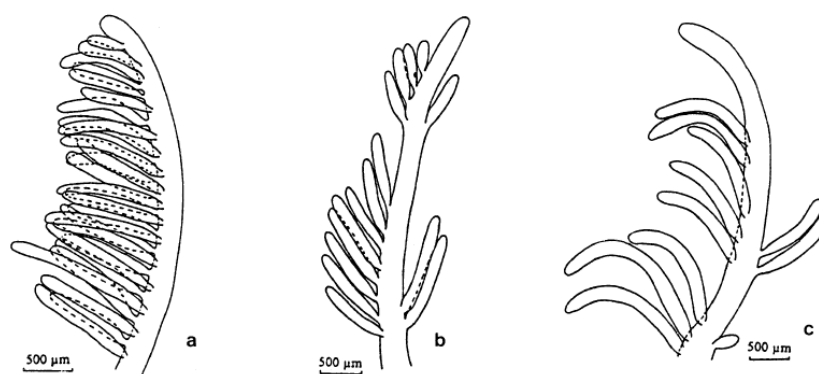


Figura 6. Partes apicais do talo de *Bryopsis pennata* var. *secunda*. (A) Distribuição unilateral das pínulas; (B e C). Distribuição descontínua das pínulas (adaptado de Coppejans e Heed, 1996).

Morfológicamente próximas, *Bryopsis plumosa* e *B. hypnoides* são distintas apenas pela disposição das pínulas em torno do eixo. *Bryopsis plumosa* apresenta disposição bilateral, enquanto *B. hypnoides* apresenta disposição radial (Fig. 7) (COTO, 2007). Além das semelhanças morfológicas, análises cromossômicas mostram que as características de *B. hypnoides* e *B. plumosa* se sobrepõem (KAPRAUN; SHIPLEY, 1990), levando esses autores a considerar a possibilidade dessas espécies serem coespecíficas.

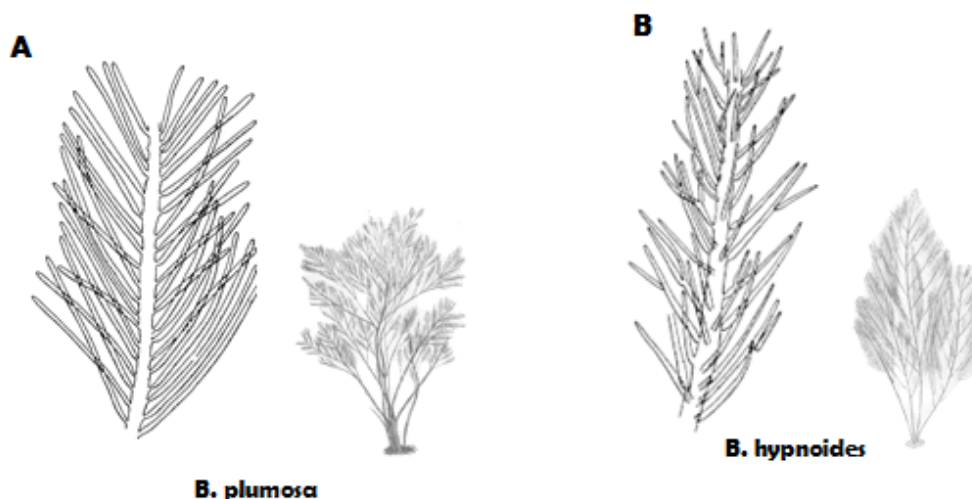


Figura 7. (A) Aspecto geral e distribuição das pínulas bilateralmente no eixo em *Bryopsis plumosa*; (B) Aspecto geral e distribuição das pínulas radialmente em torno do eixo em *B. hypnoides* (adaptado de Womersley, 1984; Gatty, 1872).

A classificação a partir de análises morfológicas é comum e, por muito tempo, bastante aceita na comunidade científica. Porém, com o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente a biologia molecular, considera-se que as análises a partir apenas de caracteres morfológicos podem subestimar ou superestimar a diversidade de espécies em uma determinada área. Por esta razão, no contexto atual para o conhecimento da biodiversidade, a utilização de ferramentas moleculares tem se mostrado um instrumento útil e eficiente no estudo das espécies.

2.2 Marcadores e Estudos Moleculares em *Bryopsis*

A partir da década de 90, houve um grande impulso na resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos nas algas com o desenvolvimento de estudos com aplicação de ferramentas moleculares (KUHSEL et al., 1990). Entre as principais ferramentas moleculares utilizadas na atualidade, merece destaque a aplicação de marcadores moleculares, que permite a identificação de espécies de forma consistente e rápida a partir

et al., 2016). Devido a sua eficiência na delimitação de espécies, o *tufA* foi proposto como marcador do tipo DNA *barcode* para as macroalgas verdes (SAUNDERS; KUCERA, 2010).

O *rbcL* (± 1400 pb) está presente no genoma do cloroplasto de todos os eucariontes fotossintetizantes (CURTIS et al., 2008). É um gene menos conservado, longo e que não apresenta *indels*, o que lhe confere adequação para reconstrução filogenética (FRESHWATER et al., 1994). Nas algas verdes, o *rbcL* vem sendo amplamente utilizado para análises filogenéticas a nível genérico e específico (MCCOURT et al., 2000; SHIMADA et al., 2003; LAM; ZECHMAN, 2006; KAZI et al., 2013).

Estudos filogenéticos prévios têm mostrado que as algas verdes cenocíticas formam duas linhagens principais, representadas pelas ordens irmãs Bryopsidales e Dasycladales, sendo as Bryopsidales divididas em três clados principais: dois correspondem às subordens monofiléticas Bryopsidineae e Halimedineae, e um terceiro contém apenas o gênero bioerosivo *Ostreobium* Bornet & Flahault (WOOLCOTT et al., 2000; LAM; ZECHMAN, 2006; VERBRUGGEN et al., 2009a, b; LÜ; WANG, 2011).

Em um estudo mais recente baseado em metabarcoding com o *tufA*, Sauvage et al. (2016) mostraram que "*Ostreobium*" é polifilético, representado por várias espécies crípticas endolíticas, distribuídas em quatro famílias distintas, nomenclaturalmente provisórias, agrupadas em um grande clado, que contém ainda várias linhagens não revolvidas, e cuja divergência genética é compatível com o estabelecimento de uma terceira subordem, Ostreobidineae, subordem esta que já havia sido proposta informalmente por Verbruggen et al. (2009b).

Ainda uma quinta família de "*Ostreobium*" posicionou-se filogeneticamente distante de Ostreobidineae, em um clado dentro da subordem Halimedineae, provisoriamente referida como "Pseudostreobiaceae" por Sauvage et al. (2016). A subordem Bryopsidineae, que abriga as famílias Bryopsidaceae, Codiaceae e Derbesiaceae, também mostrou uma diversidade insuspeitada de acordo com as análises de Sauvage et al. (2016), com numerosos táxons não resolvidos/desconhecidos próximos filogeneticamente de Bryopsidaceae e Derbesiaceae.

Além dos marcadores *tufA* e *rbcL*, outros marcadores como *psbB* (*psbT* e *psbH*), UPA, LSU, ITS e 16S foram aplicados para delimitação e estudos filogenéticos das espécies de algas verdes (SAUNDERS; KUCERA, 2010). A utilização desses marcadores possibilitou reconhecer espécies crípticas e polimórficas, bem como permitiu relacionar a variação intraespecífica com a distribuição geográfica entre as espécies de *Bryopsis*

(KRELLWITZ et al., 2001; LÜ; WANG, 2011; HOLLANTS et al., 2013; TUFÍÑO-VELÁZQUEZ; PEDROCHE, 2019).

Ishida et al. (1997) buscando identificar a origem dos plastídeos do filo Chlorarachniophyta (microalgas marinhas tipicamente mixotróficas), determinaram as sequências parciais dos genes que codificam o fator de alongamento Tu (1.080-1.089 pb) de *Bryopsis maxima*. Ao que tudo indica esse trabalho foi um dos pioneiros para conhecimento das regiões EF-Tu plastídicas em *Bryopsis* e base para posteriores estudos moleculares do gene *tufA* (Plastid Elongation Factor-EF/Tu).

Hanyuda et al. (2000) avaliaram os *íntrons* presentes no gene *rbcL* em Ulvophyceae. Para *Bryopsis*, os autores observaram que há um *íntron* recém-descoberto em *B. maxima* e observaram que há *íntrons* instáveis para alguns gêneros e até espécies, como é o caso de *Bryopsis plumosa*. De acordo com os autores, as sequências não-codificantes do DNA podem ser úteis para comparação intraespecífica dentro de uma população e entre populações, uma vez que elas evoluem mais rapidamente do que as sequências de regiões codificantes.

Krellwitz et al. (2001) avaliaram a utilidade da codificação e não codificação sequências do agrupamento de genes *psbB* (*psbT* e *psbH*) de *Bryopsis*, em comparação com caracteres morfológicos, como um meio de distinguir as espécies e avaliar a diversidade das espécies de *Bryopsis* no Oceano Atlântico Norte Ocidental. Os autores observaram que, os dados moleculares reconheceram várias espécies de *Bryopsis*, mas os dados morfológicos não se correlacionam com essa afirmação. O estudo sugere que a morfologia das espécies é confusa devido a influências ambientais como temperatura.

Saunders e Kucera (2010) realizaram um teste preliminar da universalidade e variabilidade genética de marcadores moleculares, *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU e ITS para as macroalgas verdes marinhas, incluindo *Bryopsis*. Os autores observaram que a presença de *íntrons* no *rbcL* (especificamente no *rbcL*-3P) reduziu a utilidade desse marcador como um código de barras universal, sugerindo que o *tufA* seja adotado como marcador padrão por ter maior sucesso na amplificação, assim como nenhum *íntron* descoberto.

Lü e Wang (2011) estudaram as sequências dos genes 16S e *tufA* de espécimes nativos de *Bryopsis hypnoides* (Qingdao, China) a partir do sequenciamento *shotgun* (método usado para sequenciamento de fitas longas de DNA). Os autores observaram que existem dois grupos I *íntrons* no gene 16S rRNA, que é estruturalmente semelhante ao de *Caulerpa sertularioides* (S.G.Gmelin) M.Howe (Bryopsidales, Chlorophyta) e que o *tufA*

é um marcador molecular útil para reconstruções filogenéticas, que fornece suporte para dados biogeográficos.

Hollants et al. (2013) buscando compreender comunidades bacterianas intracelulares complexas de *Bryopsis* a partir da relação hospedeiro-simbionte, contribuíram com a otimização do protocolo de PCR para amplificar o gene 16S (rRNA), como também com a obtenção de grande número de sequências depositadas no banco de dados GenBank. Porém devido a plasticidade fenotípica e a difícil classificação a nível específico de *Bryopsis* reportado pelos autores, as sequências foram identificadas a nível genérico como *Bryopsis* sp.

Leliaert et al. (2014) contribuíram com os estudos moleculares de *Bryopsis* a partir da aplicação dos marcadores moleculares *tufA* e *rbcL*. Os autores geraram sequências para *Bryopsis corymbosa*, *B. foliosa*, *B. muscosa* e *B. myosuroides*, bem como para espécimes não classificados a nível específico (*Bryopsis* sp.). A partir das análises filogenéticas, os autores inferiram que o gênero *Pseudoderbesia* é irmã do gênero *Bryopsis*, dentro das Bryopsidaceae, com alto suporte de *bootstrap*.

Tufiño-Velázquez e Pedroche (2019) com o objetivo de obter uma visão mais ampla de *Bryopsis* na região do Atlântico, especificamente do México, realizaram um estudo filogenético a partir de sequências do gene *psbB*. A investigação confirmou que há uma inconsistência entre informações morfológicas e dados moleculares com as espécies encontradas na área. Os autores destacaram que devido à existência de poucos caracteres morfológicos no grupo, pode haver problemas de definição e delimitação de espécies e, além dos poucos caracteres morfológicos encontrados, estes são polimórficos, possivelmente influenciados por fatores ambientais, como salinidade e temperatura.

Song et al. (2019), com o intuito de delimitar as espécies causadoras da maré verde na costa do Mar de Bohai, norte da China, observaram a partir da aplicação do gene *rbcL*, que *Bryopsis plumosa* foi uma das responsáveis por esse evento de floração, e que a temperatura da água do mar foi o principal fator que selecionou a composição dessa floração algal.

Desta forma, observa-se que no contexto atual para o conhecimento da biodiversidade, é imprescindível a utilização de ferramentas moleculares em estudos que buscam delimitar as espécies e suas relações filogenéticas, sendo a aplicação de marcadores moleculares uma alternativa viável para delimitar as espécies de *Bryopsis*, que apresenta uma morfologia bastante variável e, por vezes, sobreposta.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, M. C. **Clorofíceas marinhas bentônicas da praia de Serrambi (Município de Ipojuca-Estado de Pernambuco)**. 1989. 114 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ALIYA, R.; SHAMEEL, M. Taxonomic study of coenocytic green algae commonly growing on the coast of Karachi. **Pakistan Journal of Marine Sciences**, Pakistan, v. 5, n. 1, p. 47-68, 1996.
- ANGEIRAS, J. A. P. **Clorofíceas bentônicas do litoral sul do Estado de Pernambuco**. 1995. 135 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BARROS, N. C. G. **Algas marinhas bentônicas como bioindicadoras da qualidade ambiental em área recifal de Tamandaré, Pernambuco, Brasil**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Oceanografia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BØRGESEN, F. **Some Chlorophyceae from the Danish West Indies**. *Botanisk Tidsskrift: Copenhagen*, v. 31, p. 127-152, 1911.
- BOROWITZKA, M. A. **Encyclopedia of Life Science: Phycology**. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd Chichester, 2012. 460 p.
- BURGOS, D. C. **Composição e Estrutura das comunidades de Macroalgas do Infralitoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco-Brasil, com ênfase nas Calcárias Incrustantes**. 2011. 113 f. Tese (Doutorado em em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- CARVALHO, V. F. *et al.* Benthic chlorophytes from a coastal island in the Oriental Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 203-210, 2013.
- CHRISTA, G. *et al.* Phylogenetic evidence for multiple independent origins of functional kleptoplasty in Sacoglossa (Heterobranchia, Gastropoda). **Organisms Diversity & Evolution**, Berlin, v. 15, n. 1, p. 23-36, 2014.
- CIANCIA, M. *et al.* Characterization of cell wall polysaccharides of the coenocytic green seaweed *Bryopsis plumosa* (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from the Argentine coast. **Journal of Phycology**, INGLATERRA, v. 48, p. 326-335, 2012.
- COLLINS, F. S.; HERVEY, A. B. **The algae of Bermuda**. 1. ed, Cambridge: Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences, 1917. 195 p.

COPPEJANS, E.; HEEDE, C. V. D. The Codiales (excluding *Codium*) (Chlorophyta) from Kenya, Tanzania and the Seychelles. **Belgian Journal of Botany**, Belgian, v. 129, n. 1, p. 47-65, 1996.

CORMACI, M.; FURNARI, G.; ALONGI, G. Flora marina bentonica del Mediterraneo: Chlorophyta. **Bollettino delle sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali**, Catania, v. 47, p. 11-436, 2014.

COTO, A. C. S. P. **Biodiversidade de clorófitas marinhas bentônicas do litoral do Estado de São Paulo**. 2007. 166 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio ambiente)-Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, São Paulo.

CREESE, M. R. S. **Ladies in the Laboratory? American and British Women in Science, 1800-1900**. Scarecrow Press, 1998. 468 p.

CURTIS, N.; DAWES, C.; PIERCE, S. **Phylogenetic analysis of the large subunit rubisco gene supports the exclusion of *Arainvillea* and *Cladocephalus* from the Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta)**. *Journal of Phycology*, v. 44, p. 761-767, 2008.

CUTRIM, M. V. J. **Distribuição das macroalgas na região entremarés do recife da Praia de Piedade, Município de Jaboatão dos Guararapes (Estado de Pernambuco-Brasil)**. 1990. 135 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

DOMOZYCH, D. *et al.* The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, p. 82, 2012.

EGEROD, L. E. An analysis of the siphonous Chlorophycophyta with special reference to the Siphonocladales, Siphonales and Dasycladales of Hawaii. **University of California Publications in Botany**, California, v. 25, p. 325-453, 1952.

FAMÀ, P.; KOOISTRA, W.C.H.F.; ZUCARELLO, G. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. **Journal of Phycology**, ESTADOS UNIDOS, v. 38, p. 1040-1050, 2002.

FRESHWATER, D. W.; RUENESS, J. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. **Phycologia**, Inglaterra, v. 33, n. 3, p. 187-194, 1994.

GATTY, A. **UK Sea-weeds**: Drawn from Professor Harvey's "Phycologia Britannica". Inglaterra: Bell and Daldy, 1872. 282 p.

GEPP, A.; GEPP, E.S. **Marine Algae (Chlorophyceae and Phaeophyceae) and Marine Phanerogams of the 'Sealark' Expedition, collected by J. Stanley Gardiner**,

MA, FRS, FLS. Transactions of the Linnean Society: London, v. 7, n. 10, p. 163-188, 1908.

GRANIER, B. A new and unique bodyplan in fossil Bryopsidales, with description of *Jaffrezocodium bipennatus* n. gen., n. sp., an (?) Albian-Cenomanian calcareous green alga. **Cretaceous Research**, INGLATERRA, v. 85, p. 207-213, 2018.

GUIMARAENS, M. A. *et al.* Spatiotemporal variations of *Tricolia affinis* (CB Adams, 1850) associated with the macroalgal community on reef stretches at Piedade beach, southern coast of Pernambuco State, Brazil. **African Journal of Plant Science**, Abraka, v. 9, n. 3, p. 196-204, 2015.

GUIRY, M.; GUIRY, G. **AlgaeBase**. World-Wide Electronic Publication. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 23 de janeiro de 2020.

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

HALL, J. A. *et al.* An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie Algologie**, Washington, v. 31, n. 4, p. 529-555, 2010.

HANYUDA, T.; ARAI, S.; UEDA, K. Variability in the *rbcL* introns of Caulerpalean algae (Chlorophyta, Ulvophyceae). **Journal of Plant Research**, Switzerland, v. 113, n. 4, p. 403-413, 2000.

HARVEY, W. H. **Nereis Boreali-Americana**: Contributions to a history of the marine Algae of North America. Chlorospermeae. Smithsonian Institution: Washington, v. 2 p. 37-50, 1858.

HEBERT, P.; GREGORY, R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, ESTADOS UNIDOS, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Inglaterra, v. 270, p. 313-321, 2003

HOLLANTS, J. *et al.* Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 280, p. 20122659, 2013.

HORTA, P. A *et al.* Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. **Hoehnea**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 243-265, 2001.

HOWE, M. A. Notes on some marine algae from Brazil and Barbados. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington, v. 18, n. 7, p. 186-194, 1928.

HUDSON, W. **Flora anglica**: Exhibens plantas per regnum Britanniae sponte crescentes, distributas secundum systema sexuale: cum differentiis specierum, synonymis auctorum, nominibus incolarum, solo locorum, tempore florendi, officinalibus pharmacopaeorum. London: Nourse, 1778. 690 p.

IBRAHIM, M. *et al.* **Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Based Biologically Active Compounds**. Amsterdam: Elsevier, 2017. 271 p.

INCT. **Herbário Virtual da Flora e dos Fungos**. Disponível em: <http://inct.splink.org.br>. Acesso em: 23 de janeiro de 2020.

ISHIDA, K. I. *et al.* The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. **Journal of Molecular Evolution**, Alemanha, v. 45, n. 6, p. 682-687, 1997.

JOLY, A. B. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e Arredores. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 14, p. 3-199, 1957.

JOLY, A. B.; PEREIRA, S. M. B. Chave provisória para identificação dos Gêneros de algas marinhas da zona das marés do litoral do Estado de Pernambuco. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 13, n. 1, 1972.

KAPRAUN, D. F.; SHIPLEY, M. J. Karyology and nuclear DNA quantification in *Bryopsis* (Chlorophyta) from North Carolina, USA. **Phycologia**, INGLATERRA, v. 29, n. 4, p. 443-453, 1990.

KAZI, M. A.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the *tufA*, *rbcl*, 18S rDNA and ITS rDNA genes. **PloS One**, Fürth, v. 8, n. 12, p. e82438, 2013.

KRELLWITZ, E. C.; KOWALLIK, K. V.; MANOS, P. S. Molecular and morphological analyses of *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta) from the western North Atlantic and Caribbean. **Phycologia**, INGLATERRA, v. 40, n. 4, p. 330, 2001.

KUHSEL, M. G.; STRICKLAND, R.; PALMER, J. D. An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. **Science**, Pittsburgh, v. 250, n. 4987, p. 1570-1573, 1990.

LAM, D. W.; ZECHMAN, F. W. Phylogenetic analyses of the Bryopsidales (Ulvoophyceae, Chlorophyta) based on Rubisco large subunit gene sequences 1. **Journal of Phycology**, INGLATERRA, v. 42, n. 3, p. 669-678, 2006.

LAMOUREUX, J. V. F. **Observations sur la physiologie des algues marines, et description de cinq nouveau genres de cette famille**. Nouveau Bulletin des Sciences: Paris, v. 1, p. 330-333, 1809.

LEE, W. J.; BOO, S. M.; LEE, K. Notes on the genus *Bryopsis* (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from Ullungdo Island, Korea. **Algae**, Jangan-Gu, v. 6, n. 1, p. 23-29, 1991.

LEFRANC, F. *et al.* Algae metabolites: from in vitro growth inhibitory effects to promising anticancer activity. **Natural Product Reports**, Inglaterra, v.1, p. 1-32, 2019.

LELIAERT, F. *et al.* DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, INGLATERRA, v. 49, n. 2, p. 179-196, 2014.

LELIAERT, F.; LOPEZ-BAUTISTA, J. M. The chloroplast genomes of *Bryopsis plumosa* and *Tydemania expeditiones* (Bryopsidales, Chlorophyta): compact genomes and genes of bacterial origin. **BMC Genomics**, INGLATERRA, v. 16, n. 1, p. 204, 2015.

LINNAEUS, C. *Ž. Species Plantarum: exhibentes plantas rite cognitae ad genera relatas cum differentiis specificis, nominibus trivialibus synonymis selectis, locis natalibus secundum systema sexuale digestas.* Kessinger Publishing, 1762. 804 p.

LÜ, F.; WANG, G. Sequence and phylogenetic analyses of the chloroplast 16S rRNA, *tufA*, and *rbcL* genes from *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, China, v. 29, n. 5, p. 922, 2011.

LUETZELBURG, P. **Estudo Botânico do Nordeste.** Inspetoria Federal de Obras contra as Secas: Ministério de Viação e Obras Públicas, Rio de Janeiro. v. 3 1922-1923. 126 p.

MALCATA, F.X.; PINTO, I.S.; GUEDES, A. C. **Marine Macro-and Microalgae: An Overview.** 1ed. Nova York: CRC Press, 2018. 342 p.

MARTIUS, C. F. P *et al.* **Algae, lichenes, hepaticae:** Flora brasiliensis seu enumeratio plantarum in Brasília tam sua sponte quam accedente cultura provenientium. Stuttgart & Tübingen. 1833. 50 p.

MCCOURT, R.M. *et al.* Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on *rbcL* sequences. **Journal of Phycology**, ESTADOS UNIDOS, v. 36, n. 4, p. 747-758, 2000.

MIOSSI, W.; AQUJE, G.; ALVES, J. P. A. Levantamento das Clorofíceas (Chlorophyta) marinhas bentônicas do litoral de Aracruz, estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, Espírito Santo, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2004.

MOHAN, A. *et al.* **Microbial DNA Barcoding: Prospects for Discovery and Identification.** *In:* DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. Springer, Alemanha, v. 1, p. 89-102, 2018.

MORABITO, M.; GARGIULO, G.; GENOVESE, G. A review of life history pathways in *Bryopsis*. **Atti della Accademia Peloritana dei Pericolanti-Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali**, Messina, v. 88, n. 2, 2010.

MUÑOZ, A. O. M.; PEREIRA, S. M. B. Caracterização quali-quantitativa das comunidades de macroalgas nas formações recifais da Praia do Cupe-Pernambuco (Brasil). **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 25, p. 93-109, 1997.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. 1977. 406 f. Tese (Concurso Livre Docência em Ficologia)-Universidade de São Paulo. São Paulo.

PEDRINI, A. *et al.* Algas marinhas bentônicas do Arquipélago de Fernando Noronha, Brasil. **Boletim de Botânica (USP)**, São Paulo, v. 13, p. 93-101, 1992.

PEREIRA, S. M. B. *et al.* Algas marinhas bentônicas do Estado de Pernambuco. *In*: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Org.). **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. 1ed. Recife: Massangana, 2002, v. 1, p. 97-124.

PEREIRA, S. M. B. *et al.* Taxonomia das Clorófitas Marinhas. *In*: PEDRINI, A. G. (Org.). **Macralgas (Chlorophyta) e Gramas (Magnoliophyta) marinhas do Brasil**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2011. p. 41-99.

PEREIRA, S. M. B.; ACCIOLY, M. C. Clorofíceas Marinhas Bentônicas da Praia de Serrambi, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 12, n. 1, p. 25-52, 1998.

PEREIRA, S. M. B.; MANSILLA, A. O. M.; COCENTINO, A. L. M. Ecological aspects of a benthic marine algal community in Southeast Bay, Archipelago of Fernando de Noronha-Brazil. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 24, p. 157-163, 1996.

PORTUGAL, A.B. *et al.* Structure of macroalgal communities on tropical rocky shores inside and outside a marine protected area. **Marine Environmental Research**, ESTADOS UNIDOS, v. 130, p. 150-156. 2017.

RAUCH, C. *et al.* Why it is time to look beyond algal genes in photosynthetic slugs. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 9, p. 2602-2607, 2015.

RIBEIRO, F. A. *et al.* Análise quali-quantitativa das populações algáceas de um trecho recifal na Praia de Boa Viagem, PE. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 4, 2008.

RIETEMA, H. A morphological, developmental, and caryological study on the life-history of *Bryopsis halymeniae* (Chlorophyceae). **Netherlands Journal of Sea Research**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 445-457, 1972.

RIETEMA, H. **Comparative investigations on the life-histories and reproduction of some species in the Siphonous green algal genera *Bryopsis* and *Derbesia***. 1975. 130 f. Tese (Doutorado em Filosofia)-University of Groningen. Netherlands.

RIETEMA, H. Life-history studies in the genus *Bryopsis* (Chlorophyceae) IV. Life-histories in *Bryopsis hypnoides* Lamx. from different points along the european coasts. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 291-298, 1971.

SANTOS, A. A. *et al.* Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da Praia de Boa Viagem-Pernambuco, Brasil. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, Tamandaré, v. 14, n. 2, p. 25-33, 2006.

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

SAUVAGE, T. *et al.* A metabarcoding framework for facilitated survey of endolithic phototrophs with *tufA*. **BMC Ecology**, Inglaterra, v. 16, n. 1, p. 8, 2016.

SCHAFFNER, J. H. The classification of plants XII. **Ohio Journal of Science**, Ohio, v. 22, p. 129-139, 1922.

SCHMIDT, O. C. Meeresalgen der Sammlung von Lützelburg aus Brasilien. **Hedwigia**, Stuttgart, v. 65, p. 85-100, 1924.

SHIMADA, S. *et al.* Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. **Phycological Research**, Japão, v. 51, n. 2, p. 99-108, 2003.

SILVA, E. G. **Estrutura e composição das comunidades de Amphipodas associadas às macroalgas dos recifes de arenito da Baía de Suape, PE-Brasil**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, R. S. V. I. P. Carcinofauna associada ao fital *Caulerpa Racemosa* (Forsskål) J. Agardh e *Bryopsis* spp. do Arquipélago de São Pedro e São Paulo-Brasil. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 46, n. 1, p. 1-25, 2018.

SIMÕES, I. P. *et al.* Avaliação florística e sucessão ecológica das macroalgas em recifes na Praia de Piedade (PE). **Neotropical Biology and Conservation**, Rio Grande do Sul, v. 4, n. 1, p. 49-56, 2009.

SKUSE, F. A. A. **The banded mosquito of Bengal.** Indian Museum Notes, 1894. 30: 20-20.

SOARES, L. P. **Macroalgas epífitas nos recifes da Praia de Boa Viagem, município de Recife, Pernambuco, Brasil.** 2011.173 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOARES, L. P.; FUJII, M. T. Novas ocorrências de macroalgas marinhas bentônicas no estado de Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 557-570, 2012.

SONG, W. *et al.* Tracking the original source of the green tides in the Bohai Sea, China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Estados Unidos, v. 219, p. 354-362, 2019.

SOUSA, G. S.; COCENTINO, A. L. M. Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da Praia de Piedade-PE. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 32, n. 1, p. 1-22, 2004.

SZECHY, M. T. M. *et al.* Contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas de Fernando de Noronha. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 67, p. 53-61, 1989.

TAYLOR, W. R. **A synopsis of the marine algae of Brazil.** Laboratoire de Cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle. Revue Algologie: Paris, v. 5, p. 279-313, 1931.

TUFIÑO-VELÁZQUEZ, R. C.; PEDROCHE, F. F. Las especies del género *Bryopsis* (Chlorophyta) presentes en las costas del Atlántico mexicano. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, México, v. 90, p. e902679, 2019.

VASCONCELOS, E. R. T. P. P. **Macroalgas marinhas como ferramenta de avaliação do estado de conservação de ambientes recifais em Pernambuco.** 2016. 134 f. Tese (Doutorado em Oceanografia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

VERBRUGGEN, H. *et al.* A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, n. 3, p. 642-653, 2009a.

VERBRUGGEN, H. *et al.* Phylogenetic analysis of *Pseudochlorodesmis* strains reveals cryptic diversity above the family level in the siphonous green algae (Bryopsidales, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, Inglaterra, v. 45, n. 3, p. 726-731, 2009b.

VIEIRA, H.H. *et al.* *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. **Algae**, Coreia, v. 31, n. 2, p. 155-165, 2016.

VILLAÇA, R. *et al.* **Flora marinha bentônica das ilhas oceânicas brasileiras.** In: Ilhas Oceânicas Brasileiras da Pesquisa ao Manejo. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, v. 1, p. 105-146, 2006.

WILLIAMS, S. L.; SMITH, J. E. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, California, v. 38, p. 327-359, 2007.

WOMERSLEY, H. B. S. **The marine benthic flora of southern Australia**. Canberra: Australian Biological Resources Study, 1984. 508 p.

WOOLCOTT, G. W.; KNÖLLER, K.; KING, R. J. Phylogeny of the Bryopsidaceae (Bryopsidales, Chlorophyta): cladistic analyses of morphological and molecular data. **Phycologia**, Inglaterra, v. 39, n. 6, p. 471-481, 2000.

WYNNE, M. J. Two new species of *Bryopsis* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from the Sultanate of Oman, with a census of currently recognized species in the genus. **Contributions from the University of Michigan Herbarium**, Ann Arbor, v. 24, p. 229-256, 2005.

WYNNE, M.J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: fourth revision. **Nova Hedwigia Journal of Cryptogamic Sciences**, Alemanha, v. 4, p 1-202, 2017.

YU, K.X. *et al.* Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Molecules**, Suíça, v. 20, n. 8, p. 14082-14102, 2015.

ZELLER, G. Algae brasiliensis circa Rio de Janeiro a Dr. Glaziou, Horti publici directore collectae. **Symbolae ad floram Brasiliae centralis cognoscendam**, København, v. 22, p. 426-432, 1876.

ZHANG, Z. *et al.* Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, Inglaterra, v. 82, n. 1, p. 118-121, 2010.

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA:
ACTA BOTANICA BRASILICA

Qualis Capes: B1
Fator de Impacto: 1.112

Artigo Original

Primeira abordagem molecular do gênero *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta) do Brasil, com ênfase na costa de Pernambuco

Marcella Guennes Tavares De Oliveira^{1*}; Sonia Maria Barreto Pereira¹; Ana Maria Benko-Iseppon²; Wilson José Da Silva Junior³; Maria De Fátima De Oliveira Carvalho¹; Valéria Cassano⁴.

¹ Laboratório de Ficologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil;

² Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil;

³ Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil;

⁴ Laboratório de Algas Marinhas, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo / Instituto de Biociências, 05508-090, São Paulo, Brasil.

* marcellaguennes@hotmail.com

Introdução

O gênero *Bryopsis* está inserido no filo Chlorophyta, na ordem Bryopsidales e engloba aproximadamente 58 espécies taxonomicamente aceitas, oito variedades e cinco formas (Guiry e Guiry 2020). Seus representantes constituem um grupo com hábito predominantemente marinho, que se desenvolvem principalmente em áreas onde ocorrem costões rochosos e recifes de corais, em temperaturas que variam entre 5 a 27°C (Horta *et al.* 2001). Com morfologia considerada simples, as espécies desse gênero são constituídas por filamentos cenocíticos não-calcificados e talos uniaxiais eretos com ramos semelhantes à uma pena, denominado fronde (Wynne 2005; Cremen *et al.* 2019).

As espécies de *Bryopsis* apresentam importância ecológica como produtores primários de ecossistemas aquáticos, como também servem de abrigo e proteção para pequenos invertebrados. O gênero abriga espécies potencialmente invasoras que dominam o ambiente em condições eutróficas, desta forma, são considerados excelentes bioindicadoras (Williams e Smith 2007). Devido à importância dos seus compostos bioativos, algumas espécies, como *B. pennata* e *Bryopsis plumosa* apresentam importância farmacológica, com atividades antifúngica, antibacteriana e anticoagulante (Ibrahim *et al.* 2017). Além dessas aplicações, servem como matéria prima em estudos para o tratamentos de câncer de pulmão e de próstata, tumores e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Zhang *et al.* 2010; Holdt e Kraan 2011; Lefranc *et al.* 2019) e, no desenvolvimento de repelentes contra os mosquitos *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, vetores de arboviroses como a dengue, chikungunya, zika e febre amarela (Yu *et al.* 2015).

Considerando a importância do gênero *Bryopsis* em diferentes áreas do conhecimento, tais como, ecologia, química, genética, medicina, microbiologia e farmacologia, estudos voltados para o conhecimento taxonômico das suas espécies mostram-se necessários (Song *et al.* 2019). Até o momento, a maioria dos trabalhos realizados foi focada em análises morfológicas, reprodutivas e citogenéticas. Porém, diante dos avanços tecnológicos para delimitação das espécies, alguns autores consideram que a classificação a partir de análises morfológicas podem oferecer uma identificação errônea (Krellwitz *et al.* 2001), do mesmo modo, as análises dos ciclos de vida e cromossômicas, contribuem para a resolução a níveis taxonômicos superiores, tornando insuficientes para resolução dos problemas taxonômicos a nível de espécie (Kapraun e Shipley 1990). Considerando a importância das espécies de *Bryopsis*, o crescente

interesse científico e as dificuldades em delimitar adequadamente as categorias infragenéricas e infraespecíficas do gênero, tem-se desenvolvido alternativas como a aplicação de marcadores moleculares visando melhor delimitar suas espécies e inferir suas relações filogenéticas (Saunders e Kucera 2010).

A caracterização através da aplicação de marcadores moleculares tem se mostrado uma ferramenta útil para delimitar as espécies do gênero (Krellwitz *et al.* 2001). Para as algas verdes, até o momento, os marcadores moleculares do cpDNA (DNA do cloroplasto), foram os mais estudados. Dentre eles, o *tufA* (plastid elongation factor) obteve os melhores resultados na universalidade dos *primers* e qualidade das sequências, seguido do marcador *rbcL* (rubisco large subunit) (Saunders e Kucera 2010). Desta forma, estes marcadores têm sido amplamente empregados em estudos moleculares para delimitar espécies de algas verdes, incluindo *Bryopsis* (Provan *et al.* 2004; Leliaert e Lopez-Bautista 2015; Händeler *et al.* 2010; Hall *et al.* 2010; Leliaert *et al.* 2014; Cremen *et al.* 2019), sendo o *tufA* proposto como marcador do tipo *DNA barcode* para as macroalgas verdes (Saunders e Kucera 2010) e o *rbcL* considerado adequado para reconstrução filogenética (Freshwater *et al.* 1994). Ambos, vem sendo amplamente utilizado para análises filogenéticas a nível genérico e específico nas algas verdes (Mccourt *et al.* 2000; Shimada *et al.* 2003; Lam e Zechman 2006; Kazi *et al.* 2013).

A junção da técnica molecular somada às técnicas da taxonomia clássica, com descrição e identificação de caracteres morfológicos, vem preenchendo lacunas no que diz respeito ao conhecimento e delimitação das espécies crípticas e que apresentam elevada plasticidade fenotípica como é o caso da espécies de *Bryopsis* (Woolcott *et al.* 2000; Saunders 2005). Nesse contexto, considerando a importância das espécies de *Bryopsis*, a plasticidade morfológica dos seus indivíduos e a eficiência na aplicação dos marcadores moleculares para delimitação das espécies do gênero, esse trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade e esclarecimento das relações filogenéticas de *Bryopsis* a partir da aplicação de marcadores moleculares *tufA* e *rbcL*, partindo do pressuposto que a diversidade desse gênero esteja superestimada para o litoral de Pernambuco.

Materiais e métodos

Área de estudo

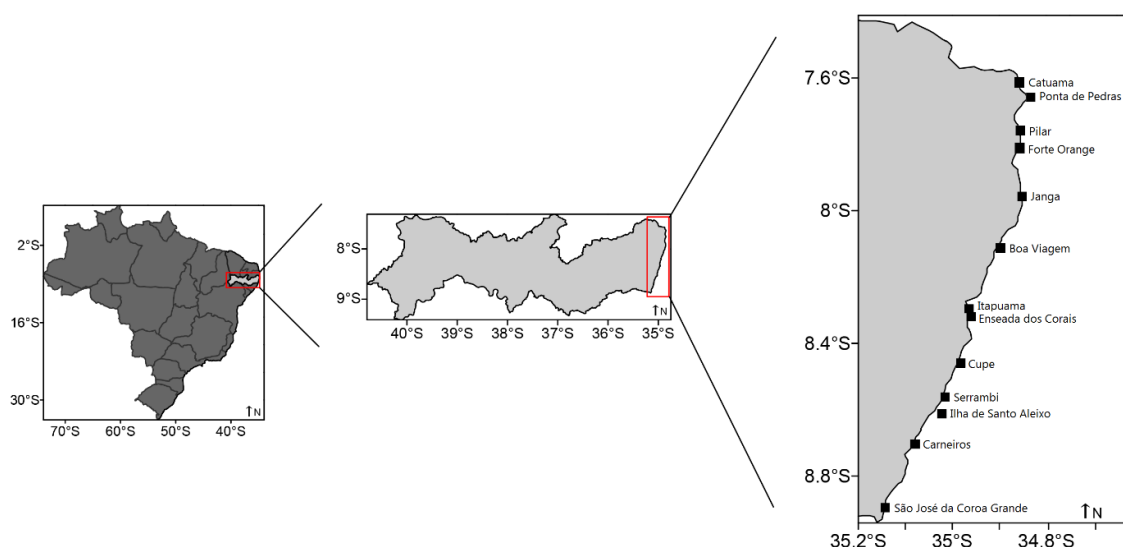
Os espécimes foram coletados no litoral do estado de Pernambuco (PE), nordeste do Brasil (7°15'45"; 9°28'18"S e 34°48'35"; 41°19'54"W) no período de 2016 a 2017 no

mesolitoral durante a maré baixa. A área está situada no Oceano Atlântico Ocidental na Zona Tropical e apresenta águas quentes, transparentes e oligotróficas (Horta *et al.* 2001).

Coleta do material botânico

O material foi coletado ao longo do litoral de PE em 13 pontos de coleta (Fig. 9, Anexo 1), armazenado em etanol absoluto e sílica gel e, posteriormente, separado para as análises morfológicas e moleculares, respectivamente. Os espécimes foram depositados no Herbário Prof. Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 9. Mapa com distribuição dos pontos de coleta de *Bryopsis* J.V.Lamouroux no estado de Pernambuco (Nordeste-Brasil).



Análise molecular

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1987). Para as ampliações em cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados dois pares de *primers*, um para o marcador *tufA* F (5'-TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC-3') e R (3'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-5'), seguindo as recomendações de ciclos descritos em Famà *et al.* (2002) e outro para o marcador *rbcL* F603 (5'-TCWCAACCHTYTATGCGTTGG-3') e R1396 (3'-AATTTCTTTCCAAACTTCAC AAGC-5'), com ciclos 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). As reações consistiram em 36,25 µL de água mili-q autoclavada, 5 µL de 10x PCR *buffer* (sem Mg), 1,5 µL de 50 mM MgCl₂, 1 µL

de 2 μ L de dNTP, 1 μ L de *primer* F, 1 μ L de *primer* R, 3 μ L de DNA total, 1,25 μ L de Taq DNA polimerase (Promega Corp., Madison, WI, EUA). Os fragmentos foram amplificados no termociclador Techne TC-4000 (Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, Inglaterra). Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel agarose (1%). Os fragmentos obtidos na amplificação passaram pelo processo de purificação usando-se o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), seguindo instruções do fabricante. As amostras purificadas foram sequenciadas através do ABI PRISM 3100 ou ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, EUA) utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com os mesmos *primers* da PCR.

As sequências obtidas foram averiguadas utilizando o algoritmo BlastN, através da plataforma online do NCBI (Altschul *et al.* 1997). Para montagem das sequências consenso foi utilizado o programa BioEdit v 7.0.4.1 (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, EUA) (Hall 1999). Para cada marcador foi montada uma matriz com as sequências consensos juntamente com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank. As matrizes foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW no programa BioEdit v. 7.0.4.1.

As análises moleculares foram realizadas usando o método da distância de Neighbor-Joining (NJ) no programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) com 2000 réplicas de bootstrap. Para análise filogenética, o modelo mais apropriado de evolução de sequência para máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI) foi selecionado usando o jModeltest v2.1.10 (Darriba *et al.* 2012) sob o Critério de Informação de Akaike (AIC) implementado no servidor online CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.* 2010). O modelo selecionado para *tufA* e *rbcL* foi o modelo geral reversível no tempo de substituição de nucleotídeos com locais invariantes e taxas de distribuição gama para os locais variáveis (GTR + I + G). A análise de máxima verossimilhança (ML) foi realizada usando o IQ-Tree v1.4.3 (Nguyen *et al.* 2015) com 1000 réplicas bootstrap no portal da web do IQ-Tree. A inferência bayesiana foi realizada usando o programa MrBayes v.3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012). Para a análise da probabilidade a posteriori (PP) da análise bayesiana, duas corridas com quatro cadeias de MCMC (Markov Monte Carlo) foram realizadas com 4×10^6 gerações, com reamostragem a cada 1000 gerações por 4.000.000 gerações. Foram descartadas as primeiras 50.000 gerações como “*burn-in*”. Após

eliminar as árvores associadas ao “*burn-in*”, uma árvore consenso foi construída para os marcadores *tufA* e do *rbcL*. Em todas as análises os gaps foram considerados como dados ausentes. 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.

Análise morfológica

Cada grupo de frondes foi tratado como um indivíduo separado. Caracteres morfológicos foram analisados com o auxílio de um microscópio óptico Zeiss, modelo Axioskop (Carl Zeiss Company, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) e microscópio estereoscópico Leica S6D (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para visualização e medição da fronde e das pínulas. Medidas mínimas e máximas foram tomadas para caracteres morfométricos a partir de um conjunto de 10 medidas para cada característica analisada em todas as amostras de diferentes locais de amostragem. A identificação das espécies foi baseada em Cormaci *et al.* (2014) e Nizamuddin (1995) com a nomenclatura atualizada de acordo com o banco de dados Algaebase (Guiry e Guiry 2020). As imagens foram capturadas através de microscópio Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss Company, Göttingen, Alemanha) equipado com câmera modelo AxioCam RMc e estereomicroscópio Discovery-V8 A1 (Carl Zeiss Company, Göttingen, Alemanha) equipado com câmera AxioCam 105 Color, com imagens processadas através do software ZEN® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha).

Resultados

Análise molecular

Foram obtidas 31 novas sequências de *Bryopsis* a partir de exemplares coletados no litoral de Pernambuco, sendo 19 sequências de *tufA* e 12 sequências de *rbcL* (Anexo 2). Para o marcador *tufA* foi construída uma matriz com 53 sequências com um alinhamento de 733 pb, sendo 34 sequências obtidas do GenBank, das quais três foram usadas como grupos externos, *Codium tomentosum* Stackhouse (KX855797), *Pseudoderbesia arbuscula* E.Calderon e R. Schnetter (MH591099) e *Derbesia* sp. (KU361860) (Fig. 10).

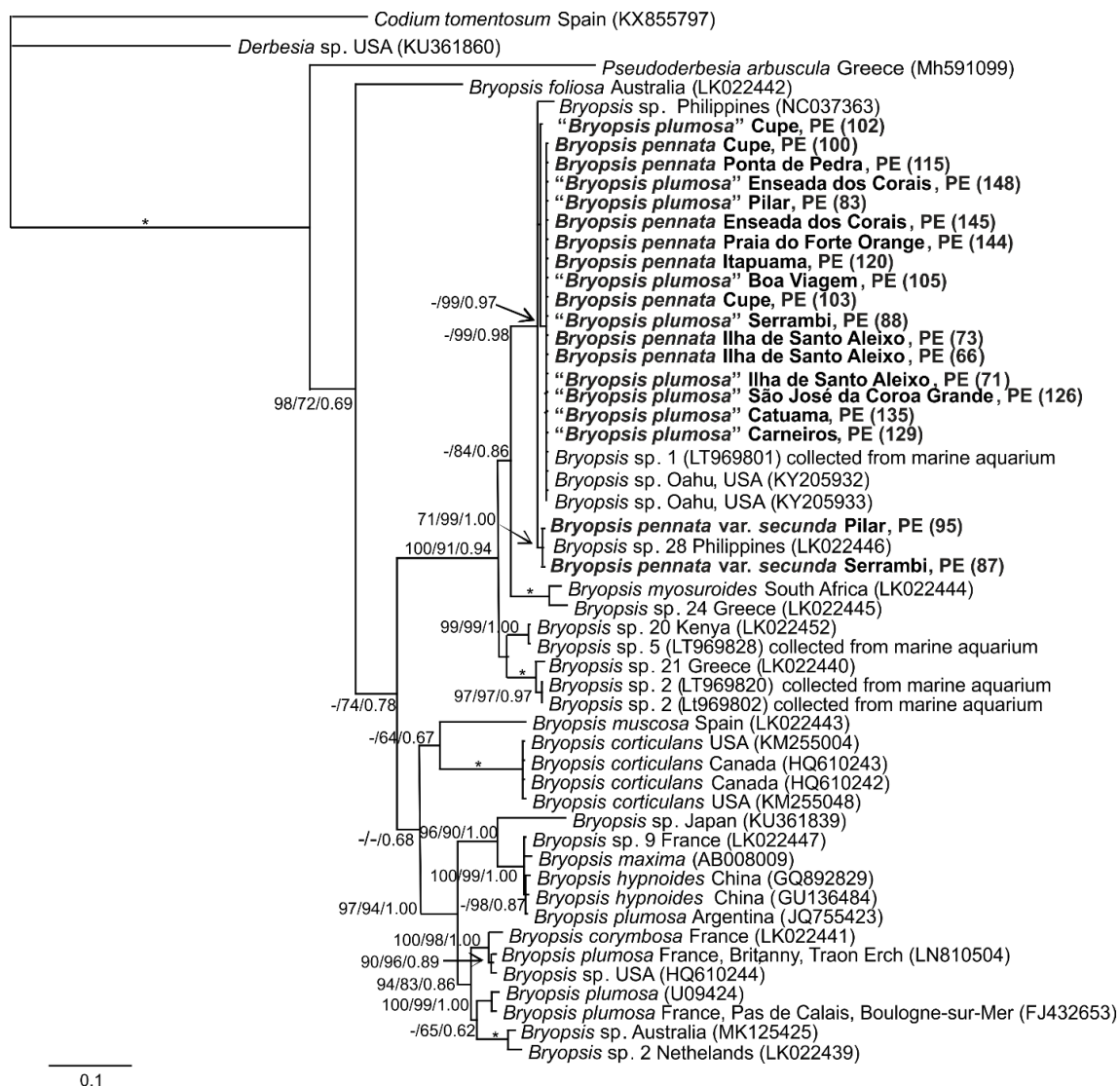
As análises de *tufA* recuperam *Bryopsis* como monofilético, com alto suporte para Neighbor-Joining e moderado para máxima verossimilhança (Fig. 10). As sequências brasileiras formaram dois subclados com suporte alto para máxima verossimilhança e probabilidade *a posteriori*. O maior subclado agrupou a maioria das amostras coletadas, identificadas como “*B. plumosa*” e *B. pennata*, com alto suporte de máxima

verossimilhança e probabilidade *a posteriori*, e no qual foram agrupadas outras três sequências não identificadas de *Bryopsis* (*Bryopsis* sp. de Oahu, EUA e *Bryopsis* sp.1, coletada a partir de aquário marinho). Excetuando a amostra “*B. plumosa*” (102), todas as sequências deste subclado foram 100% idênticas, incluindo *Bryopsis* sp. e *Bryopsis* sp.1 do GenBank. A amostra 102 variou das demais de 0,15% (102 vs. *Bryopsis* sp. e *Bryopsis* sp. 1) a 0,21% (102 vs. 129). A baixa divergência deste subclado (0-0,21%) indica que todas as amostras pertencem à mesma entidade taxonômica. O segundo subclado foi formado por duas amostras brasileiras de *B. pennata* var. *secunda* agrupadas com uma amostra não identificada de *Bryopsis*, nomeada como *Bryopsis* sp. 28 das Filipinas, todas 100% idênticas, e com suporte alto a moderado. A falta de divergência genética entre as sequências deste subclado sustenta que todas correspondem ao mesmo táxon. Esses dois subclados (“*B. plumosa*”, *B. pennata*, *Bryopsis* sp.1 e *Bryopsis* sp. vs. *B. pennata* var. *secunda* e *Bryopsis* sp.28) divergiram entre si de 0,96% a 1,57%.

Para as quatro amostras procedentes do GenBank que se agruparam nesses dois subclados (*Bryopsis* sp., *Bryopsis* sp.1 e *Bryopsis* sp.28), não foram fornecidas descrições pelos autores que possibilite comparação morfológica com o material brasileiro. As divergências para esses dois clados são mostradas no anexo 3.

Quatro sequências de *tufA* de *Bryopsis plumosa* do GenBank foram incluídas nas análises e esta espécie mostrou-se parafilética (Fig. 10). A amostra de *B. plumosa* da Argentina (JQ755423) não se agrupou com as demais procedentes da França (LN810504, FJ432653) e com outra cujo local de coleta não foi especificado (U09424). Essas três últimas sequências se dividiram em dois subclados (Fig. 10). A localidade tipo de *B. plumosa* é Exmouth, Devon, Inglaterra. A sequência LN810504 da França (Traon Erch, Bretanha) corresponde ao sequenciamento completo do genoma do cloroplasto feito por Leliaert e López-Bautista (2015), e sua procedência corresponde a local próximo à localidade tipo, portanto, essa sequência do Atlântico Norte, é considerada representante da autêntica *B. plumosa*. A sequência LN810504 formou um subclado com *Bryopsis* sp. dos EUA (HQ610244), sendo 100% idênticas e com uma sequência de *B. corymbosa* da França mais divergente. A outra sequência de *B. plumosa* da França (FJ432653, Pas de Calais, Boulogne-sur-Mer), gerada por Verbruggen *et al.* (2009a), também é de origem próxima à localidade tipo, porém formou outro subclado com *B. plumosa* (U09424), cuja divergência entre elas é 0,99%.

Figura 10. Árvore consenso de inferência bayesiana do *tufA* para amostras de *Bryopsis*. As seqüências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. Apenas valores acima de 60% de bootstrap e 0,6 de probabilidade *a posteriori* estão indicados nos ramos, NJ/ML/PP. (*) Indica suporte máximo do ramo em todas as análises.



As duas seqüências de *B. plumosa* da França mostraram alta divergência (3,3%), indicando que se tratar de uma espécie críptica. A amostra de *B. plumosa* da Argentina (JQ755423) se mostrou altamente divergente das demais seqüências de *B. plumosa*, variando de 7,0 a 7,2% (Anexo 4). A amostra da Argentina foi gerada por Ciancia *et al.* (2012) tendo sido descrita, ilustrada e sequenciada com os genes *tufA* e *rbcL* por esses autores, sendo confirmada sua identificação como *B. plumosa*, o que reforça o caráter críptico dessa espécie.

Nove amostras coletadas em diferentes pontos da costa de Pernambuco, de norte a sul do estado, foram previamente identificadas como "*B. plumosa*" (Anexo 7). Essas

amostras foram altamente divergentes de *B. plumosa* da França (LN810504), variando de 12,2 a 13,6%, confirmando que as amostras não correspondem à autêntica *B. plumosa*, embora plantas morfológicamente típicas dessa espécie tenham sido observadas (Fig. 13E-J).

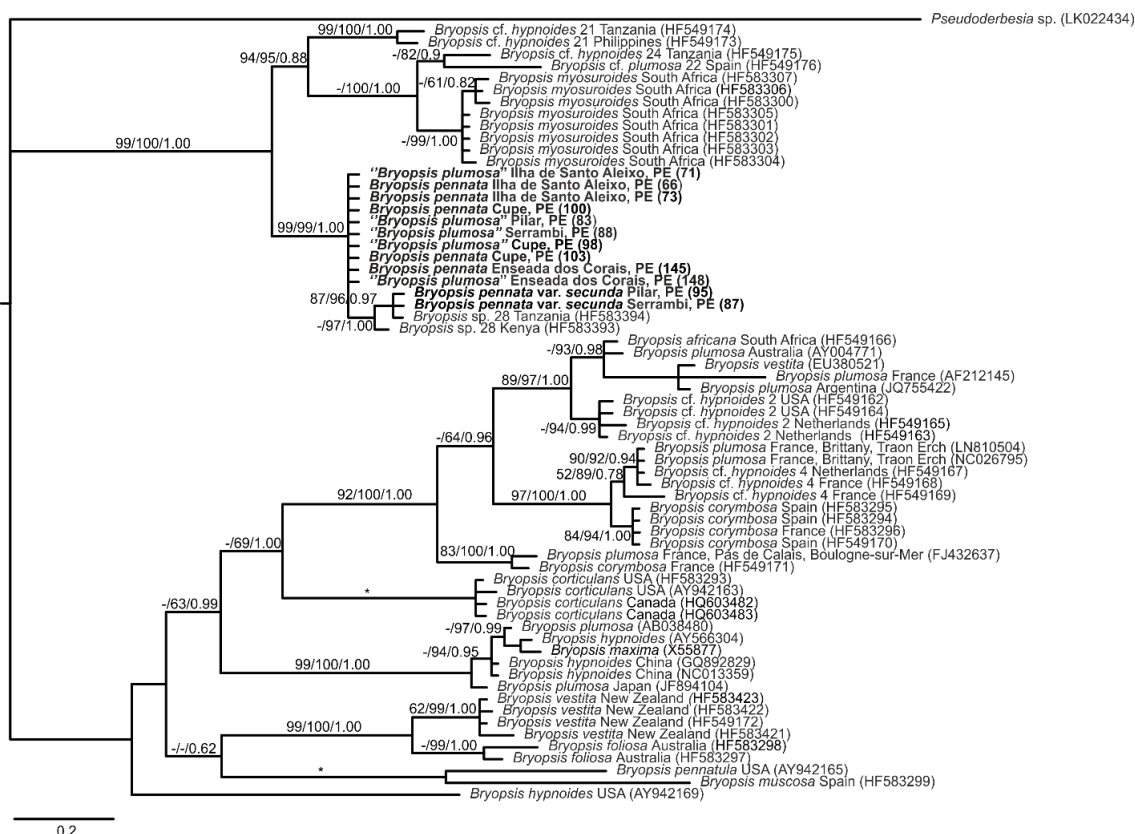
As oito amostras identificadas como *B. pennata* (Anexo 7) posicionadas neste mesmo clado, também com ampla distribuição na costa de Pernambuco, não puderam ser comparadas molecularmente com nenhuma sequência de *tufA* de *B. pennata*, uma vez que não há sequências deste marcador disponíveis nos bancos de dados. Como a possibilidade da citação de *B. plumosa* entre as amostras estudadas, pode ser descartada pelos dados moleculares, nós mantivemos a identificação dessas amostras como *B. pennata*, sustentada também pelas análises morfológicas, com plantas típicas observadas em diferentes amostras (Fig. 12C-D). Os resultados demonstraram que *B. pennata* é extremamente polimórfica, enquanto que a divergência genética entre as amostras foi muito baixa. As amostras de *B. pennata* var. *secunda* também divergiram em altos valores de porcentagem da autêntica *B. plumosa* (12,3-12,6%-Anexo 5). A divergência interespecífica observada entre as amostras brasileiras e as procedentes do GenBank consideradas nesse estudo variou de 3,3-16,2% para o *tufA* (Anexos 4-5).

Para o *rbcL* foi construída uma matriz com 66 sequências, com um alinhamento de 1284 pb. Das 54 sequências obtidas do GenBank, *Pseudoderbesia* sp. (LK022434) foi usada como grupo externo (Fig. 11). As divergências genéticas apresentadas para o *rbcL* foram calculadas sobre o alinhamento final de 1284 pb a partir da qual a árvore consenso foi gerada (Fig. 11). Uma segunda matriz de *rbcL* foi construída com um maior número de sequências de *Bryopsis* disponíveis no GenBank visando averiguar a posição filogenética das amostras brasileiras mediante uma maior amostragem. Essa matriz consistiu de um total de 147 sequências e, devido a muitas sequências serem parciais para esse marcador, foi gerado um alinhamento mais curto com 689 pb, a partir do qual foi feita uma análise de máxima verossimilhança. Os resultados obtidos nas duas análises foram similares, com as amostras brasileiras apresentando o mesmo posicionamento filogenético (Fig. 11).

A árvore consenso de *rbcL* (Fig. 11) mostra que a monofilia do gênero *Bryopsis* não foi sustentada por esse gene. Contudo, as sequências brasileiras se agruparam de forma similar aos resultados obtidos com o *tufA*, com alto suporte para todas as análises. As amostras identificadas como *B. pennata* e “*B. plumosa*” são 100% idênticas. As duas

sequências brasileiras de *B. pennata* var. *secunda* (100% idênticas) se agruparam em um subclado com duas sequências do GenBank, nomeadas como *Bryopsis* sp. 28, uma procedente da Tanzânia (HF583394) e outra do Quênia (HF583393), com alto suporte para máxima verossimilhança e probabilidade *a posteriori*. As amostras brasileiras de *Bryopsis pennata* - “*B. plumosa*” divergiram da var. *secunda* em 0,4%. A divergência dentro do subclado formado por *B. pennata* var. *secunda* e *Bryopsis* sp. 28 foi muito baixa, variando de 0% (*B. pennata* var. *secunda* vs. *Bryopsis* sp. 28 da Tanzânia) a 0,15% (*B. pennata* var. *secunda* vs. *Bryopsis* sp. 28 do Quênia), indicando que se tratam de um mesmo táxon. A divergência genética entre as amostras *B. pennata* - “*B. plumosa*” vs. *B. pennata* var. *secunda*-*Bryopsis* sp. 28 para o *rbcL* variou de 0,27-0,4%, sendo mais baixa do que a observada com o *tufA*.

Figura 11. Árvore consenso de inferência bayesiana do *rbcL* para amostras de *Bryopsis*. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. Apenas valores acima de 60% de bootstrap e 0,6 de probabilidade *a posteriori* estão indicados nos ramos, NJ/ML/PP. (*) Indica suporte máximo do ramo em todas as análises.



Oito sequências de *rbcL* de *B. plumosa* do GenBank foram incluídas nas análises (Fig. 11). Essas sequências formaram quatro clados distintos, indicando que *B. plumosa*

não é monofilética, corroborando os resultados do *tufA*. Entre as oito sequências analisadas, duas são representantes da autêntica *B. plumosa*, procedentes de Traon Erch, Bretanha, França (LN810504 e NC026795), região próxima à localidade tipo (Exmouth, Devon, Inglaterra). A divergência genética entre essas amostras da França e as brasileiras ("*B. plumosa*" - *B. pennata*) foi alta, 8,0%, enquanto que a divergência com as amostras de *B. pennata* var. *secunda* foi um pouco maior, 8,6%. Outra sequência de *B. plumosa* da França próxima à localidade tipo (Pas de Calais, Boulogne-sur-Mer, FJ432637, Verbruggen *et al.* 2009a) posicionou-se em um clado distinto (junto com *B. corymbosa*, França) e divergiu de "*B. plumosa*" - *B. pennata* em 6,7-6,9% e de *B. pennata* var. *secunda* em 7,1-7,2%. As divergências genéticas observadas entre o material brasileiro e as amostras de *B. plumosa* do GenBank procedentes de diferentes regiões (França, Austrália, Argentina e Japão) são mostradas no anexo 6.

Uma sequência de *rbcL* de *B. pennata*, com 562 pb (DQ469323) está disponível no GenBank. Essa amostra foi coletada nas Ilhas Virgens (St. Thomas) correspondendo, portanto, a uma sequência da localidade tipo (Mar do Caribe). Entretanto, a região parcialmente amplificada dessa sequência não foi coincidente com as sequências impedindo a comparação entre elas.

A divergência intraespecífica observada para diferentes táxons incluídos nas análises com o *rbcL* foi baixa. Para as quatro sequências de *B. corymbosa* (Espanha e França) não houve divergência entre as amostras (Fig. 11); os cladogramas formados por oito sequências de *B. myosurioides* (África do Sul) e quatro sequências de *B. vestita* (Nova Zelândia) mostraram ambos divergência de 0-0,2%; o clado com quatro sequências de *B. cf. hypnoides* 2 (EUA e Holanda) variou de 0,08-0,2%; enquanto as quatro sequências que formaram o clado de *B. corticulans* (EUA e Canadá) mostraram divergência intraespecífica ligeiramente maior, 0-0,3%. Contudo, a amplitude de variação de divergência intraespecífica para esses táxons coletados em diferentes áreas geográficas (0-0,3%) se manteve abaixo, embora próximo ao limite da divergência observada entre as sequências brasileiras da variedade típica de *B. pennata* e sua categoria infraespecífica, *B. pennata* var. *secunda*, cuja divergência genética foi de 0,4%. Apesar da menor divergência observada entre esses dois táxons para o *rbcL* (0,4%) em comparação com o *tufA* (0,96-1,57%), os agrupamentos formados por *B. pennata* e *B. pennata* var. *secunda* foram os mesmos para os dois marcadores. A divergência interespecífica observada entre

as amostras brasileiras e as procedentes do GenBank consideradas nesse estudo variou de 6,7-11,6% para o *rbcL* (Anexo 6).

Análise morfológica

Baseado nas análises moleculares, dois táxons de *Bryopsis* foram identificados para o litoral de Pernambuco: *B. pennata* e *B. pennata* var. *secunda*. Foram obtidas 21 amostras, 19 identificadas como *B. pennata* (incluindo o morfotipo “*B. plumosa*”) e duas como *B. pennata* var. *secunda*.

Bryopsis pennata J.V.Lamouroux (1809, p. 333).

(Fig. 12A-O)

Sinônimo homotípico: *Bryopsis plumosa* var. *pennata* (J.V.Lamouroux) Børgesen

Localidade tipo: Antilhas-Mar do Caribe

Descrição: Plantas eretas, formando tufos pouco densos de até 8,0 cm de altura (Fig. 12A). Talo filamentosos, cenocítico, cilíndrico, flácido em textura, de coloração verde-escuro a verde-clara, fixo ao substrato por rizoides. Fronde com aspecto linear a lanceolado (Fig. 12C-D). Filamentosos eretos geralmente com uma ordem de ramos laterais (pínulas) de comprimento aproximadamente uniforme ao longo do eixo, gradativamente menores em direção ao ápice do talo (Fig. 12E-I). Filamentosos geralmente desnudos na porção inferior do talo e com ramificação oposta dística ou ligeiramente alterna no terço superior, em alguns casos com ramificação descontínua (Fig. 12J), com pínulas dispostas unilateralmente (Fig. 12M). Pínulas cilíndricas, sem septos, constrictas na base e com ápice obtuso, medindo de 402 a 510 µm de comp. na porção basal, 400 a 480 µm na intermediária e 20 a 44 µm na apical.

Material examinado: BRASIL. Pernambuco: Jaguaribe, 07°44'12''S 34°49'24''W, 04/17, M.F.O. Carvalho (UFP83454); Pilar, 07°47'23''S 34°50'11''W, 08/16, M.F.O. Carvalho (UFP83484); Pilar, 07°47'23''S 34°50'11''W, 04/17, M.F.O. Carvalho (UFP83481); Janga, 07°55'49''S 34°49'17''W, 10/16, M.F.O. Carvalho (UFP83609); Piedade, 08°10'39''S 34°55'01''W, 04/17, M.F.O. Carvalho (UFP83611); São José da Coroa Grande, 08°53'41''S 35°08'35''W, 09/16, M.F.O. Carvalho (UFP83632); Boa Viagem, 08°07'55''S 34°53'58''W, 10/85, S.M.B. Pereira (UFP6699); Ponta de Pedras, 07°38'02''S 34°48'45''W, 04/05, S.M.B. Pereira (UFP82236); Serrambi, 08°36'17''S 35°02'43''W, 09/86, M.C. Accioly (PEURF13039); Candeias, 08°12'22''S 34°55'01''W, 03/90, J.A.P. Angeiras (PEURF20442); Itapuama, 08°17'39''S

34°57'07''W, 08/91, J.A.P. Angeiras (PEURF20441); Cupe, 08°27'10''S 34°59'04''W, 04/90, J.A.P. Angeiras (PEURF20439); Cupe, 08°27'10''S 34°59'04''W, 08/91, J.A.P. Angeiras (PEURF20438); Campas, 08°44'45''S 35°05'11''W, 07/92, J.A.P. Angeiras (PEURF20437); Muro Alto, 08°25'46''S 34°58'41''W, 07/12, J.C. De Paula (PEURF3476); Casa Caiada, 07°59'03''S 34°50'10''W, 11/94, S.M.B. Pereira (PEURF21627); Piedade, 08°10'39''S 34°55'01''W, 12/94, S.M.B. Pereira (PEURF21626); Porto de Galinhas, 08°29'04''S 34°59'58''W, 10/05, S.M.B. Pereira (PEURF50771); São José da Coroa Grande, 08°53'41''S 35°08'35''W, 09/94, S.M.B. Pereira (PEURF21628); São José da Coroa Grande, 08°53'41''S 35°08'35''W, 05/05, S.M.B. Pereira (PEURF50770); Fernando de Noronha, 03°50'05''S 32°24'04''W, 03/93, S.M.B. Pereira (PEURF21632); Carne de Vaca, 07°34'20''S 34°49'55''W, 05/97, S.M.B. Pereira (PEURF24517); Ponta de Pedras, 07°38'02''S 34°48'45''W, 04/05, S.M.B. Pereira (PEURF50773); Piedade, 08°10'39''S 34°55'01''W, 04/81, E. Saldanha (PEURF11945).

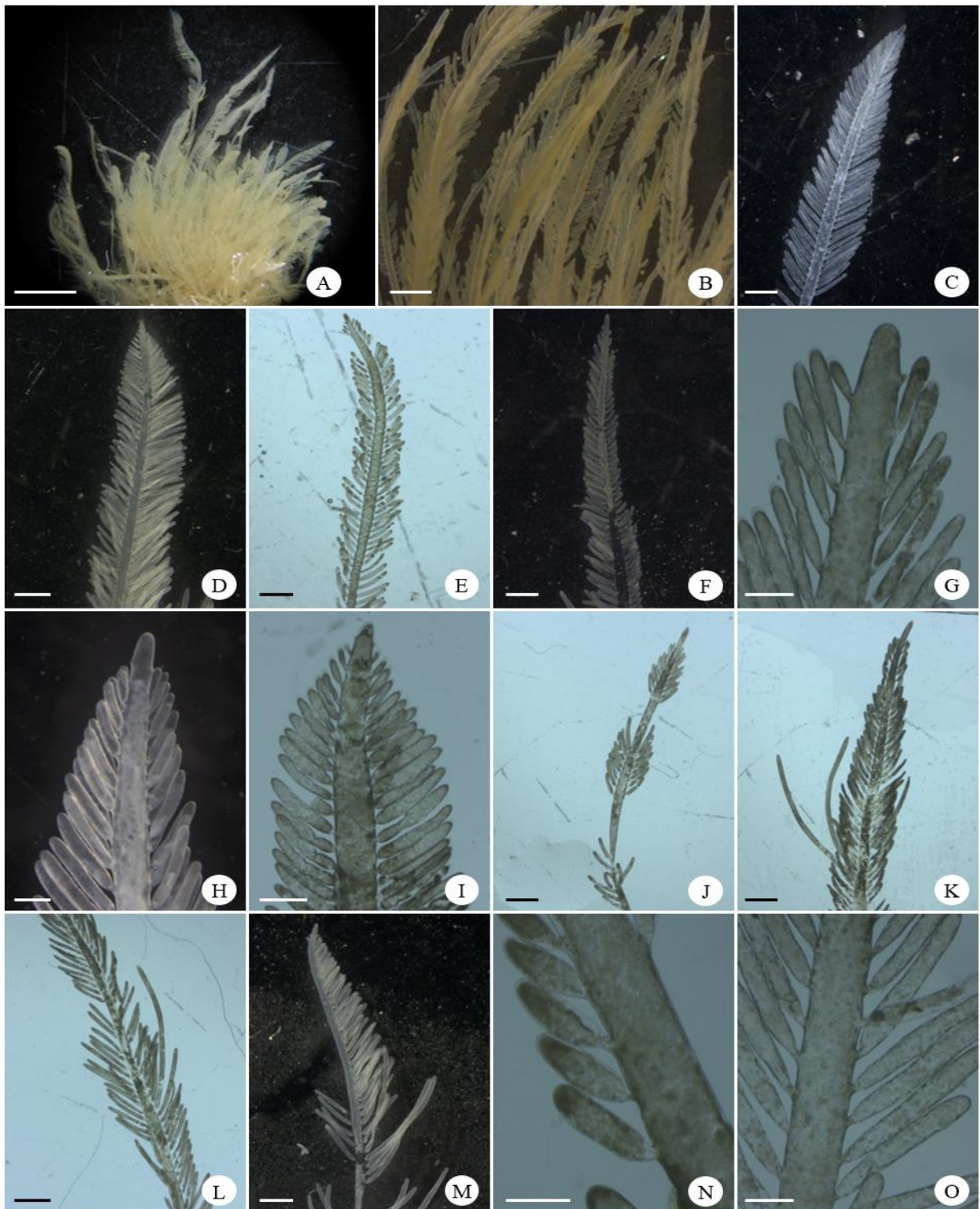
Observações: Espécie bastante comum no litoral do Estado de Pernambuco. Os exemplares foram coletados na região entre marés, sendo frequentemente encontradas em populações mistas ou próximas a “*Bryopsis plumosa*”, crescendo sobre substrato consolidado (recifes de arenito). Alguns exemplares foram coletados crescendo sobre *Halimeda opuntia* (L.) Lamouroux, *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann e Hamel, *Palisada perforata* (Bory) Nam e *Sargassum polyceratium* Montagne. As amostras coletadas estão de acordo com os trabalhos de Pereira e Accioly (1998) e Coto (2007).

Referências para Pernambuco: Accioly (1989), Szechy *et al.* (1989), Cutrim (1990), Pedrini *et al.* (1992), Angeiras (1995), Pereira *et al.* (1996), Muñoz *et al.* (1997), Pereira e Accioly (1998), Sousa e Cocentino (2004), Santos *et al.* (2006), Ribeiro *et al.* (2008), Burgos (2011), Soares e Fujii (2012), Barros (2013), Carvalho *et al.* (2013), Silva (2013), Guimaraens *et al.* (2015).

Comentários: Plantas de *B. pennata* apresentaram grande plasticidade fenotípica. Amostras previamente identificadas como *B. plumosa* com base em dados morfológicos foram agrupadas no mesmo clado que *B. pennata* pelos dois marcadores utilizados (*tufA* e *rbcL*) e com baixa divergência intraespecífica. Plantas com morfotipo “*B. plumosa*” (Fig. 13A-O) apresentaram tufos densos de até 12 cm de altura (Fig. 13A). Talo filamentosos, cenocítico, cilíndrico, flácido em textura, de coloração verde-escura, fixo ao substrato por rizoides. Pínulas mais densas na porção apical (Fig. 13C-D) ou escassas de

tamanho muito desigual. Fronde com aspecto piramidal (Fig. 13F-G). Filamentos eretos com uma ou mais ordens de ramos disticamente pinados a bipinados ou ainda com ramificação ligeiramente alterna, irregular ou descontínua. Pínulas cilíndricas, sem septos, constrictas na base (Fig. 13N-O) e com ápice obtuso, medindo de 462 a 1040 μm de comp. na porção basal do talo, 574 a 1240 μm na intermediária e 354 a 480 μm na apical.

Figura 12. *Bryopsis pennata* (A) Aspecto geral do talo. (B-F) Detalhe de frondes com distribuição regular das pínulas. (G-I) Detalhe da variação do ápice do talo. (J) Detalhe de uma fronde com pínulas descontínuas. (K-L) Detalhe de uma fronde com pínulas irregulares. (M) Detalhe de uma fronde com pínulas unilaterais. (N-O) Detalhe da distribuição das pínulas. Note base constricta. Escala: A-1 cm; B, C, D, E, F, J, K, L e M-1000 μm ; G, H, I, N e O-200 μm .



Material examinado (Morfotipo “*B. plumosa*”): BRASIL. Pernambuco: Maria Farinha, 07°51’16’’S 34°50’05’’W, 12/98, M. Barbosa (UFP28753); Serrambi, 08°36’17’’S 35°02’43’’W, 07/16, M.F.O. Carvalho (UFP83570); Pina, 08°05’29’’S 34°52’51’’W, 09/96, S.M.B. Pereira (UFP4702); Boa Viagem, 08°07’55’’S 34°53’58’’W, 10/80, S.M.B. Pereira (UFP4835); Piedade, 08°10’39’’S 34°55’01’’W, 04/86, S.M.B. Pereira (UFP6660); Maracaípe, 08°31’30’’S 35°00’24’’W, 09/87, M.C. Accioly (PEURF13047); Serrambi, 08°36’17’’S 35°02’43’’W, 09/87, M.C. Accioly (PEURF13047); Candeias, 08°12’22’’S 34°55’01’’W, 01/92, J.A.P. Angeiras (PEURF20445); Itapuama, 08°17’39’’S 34°57’07’’W, 08/91, J.A.P. Angeiras (PEURF20443); Campas, 08°44’45’’S 35°05’11’’W, 03/91, J.A.P. Angeiras (PEURF20446); Campas, 08°44’45’’S 35°05’11’’W, 07/92, J.A.P. Angeiras (PEURF20449); Jaguaribe, 07°44’12’’S 34°49’24’’W, 06/97, M.F.O. Carvalho (PEURF24608); Boa Viagem, 08°07’55’’S 34°53’58’’W, 08/04, M.E.B. Pedrosa (PEURF44980); Paiva, 08°15’39’’S 34°56’41’’W, 09/04, S.M.B. Pereira (PEURF50774); Porto, 08°48’54’’S 35°07’30’’W, 10/05, S.M.B. Pereira (PEURF50771); Carne de Vaca, 07°34’20’’S 34°49’55’’W, 05/97, S.M.B. Pereira (PEURF24518); Jaguaribe, 07°44’12’’S 34°49’24’’W, 09/97, S.M.B. Pereira (PEURF30993); Pau Amarelo, 07°54’32’’S 34°49’24’’W, 11/97, S.M.B. Pereira (PEURF24653); Maria Farinha, 07°51’16’’S 34°50’05’’W, 12/98, M. Barbosa (UFP28752).

Observações (Morfotipo “*B. plumosa*”): Bastante comum no litoral do Estado de Pernambuco. Os exemplares foram encontrados crescendo sobre substrato consolidado (recifes de arenito) e frequentemente sobre outras algas como *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) M.Howe, *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonder, *Halimeda opuntia* (L.) Lamouroux, *Sargassum polyceratum* Montagne e *Dictyota* sp. As amostras coletadas estão de acordo com os trabalhos de Pereira e Accioly (1998) e Coto (2007).

Referências para Pernambuco (como *B. plumosa*): Accioly (1989), Szechy *et al.* (1989), Cutrim (1990), Angeiras (1995), Pereira e Accioly (1998), Simões *et al.* (2009), Burgos (2011), Barros (2013), Carvalho *et al.* (2013), Silva (2013), Guimaraens *et al.* (2015), Soares e Fujii (2012).

Figura 13. *Bryopsis pennata* (morfortipo “*Bryopsis plumosa*”). (A) Aspecto geral do talo. (B) Detalhe da porção basal mostrando rizoides. (C-D) Detalhe da variação do ápice do talo. (E-M) Detalhe da variação da distribuição das pínulas nos talos. (N-O) Detalhe da distribuição das pínulas. Note base constricta. Escala: A-1 cm; B, C, D, N e O-200 μ m; E, F, G, H, I, J, K, L e M-1000 μ m.



Bryopsis pennata* var. *secunda (Harvey) Collins e Hervey (1917, 62 p).

(Fig. 14A-J)

Basiônimo: *Bryopsis plumosa* var. *secunda* Harvey

Sinônimo heterotípico: *Bryopsis harveyana* J.Agardh

Localidade tipo: Key West, Flórida-EUA

Descrição: Plantas eretas, formando tufos densos de até 2,0 cm de altura (Fig. 14A-B). Talo filamentosos, cenocítico, cilíndrico, flácido em textura, de coloração verde-escura, fixo ao substrato por rizoides. Fronde formada por duas fileiras encurvadas com aspecto unilateral (Fig. 14H). Filamentos eretos com uma ordem de ramos laterais (pínulas) de comprimento aproximadamente uniforme, gradativamente menores em direção ao ápice (Fig. 14C-F). Filamentos comumente desnudos no terço inferior do talo e ápice frequentemente curvado com pínulas oposta dística e/ou alterna no terço superior do talo (Fig. 14E-F). Pínulas cilíndricas, sem septos, constrictas na base (Fig. 14J) e com ápice obtuso, medindo de 415 a 480 μm de comp. na porção basal do talo, 560 a 610 μm na intermediária e 312 a 340 μm na apical.

Comentários: *Bryopsis pennata* var. *secunda* é facilmente confundida com talos jovens de *B. pennata* devido ao seu tamanho diminuto, no entanto, apresenta característica marcante como ápice da fronde curvado fazendo com que as pínulas apresentem aspecto unilateral, formando duas fileiras de pínulas sobrepostas. Não há registro desse táxon para a região norte e nordeste do Brasil, apenas para o estado do Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina (INCT, 2020). As espécimes concordam morfológicamente com os descritos por Silva *et al.* 1996; Russell, 2000; Coppejans *et al.* 2004).

Figura 14. *Bryopsis pennata* var. *secunda*. (A-B) Aspecto geral do talo. (C) Parte de um tufo mostrando distribuição das pínulas. Note eixo com aspecto unilateral. (D) Detalhe de um eixo com distribuição das pínulas oposta dística. (E-F) Detalhe da porção apical do talo com disposição das pínulas ligeiramente alterna dística. (G) Detalhe do padrão de ramificação mostrando duas fileiras de pínulas sobrepostas unilateralmente. (H-I) Detalhe do talo mostrando pínulas com distribuição majoritariamente unilateral. (J) Detalhe da distribuição das pínulas. Note base constricta. Escala: A e B-1 cm; C, D, H e I-1000 μ m. E, F, G e H-200 μ m.



Discussão

Estudos prévios do gênero *Bryopsis* para a costa pernambucana, assim como para toda a costa brasileira foram baseados exclusivamente em dados morfológicos. O presente trabalho constitui o primeiro estudo molecular de *Bryopsis* para o Brasil, no qual as

primeiras sequências de *tufA* e *rbcL* foram geradas a partir de material coletado no litoral de Pernambuco.

Três espécies foram anteriormente citadas para o estado de Pernambuco, *Bryopsis corymbosa*, *B. pennata* e *B. plumosa* (e.g., Pereira e Accioly, 1998; Carvalho *et al.* 2013; Barros 2013). Diferentes autores relataram a dificuldade em delimitar espécies de *Bryopsis* devido à alta plasticidade fenotípica e à sobreposição de caracteres morfológicos observada nos seus representantes, levando-os a citar seus espécimes sem identificação específica, como *Bryopsis* sp. (Ribeiro *et al.* 2008, Burgos, 2011, Barros 2013, Carvalho *et al.* 2013. A ocorrência de *B. corymbosa* para o litoral de Pernambuco (Praia de Gaibu, det. Y. Ugadim, SPF-Algae 9527) pode ser uma identificação errônea, uma vez que há apenas um único registro feito a partir de dados morfológicos. Além disso, esta espécie pode ser confundida com *B. plumosa* por compartilharem características morfológicas como o tamanho irregular das pínulas e os ramos com crescimento irregular. No entanto, diferem pela diminuição gradativa das pínulas apicais em *B. plumosa* e pela formação de tufos de pínulas na região distal dos ramos em *B. corymbosa*, embora, de acordo com Lee *et al.* (1991), características intermediárias sejam comuns, dificultando ainda mais a delimitação dessas espécies. No presente estudo, nenhum espécime analisado morfológicamente se enquadrou na descrição de *B. corymbosa* ou se agrupou com sequências dessa espécie disponíveis nos bancos de dados. As sequências de *B. corymbosa* incluídas nas análises moleculares são procedentes do Atlântico Norte (França e Espanha), regiões próximas à sua localidade tipo, Livorno, Itália, as quais se mantiveram distantes filogeneticamente dos espécimes brasileiros. Desta forma, a ocorrência de *B. corymbosa* não foi confirmada para o litoral de Pernambuco.

Os resultados moleculares e morfológicos permitiram registrar apenas a ocorrência de *B. pennata* e *B. pennata* var. *secunda*. As amostras de *B. pennata* analisadas neste estudo mostraram-se extremamente plásticas e as análises estritamente morfológicas levaram previamente a identificar algumas espécimes como *B. plumosa*. As análises mostraram que há sobreposição na maioria das características comparadas, porém os espécimes de *B. pennata* apresentaram talo com tamanho médio menor do que os identificados como “*B. plumosa*”; esta última ainda apresentou, de forma geral, pínulas distribuídas de forma descontínua e de maior comprimento e, muitas vezes, talos com eixos desnudos na sua região basal. As características diagnósticas que separam *Bryopsis pennata* de *B. plumosa* são a forma do talo e o tamanho das pínulas ao longo da fronde.

Em *Bryopsis pennata* o talo é lanceolado com pínulas de tamanho uniforme, com exceção do ápice, enquanto que em *B. plumosa* o talo é piramidal com pínulas de tamanho não uniforme, gradativamente menores em direção ao ápice (Krellwitz *et al.* 2001). Em um estudo realizado na Praia de Serrambi (Pernambuco, Nordeste-Brasil), Accioly (1989) observou que *B. pennata* ocorreu com maior frequência no infralitoral durante o período chuvoso e *B. plumosa* no mesolitoral durante o período seco. No entanto, os resultados aqui obtidos mostraram que espécimes de *B. pennata* e do morfotipo “*B. plumosa*” co-ocorreram em alguns locais de coleta (Cupe, Ilha de Santo Aleixo, Enseada dos Corais) na mesma faixa de distribuição (mesolitoral) e essencialmente na estação seca, não sendo possível estabelecer qualquer padrão de distribuição, mesmo nas faixas do mesolitoral, ou atribuir as variações morfológicas observadas a diferenças nas condições ambientais.

Embora plantas morfológicamente típicas de *B. pennata* e *B. plumosa* puderam ser reconhecidas no material estudado, os resultados moleculares, para os dois marcadores utilizados, claramente refutaram a ocorrência de *B. plumosa* para o litoral de Pernambuco, uma vez que *B. pennata* - “*B. plumosa*” se agruparam com baixíssima divergência genética, 0-0,21% para o *tufA* e nenhuma divergência para o *rbcL*. As análises moleculares mostraram que *B. plumosa* é polifilética com alta divergência genética (Anexos 4-6), corroborando o polifiletismo anteriormente salientado para essa espécie por Ciancia *et al.* (2012). Nenhuma das sequências brasileiras previamente identificadas como *B. plumosa* corresponderam às amostras de *B. plumosa* disponíveis nos bancos de dados, incluindo sequências da autêntica *B. plumosa* da região próxima à localidade tipo, cuja divergência foi elevada (12,2-13,6% para o *tufA* e 8% para o *rbcL*), não deixando dúvidas de que *B. plumosa* não ocorre na área estudada. Desta forma, devido ao posicionamento filogenético, à baixa divergência genética observada entre os espécimes de *B. pennata* e “*B. plumosa*” e a identificação de espécimes morfológicamente típicos de *B. pennata* no material analisado, optou-se em citar os espécimes do presente estudo sob a denominação de *B. pennata* para o litoral de Pernambuco. Futuras comparações com sequências de *B. pennata* da localidade tipo são necessárias para confirmar definitivamente esse táxon para o litoral pernambucano e do Brasil.

O reconhecimento de espécies crípticas e polimórficas para o gênero *Bryopsis* já foi relatado em estudos moleculares prévios (Krellwitz *et al.* 2001; Lü; Wang, 2011; Hollants *et al.* 2013; Tufiño-Velázquez; Pedroche, 2019). Semelhante ao observado neste estudo em que *B. pennata* mostrou-se polimórfica e incluiu o morfotipo “*B. plumosa*”,

Tufiño-Velázquez e Pedroche (2019), usando o gene do cloroplasto *psbB*, concluíram que *B. pennata* é a única espécie presente no Atlântico Mexicano, e que as citações sob a denominação de *B. hypnoides* e *B. plumosa* são nomes mal aplicados ou incertos, e ainda consideraram a possibilidade de *B. ramulosa* Montagne e *B. halliae* W.R.Taylor serem sinônimos de *B. pennata*.

Bryopsis pennata var. *secunda* é citada para o litoral brasileiro para as regiões sudeste (Espírito Santo) e Sul (Paraná, Santa Catarina) (INCT, 2020). Os espécimes analisados apresentaram características diagnósticas da var. *secunda*, diferindo da típica pela fronde com tamanho reduzido (1,5 a 2,0 cm de altura em *B. pennata* var. *secunda* e 2,5 a 12 cm em *B. pennata* var. *pennata*), ápice curvado e distribuição unilateral das pínulas (Anexo 7, Fig. 14C-I). Embora não haja sequências de *B. pennata* var. *secunda* da localidade tipo (Key West, Flórida, EUA) disponíveis nos bancos de dados para comparação, considerou-se que a posição filogenética e a divergência observada entre *B. pennata* var. *secunda* e a variedade típica (0,96-1,57% para o *tufA* e 0,27-0,4% para o *rbcL*) sustentam a manutenção do *status* taxonômico das amostras brasileiras como var. *secunda*, decisão também sustentada pelos dados morfológicos salientados acima. A ocorrência de *B. pennata* var. *secunda* é inédita para o Nordeste do Brasil.

Não há estudos que relatem a divergência intra e interespecífica para os marcadores *tufA* e *rbcL* para o gênero *Bryopsis*. Contudo, a faixa de divergência intraespecífica para o *tufA* observada neste estudo para as amostras brasileiras (0-1,57%) está relativamente dentro da amplitude de variação encontrada para outros gêneros de Bryopsidales, como para espécies de *Halimeda* J.V. Lamouroux (0-1,4%) (Ximenes *et al.* 2019). A divergência interespecífica observada para o *tufA* (3,3-16,2%) está relativamente dentro da faixa de variação relatada para *Halimeda* (0,9-12,4%) por Ximenes *et al.* (2017) e (2,0-6,2%) por Ximenes *et al.* (2019). A faixa de divergência interespecífica para o *tufA* observada entre as espécies de *Bryopsis* também está relativamente dentro dos limites relatados por Saunders e Kucera (2010) para outras Bryopsidales, como *Codium* Stackhouse (1,44-14,65%), e para Ulvales, como *Ulva* Linnaeus (0,91-9,1%).

A divergência intraespecífica de *Bryopsis* para o *rbcL* (0-0,4%) foi relativamente menor do que a observada para *Halimeda* (0,8-1,2%) por Ximenes *et al.* (2019), enquanto a amplitude de variação interespecífica para esse marcador (6,7-11,6%) está dentro da

faixa relatada para *Halimeda* (0,8-11,7%) por Ximenes (2017) e (4,5-5,0%) por Ximenes *et al.* (2019).

Para o marcador *psbB*, Tufiño-Velázquez e Pedroche (2019) propuseram uma faixa de distância genética entre 5% a 12% para a discriminação de espécies e consideraram, portanto, uma distância de até 4,9% como intraespecífica, valor mais elevado do que o obtido para o *tufA* e *rbcL*.

Os resultados moleculares a partir do estudo do material brasileiro mostraram que o *tufA* foi mais eficiente em delimitar espécies (e categorias infraespecíficas) do que o *rbcL*, confirmando seu uso como DNA barcode para algas verdes. Os resultados morfológicos demonstram que as amostras coletadas não correspondem à autêntica *B. plumosa*, embora plantas morfológicamente típicas dessa espécie tenham sido observadas e estejam descritas na literatura. Concluimos que a diversidade das espécies de *Bryopsis* está superestimada para o litoral de Pernambuco e registramos a primeira ocorrência de *B. pennata* var. *secunda* para o Nordeste do Brasil. Desta forma, sugerimos o desenvolvimento de pesquisas em uma maior área de amostragem no litoral brasileiro visando desvendar a verdadeira diversidade do gênero e esclarecer as entidades taxonômicas referenciadas para o Brasil.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) através do edital 05/2014, pelo suporte financeiro para pesquisa.

Referências

- Accioly MC. 1989. Clorofíceas marinhas bentônicas da praia de Serrambi (Município de Ipojuca-Estado de Pernambuco). Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Angeiras JAP. 1995. Clorofíceas bentônicas do litoral sul do Estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Barros NCG. 2013. Algas marinhas bentônicas como bioindicadoras da qualidade ambiental em área recifal de Tamandaré, Pernambuco, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Burgos DC, Pereira SMB, Bandeira-Pedrosa ME. 2009. Levantamento florístico das Rodofíceas do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) - Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23, 1110-1118.
- Carvalho VF, Oliveira-Carvalho MF, Pedrosa ME, Pereira SMB. 2013. Benthic chlorophytes from a coastal island in the Oriental Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 36: 203-210.
- Ciancia M, Alberghina J, Arata PX *et al.* 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.
- Collins FS, Hervey AB. 1917. The algae of Bermuda. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 53: 1-195.

- Coppejans E *et al.* 2004. The marine green and brown algae of Rodrigues (Mauritius, Indian Ocean). *Journal of Natural History* 38: 2959-3019.
- Cormaci M, Furnari G, Alongi G. 2014. Flora marina bentonica del Mediterraneo: Chlorophyta. *Bollettino delle sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali* 47: 11-436.
- Coto ACSP. 2007. Biodiversidade de clórofitas marinhas bentônicas do litoral do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Cremen MCM, Leliaert F, West J. 2019. Reassessment of the classification of Bryopsidales (Chlorophyta) based on chloroplast phylogenomic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 130: 397-405.
- Curtis N, Dawes C, Pierce S. 2008. Phylogenetic analysis of the large subunit rubisco gene supports the exclusion of *Arainvillea* and *Cladocephalus* from the Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 44: 761-767.
- Cutrim MVJ. 1990. Distribuição das macroalgas na região entremarés do recife da Praia de Piedade, Município de Jaboatão dos Guararapes (Estado de Pernambuco-Brasil). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.
- Doyle JL, Doyle JJ. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Famá P, Kooistra WCHF, Zucarello G. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of Phycology* 38: 1040-1050.

- Freshwater DW, Rueness J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-194.
- Guimaraes MA, Oliveira-Carvalho MF, Aquino RE. 2015. Spatiotemporal variations of *Tricolia affinis* (CB Adams, 1850) associated with the macroalgal community on reef stretches at Piedade beach, southern coast of Pernambuco State, Brazil. *African Journal of Plant Science* 9: 196-204.
- Guiry MD, Guiry GME. 2020. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. 25 January 2020.
- Hall JA, Fuóřková K, Chien L, Lewis LA, Karol KG. 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie Algologie* 31: 529-555.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Holdt SL, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23: 543-597.
- Hollants J, Leliaert F, Verbruggen H, Willems A, Clerck O, 2013. Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122659.
- Horta PA, Amancio E, Coimbra CS, Oliveira EC. 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.

- Ibrahim M, Salman M, Kamal S, Rehman S, Razzaq A, Akash SH. 2017. Based Biologically Active Compounds. In: Algae Based Polymers, Blends, and Composites. Zia KM, Zuber M, Ali M, Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 271 pp.
- INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. <http://inct.splink.org.br>. 13 Janeiro 2020.
- Kapraun DF, Shipley MJ. 1990. Karyology and nuclear DNA quantification in *Bryopsis* (Chlorophyta) from North Carolina, USA. *Phycologia* 29: 443-453.
- Kazi MA, Reddy CRK, Jha B. 2013. Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the *tufA*, *rbcL*, 18S rDNA and ITS rDNA genes. *PloS One* 8: e82438.
- Krellwitz EC, Kowallik KV, Manos PS. 2001. Molecular and morphological analyses of *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta) from the western North Atlantic and Caribbean. *Phycologia* 40: 330-339.
- Lam DW, Zechman FW. 2006. Phylogenetic analyses of the Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on Rubisco large subunit gene sequences. *Journal of Phycology* 42: 669-678.
- Lamouroux JVF. 1809. Observations sur la physiologie des algues marines, et description de cinq nouveau genres de cette famille. *Nouv. Bull. Sc. Soc. Phil. Paris* 1, p. 330-333.
- Lee WJ, Boo SM, Lee K. 1991. Notes on the genus *Bryopsis* (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from Ullungdo Island, Korea. *Algae, Jangan-Gu* 6(1): 23-29.
- Lefranc F, Koutsaviti A, Ioannou E *et al.* 2019. Algae metabolites: from in vitro growth inhibitory effects to promising anticancer activity. *Natural Product Reports* 36: 810-841.

- Leliaert F, Lopez-Bautista JM. 2015. The chloroplast genomes of *Bryopsis plumosa* and *Tydemania expeditiones* (Bryopsidales, Chlorophyta): compact genomes and genes of bacterial origin. *BMC Genomics* 16: 204.
- Leliaert F, Verbruggen H, Vanormelingen P *et al.* 2014. DNA - based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology* 49: 179-196.
- Lü F and Wang G. 2011. Sequence and phylogenetic analyses of the chloroplast 16S rRNA, *tufA*, and *rbcL* genes from *Bryopsis hypnoides*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 29: 922.
- McCourt RM, Karol KG, Bell J *et al.* 2000. Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on *rbcL* sequences. *Journal of Phycology* 36: 747-7581.
- Miller KA, Aguilar-Rosas LE, Pedroche FF. 2011. A review of non-native seaweeds from California, USA and Baja California, Mexico. *Hidrobiológica* 21(3): 365-379.
- Muñoz AOM, Pereira SMB. 1997. Caracterização quali-quantitativa das comunidades de macroalgas nas formações recifais da Praia do Cupe-Pernambuco (Brasil). *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco* 25: 93-109.
- Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh B. 2015. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 268-274.
- Nizamuddin M. 1995. Species of the genus *Bryopsis* Lamouroux (Bryopsidales, Chlorophyceae, Chlorophyta) from the coast of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 27: 3-39.
- Pedrini A, Ugadim Y, Pereira SMB, Braga MR. 1992. Algas marinhas bentônicas do Arquipélago de Fernando Noronha, Brasil. *Boletim de Botânica (USP)* 13: 93-101.

- Pereira SMB, Accioly MC. 1998. Clorofíceas Marinhas Bentônicas da Praia de Serrambi, Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 12: 25-52.
- Pereira SMB, Mansilla AOM, Cocentino ALM. 1996. Ecological aspects of a benthic marine algal community in Southeast Bay, Archipelago of Fernando de Noronha-Brazil. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco* 24: 157-163.
- Provan J, Murphy S, Maggs CA. 2004. Universal plastid primers for Chlorophyta and Rhodophyta. *European Journal of Phycology* 39: 43-50.
- Ribeiro FA, Travassos A, Gestinari LM *et al.* 2008. Análise quali-quantitativa das populações algáceas de um trecho recifal na Praia de Boa Viagem, PE. *Oecologia brasiliensis* 12: 4.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P *et al.* 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- Russell DJ. 2000. Identification manual for dietary vegetation of the Hawaiian green turtle *Chelonia mydas*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, Florida, USA.
- Santos AA, Cocentino ALM, Vasconcelos-Reis TN. 2006. Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da Praia de Boa Viagem-Pernambuco, Brasil. *Boletim Técnico-Científico do CEPENE* 14: 25-33.
- Saunders GW, Kucera H. 2010. An evaluation of *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie Algologie* 31: 487-528.

- Saunders GW. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences* 360: 1879-1888.
- Shimada S, Hiraoka M, Nabata S, Iima M, Masuda M. 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycological Research* 51: 99-108.
- Silva EG. 2013. Estrutura e composição das comunidades de Amphipodas associadas às macroalgas dos recifes de arenito da Baía de Suape, PE-Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Silva PC, Basson PW, Moe RL. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *University of California Publications in Botany* 79: 887- 894.
- Simões IP, Guimaraens MA, Carvalho MFO, Valdevino J, Pereira SMB. 2009. Avaliação florística e sucessão ecológica das macroalgas em recifes na Praia de Piedade (PE). *Neotropical Biology and Conservation* 4: 49-56.
- Soares LP, Fujii MT. 2012. Novas ocorrências de macroalgas marinhas bentônicas no estado de Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 63: 557-570.
- Song W, Wang Z, Li Y, Han H, Zhang X. 2019. Tracking the original source of the green tides in the Bohai Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 219: 354-362.
- Sousa GS, Concentino ALM. 2004. Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da Praia de Piedade-PE. *Tropical Oceanography* 32: 1-22.
- Swofford DL. 2002. PAUP* 4.0 b10. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version, 4, b10.
- Szechy MTM, Nassar CAG, Falcão C, Maurat MCS. 1989. Contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas de Fernando de Noronha. *Rodriguésia* 41: 53-61.

- Tufiño-Velázquez RC, Pedroche FF. 2019. Las especies del género *Bryopsis* (Chlorophyta) presentes en las costas del Atlántico mexicano. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90: e902679.
- Verbruggen H, Ashworth M, LoDuca ST *et al.* 2009. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 642-653.
- Williams SL, Smith JE. 2007. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38: 327-359.
- Woolcott GW, Knöller K, King RJ. 2000. Phylogeny of the Bryopsidaceae (Bryopsidales, Chlorophyta): cladistic analyses of morphological and molecular data. *Phycologia* 39: 471-481.
- Wynne MJ. 2005. Two new species of *Bryopsis* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from the Sultanate of Oman, with a census of currently recognized species in the genus. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 24: 229-256.
- Ximenes CF, Cassano V, Oliveira-Carvalho MDF *et al.* 2017. Systematics of the genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil including the description of *Halimeda jolyana* sp. nov. *Phycologia* 56(4): 369-381.
- Ximenes CF, Oliveira-Carvalho MDF, Bandeira-Pedrosa ME, Cassano V. 2019. Updates on Section *Pseudo-opuntia* of *Halimeda*: phylogenetic analyses of *H. soniae* sp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta) along the Brazilian coast. *Botanica Marina* 62: 327-336.
- Yu KX, Wong CL, Ahmad R, Jantan I. 2015. Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Molecules* 20: 14082-14102.

Zhang Z, Wang F, Wang X, Liu X., Hou Y, Zhang Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers* 82: 118-121.

Anexos

Anexo 1. Locais de coleta das amostras de *Bryopsis* J.V.Lamouroux no estado de Pernambuco (nordeste-Brasil).

Região/Localidade	Coordenadas geográfica
Ilha de Santo Aleixo, Serinhaém	08° 36' 40,15" S/35° 01' 22,92" W
Praia da Enseada dos Corais, Cabo de Santo Agostinho	08° 18' 56" S/34° 57' 12" W
Praia de Boa Viagem, Recife	08° 06' 59,37"S/34° 53' 28,27"W
Praia de Catuama, Goiana	07° 35' 44,2" S/34° 53' 30" W
Praia de Itapuama, Cabo de Santo Agostinho	08° 17' 38" S/34° 57' 05" W
Praia de Ponta de Pedras, Goiana	07° 36' 41" S/34° 48' 30" W
Praia de São José da Coroa Grande, São José da Coroa Grande	08° 53' 42,72" S/35° 8' 34,82" W
Praia de Serrambi, Ipojuca	08° 33' 37,35" S/35° 0' 58,91" W
Praia do Cupe, Porto de Galinhas	08° 27' 28,46" S/34° 58' 58,41" W
Praia do Forte Orange, Ilha de Itamaracá	07° 48' 38,6" S/34° 50' 22" W
Praia do Janga, Paulista	07° 56' 57,74 "S/34° 49' 27,97" W
Praia do Pilar, Ilha de Itamaracá	07° 45' 20,04" S/34° 49' 17,25" W
Praia dos Caneiros, Tamandaré	08° 42' 9,56" S/35° 4' 49,74"W

Anexo 2. Lista dos espécimes de *Bryopsis* J.V.Lamouroux obtidos e sequenciados neste estudo.

Código de campo	Voucher nº (PEURF)	Espécie	Praia	Data da coleta	Marcadores	
					<i>tufA</i>	<i>rbcL</i>
66	55.195	<i>Bryopsis pennata</i>	Ilha de Santo Aleixo	18.10.2016	X	X
71	55.183	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Ilha de Santo Aleixo	18.10.2016	X	X
73	55.187	<i>Bryopsis pennata</i>	Ilha de Santo Aleixo	18.10.2016	X	X
76	55.189	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Janga	16.10.2016		
83	55.182	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Pilar	26.04.2017	X	X
87	55.192	<i>Bryopsis pennata</i> var. <i>secunda</i>	Serrambi	27.04.2017	X	X
88	55.186	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Serrambi	27.04.2017	X	X
95	55.185	<i>Bryopsis pennata</i> var. <i>secunda</i>	Pilar	26.04.2017	X	X
98	55.181	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Cupe	14.10.2016		X
100	55.178	<i>Bryopsis pennata</i>	Cupe	14.10.2016	X	X
102	55.198	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Cupe	14.10.2016	X	
103	55.190	<i>Bryopsis pennata</i>	Cupe	14.10.2016	X	X
105	55.188	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Boa Viagem	12.04.2017	X	
115	55.194	<i>Bryopsis pennata</i>	Ponta de Pedra	27.05.2017	X	
120	55.179	<i>Bryopsis pennata</i>	Itapuama	26.05.2017	X	
126	55.180	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	São José da Coroa Grande	25.05.2017	X	
129	55.196	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Caneiros	24.05.2017	X	
135	55.197	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Catuama	26.06.2017	X	
144	55.184	<i>Bryopsis pennata</i>	Praia do Forte Orange	25.06.2017	X	
145	55.191	<i>Bryopsis pennata</i>	Enseada dos Corais	24.06.2017	X	X
148	55.193	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	Enseada dos Corais	24.06.2017	X	X

Anexo 3. Valores de divergência genética (%) entre os representantes do gênero *Bryopsis* coletados no litoral de Pernambuco e amostras relacionadas obtidas do GenBank. para o marcador *tufA*. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito e sublinhados. Amostras de *B. pennata* estão em branco e de *B. pennata* var. *secunda* em cinza.

Táxon	100	115	148	83	145	144	120	105	103	88	73	66	71	126	135	129	102	LT969801	KY205932	KY205933	95	LK022446	87	
100	ID																							
115	0	ID																						
148	0	0	ID																					
83	0	0	0	ID																				
145	0	0	0	0	ID																			
144	0	0	0	0	0	ID																		
120	0	0	0	0	0	0	ID																	
105	0	0	0	0	0	0	0	ID																
103	0	0	0	0	0	0	0	0	ID															
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID														
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID													
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID												
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID											
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID										
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID									
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID								
102	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,2	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,2	0,18	<u>0,21</u>	ID							
LT969801																								
<i>B. sp.1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>0,15</u>	ID						
KY205932																								
<i>B. sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>0,15</u>	0	ID					
KY205933																								
<i>B. sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>0,15</u>	0	0	ID				
95	1,29	1,37	1,3	1,28	1,3	1,51	1,3	1,29	1,3	1,29	1,3	1,3	1,36	1,52	1,43	1,44	<u>0,96</u>	1,27	1,28	1,28	ID			
LK022446																								
<i>B. sp.28</i>	1,29	1,41	1,33	1,29	1,34	1,56	1,34	1,33	1,34	1,31	1,32	1,32	1,41	<u>1,57</u>	1,48	1,49	0,91	1,15	1,2	1,2	0	ID		
87	1,25	1,36	1,28	1,24	1,29	1,56	1,29	1,28	1,29	1,26	1,26	1,26	1,36	1,51	1,42	1,43	0,93	1,23	1,24	1,24	0	0	ID	

Anexo 4. Valores de divergência genética (%) entre os representantes de *Bryopsis pennata* coletados no litoral de Pernambuco e amostras de *B. plumosa* obtidas do GenBank para o marcador *tufA*. Amostras de *B. pennata* estão em branco e de *B. plumosa* em cinza.

Táxon	100	115	148	83	145	144	120	105	103	88	73	66	71	126	135	129	102	LT969801	KY205932	KY205933	JQ755423	LN810504	FJ432653	U09424		
100	ID																									
115	0	ID																								
148	0	0	ID																							
83	0	0	0	ID																						
145	0	0	0	0	ID																					
144	0	0	0	0	0	ID																				
120	0	0	0	0	0	0	ID																			
105	0	0	0	0	0	0	0	ID																		
103	0	0	0	0	0	0	0	0	ID																	
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID																
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID															
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID														
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID													
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID												
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID											
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID										
102	0.16	0.17	0.16	0.16	0.16	0.20	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.17	0.20	0.18	0.21	ID									
LT969801	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.15	ID								
KY205932	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.15	0	ID							
KY205933	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.15	0	0	ID						
JQ755423 (Arg)	14,8	15,5	14,9	14,7	15,2	16	15,1	15	15,1	14,9	14,8	14,8	15,5	16	15,5	16,2	14,1	14,2	14,3	14,3	ID					
LN810504 (Fr)	12,4	12,7	12,4	12,4	12,6	13,2	12,5	12,5	12,5	12,5	12,4	12,4	12,6	13,2	13	<u>13,6</u>	<u>12,2</u>	12,3	12,4	12,4	7,1	ID				
FJ432653 (Fr)	12,4	12,8	12,5	12,4	12,7	13,4	12,7	12,6	12,7	12,5	12,4	12,4	12,8	13,4	13,2	13,8	12	12,2	12,2	12,2	<u>7</u>	3,3	ID			
U09424	12,8	13,3	13	12,8	13,2	13,8	13,1	13,1	13,1	13	12,9	12,9	13,3	13,8	13,6	14,1	12,5	12,6	12,7	12,7	<u>7,2</u>	3,5	0,99	ID		

Anexo 5. Valores de divergência genética (%) entre os representantes do gênero *Bryopsis pennata* var. *secunda* coletados no litoral de Pernambuco e amostras relacionadas obtidas do GenBank para o marcador *tufA*. Valores máximo e mínimo estão destacados em negrito e sublinhados. Amostras de *B. pennata* var. *secunda* estão em branco, as de *B. plumosa* em cinza claro e as demais sequências relacionadas em cinza escuro.

Táxon	95	LK022446	87	JQ755423	LN810504	FJ432653	U09424	HQ610244	MK125425	LK022439	LK022441
95	ID										
LK022446	0	ID									
87	0	0	ID								
JQ755423 (Argentina)	15	14	14,8	ID							
LN810504 (França)	<u>12,6</u>	<u>12,3</u>	12,6	7,1	ID						
FJ432653 (França)	12,8	12,5	12,5	7	3,3	ID					
U09424	13,3	12,6	13	7,2	3,5	0,99	ID				
HQ610244 <i>Bryopsis</i> sp. (EUA)	12,7	12,6	12,6	7,4	0	3,3	3,7	ID			
MK125425 <i>Bryopsis</i> sp. (Austrália)	13,9	13,1	13,8	8	4,2	4,3	4,8	4,5	ID		
LK022439 <i>Bryopsis</i> sp.2 (Holanda)	14	13,6	13,9	8,6	4,8	4,4	5,2	5	1,5	ID	
LK022441 <i>B.</i> <i>corymbosa</i> (Fr)	13,4	13	13,3	7,7	1,4	4	4,1	1,6	5	5,2	ID

Anexo 6. Valores de divergência genética (%) entre os representantes do gênero *Bryopsis* coletados no litoral de Pernambuco e amostras relacionadas obtidas do GenBank para o marcador *rbcL*. Amostras de *B. pennata* estão em branco, de *B. pennata* var. *secunda* em cinza e *Bryopsis plumosa* do GenBank em cinza escuro.

Táxons	71	66	73	100	83	88	98	103	145	148	95	87	HF583394	HF583393	AY004771	AF212145	JQ755422	LN810504	NC026795	FJ432637	AB038480	JF894104	
71	ID																						
66	0	ID																					
73	0	0	ID																				
100	0	0	0	ID																			
83	0	0	0	0	ID																		
88	0	0	0	0	0	ID																	
98	0	0	0	0	0	0	ID																
103	0	0	0	0	0	0	0	ID															
145	0	0	0	0	0	0	0	0	ID														
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ID													
95	0,46	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	ID												
87	0,47	0,44	0,4	0,44	0,44	0,44	0,45	0,45	0,45	0,45	0	ID											
HF583394 (Tan)	0,42	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	0	ID										
HF583393 (Que)	0,28	0,27	0,3	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,15	0,15	0,24	ID									
AY004771 (Aus)	7,6	7,4	7,5	7,5	7,5	7,4	7,4	7,6	7,6	7,6	8	7,9	7,4	7,3	ID								
AF212145 (Fr)	10,1	11,1	11	11,1	11,1	11	11,2	11,3	11,3	11,3	11	11,6	9,4	9,2	2,3	ID							
JQ755422 (Arg)	8,1	7,8	7,8	7,8	7,8	7,6	7,8	8	8	8	8,3	8,3	7,2	7,1	0	0	ID						
LN810504 (Fr)	8,4	8,2	8,1	8,1	8,1	8	8	8,3	8,3	8,3	8,6	8,6	7,6	7,4	2,3	4,4	2,6	ID					
NC026795 (Fr)	8,4	8,2	8,1	8,1	8,1	8	8	8,3	8,3	8,3	8,6	8,6	7,6	7,4	2,3	4,4	2,6	0	ID				
FJ432637 (Fr)	6,9	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7	6,8	6,8	6,8	6,8	7,2	7,1	7,3	7,3	2,1	7,2	2,3	2,1	2,1	ID			
AB038480	7,4	7,1	7	7	7	6,9	7,1	7,2	7,2	7,2	7,5	7,4	7,1	6,9	5,9	7,9	6,2	5,5	5,5	5	ID		
JF894104 (Jap)	7,5	7,3	7,3	7,3	7,3	7,2	7,3	7,5	7,5	7,5	7,7	7,7	6,9	6,7	5,6	6,7	6,1	5,3	5,3	5,1	0,32	ID	

Anexo 7. Informação morfológicas das amostras de *Bryopsis* J.V.Lamouroux coletadas no estado de Pernambuco (Nordeste-Brasil) depositadas no Herbário Prof. Vasconcelos Sobrinho (PEUFR). P = Pouco densa; M= Muito densa; PC= Presente contínuo; PD= Presente descontinuo; A= Ausente.

Código de campo	Táxon	Talo			Pínulas				
		Altura (cm)	Densidade	Nº de ordens de ramos	Presença		Comprimento (µm)		
					Terço superior do talo	Terço Inferior do talo	Basal	Intermediária	Apical
66	<i>Bryopsis pennata</i>	7	P	>1	PC	PD	505	478	32
71	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	12	M	> 1	PD	A	1040	1198	480
73	<i>Bryopsis pennata</i>	8	P	1	PC	PD	510	462	44
76	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	4	M	>1	PC	PD	860	980	360
83	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	9	M	>1	PD	A	872	1010	457
87	<i>Bryopsis pennata</i> var. <i>secunda</i>	2	M	1	PC	A	415	610	312
88	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	9	M	>1	PD	PD	954	1240	422
95	<i>Bryopsis pennata</i> var. <i>secunda</i>	1,5	M	1	PC	A	480	560	430
98	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	8	M	>1	PC	PD	790	1017	452
100	<i>Bryopsis pennata</i>	2	P	1	PC	PC	402	400	20
102	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	3	P	1	PC	A	462	574	417
103	<i>Bryopsis pennata</i>	7	P	>1	PC	PD	502	478	37
105	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	8	P	>1	PD	PD	815	1124	473
115	<i>Bryopsis pennata</i>	6	P	>1	PD	PD	506	480	41
120	<i>Bryopsis pennata</i>	4,5	P	1	PC	PD	430	431	25
126	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	7	P	>1	PC	A	773	998	440
129	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	9,5	M	>1	PD	PD	1002	1195	454
135	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	8	P	>1	PD	PD	905	1134	383
144	<i>Bryopsis pennata</i>	4,5	M	1	PC	PD	427	437	25
145	<i>Bryopsis pennata</i>	2,5	P	1	PC	PC	412	423	23
148	" <i>Bryopsis plumosa</i> "	5	P	>1	PC	PD	768	963	354

Anexo 8. Quantificação do DNA total das amostras de *Bryopsis* J.V.Lamouroux coletadas no estado de Pernambuco (Nordeste-Brasil).

Nº da amostra	Concentração		Pureza		Pureza	
			260/280		260/230	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
66	839,4	754,1	1,82	1,97	1,68	2,06
71	224	215,6	1,93	1,98	1,7	1,73
73	626	575,3	2,15	1,95	2,2	1,93
76	413,3	408,8	2	2	1,81	1,81
83	703,8	612,5	1,79	1,88	1,39	1,41
87	1699,9	1558	1,85	1,82	1,55	1,51
88	768,6	760,6	1,95	1,96	1,71	1,69
89	119,9	119,7	1,89	1,88	1,72	1,71
95	92,98	902,9	2,03	2,03	1,79	1,79
96	584,4	565,6	1,06	1,06	0,87	0,87
98	124	122,6	1,55	1,57	0,76	0,75
100	1266,8	1243,1	2,07	4	1,97	1,82
102	346,2	218	1,71	1,89	1,08	1,38
103	304,1	306	2,05	2,04	1,36	1,33
105	590	607,7	2,04	2,02	1,78	1,77
115	1068,4	742,5	2,04	2,15	1,82	1,81
120	148,1	144,9	1,97	1,94	1,04	0,99
124	190,6	205,1	1,34	1,31	0,89	0,91
125	328,3	350,9	1,04	1,04	0,96	0,96
126	513,7	533,9	1,99	1,99	1,55	1,58
127	107,6	112	1,71	1,67	1,03	1,04
129	434,4	493,3	1,99	1,98	1,58	1,59
135	456	456,4	1,98	1,98	1,56	1,56
144	1398,9	1392,3	1,94	1,95	1,61	1,61
145	103,6	103	1,11	1,11	0,76	0,76
147	1402,9	1394,1	2,01	2,01	1,97	1,97
148	2165,4	1531,3	1,22	1,34	1,18	1,28

Anexo 9. Informações das sequências obtidas do banco de dados GenBank do marcador *tufA*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Nº de acesso GenBank	Espécie	Localidade	Referência
AB008009	<i>Bryopsis maxima</i>	-	Ishida et al., 1997
FJ432653	<i>Bryopsis plumosa</i>	França	Verbruggen et al., 2009
GQ892829	<i>Bryopsis hypnoides</i>	-	Lü et al., 2011
GU136484	<i>Bryopsis hypnoides</i>	-	Lü et al., 2011
HQ610242	<i>Bryopsis corticulans</i>	Canadá	Saunders; Kucera, 2010
HQ610243	<i>Bryopsis corticulans</i>	Canadá	Saunders; Kucera, 2010
HQ610244	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Saunders; Kucera, 2010
JQ755423	<i>Bryopsis plumosa</i>	Argentina	Verbruggen; Estevez, 2012
KM255004	<i>Bryopsis corticulans</i>	Estados Unidos	Saunders, 2014
KM255048	<i>Bryopsis corticulans</i>	Estados Unidos	Saunders, 2014
KU361839	<i>Bryopsis</i> sp.	Japão	Sauvage et al., 2016
KU361860	<i>Derbesia</i> sp.	Estados Unidos	Sauvage et al., 2016
KX855797	<i>Codium tomentosum</i>	-	Verbruggen et al., 2017
KY205932	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Wade; Sherwood, 2016
KY205933	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Wade; Sherwood, 2016
LK022439	<i>Bryopsis</i> sp.	Holanda	Leliaert et al., 2014
LK022440	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Leliaert et al., 2014
LK022441	<i>Bryopsis corymbosa</i>	França	Leliaert et al., 2014
LK022442	<i>Bryopsis foliosa</i>	Austrália	Leliaert et al., 2014
LK022443	<i>Bryopsis muscosa</i>	Espanha	Leliaert et al., 2014
LK022444	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Leliaert et al., 2014
LK022445	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Leliaert et al., 2014
LK022446	<i>Bryopsis</i> sp.	Filipinas	Leliaert et al., 2014
LK022447	<i>Bryopsis</i> sp.	França	Leliaert et al., 2014
LK022452	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Leliaert et al., 2014
LN810504	<i>Bryopsis plumosa</i>	França	Leliaert; Lopez-Bautista, 2015
LT969801	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Vranken, 2018
LT969802	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Vranken, 2018
LT969820	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Vranken, 2018
LT969827	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Vranken, 2018
LT969828	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Vranken, 2018
MH591099	<i>Pseudoderbesia arbuscula</i>	Grécia	Chiela et al., 2018
MK125425	<i>Bryopsis</i> sp.	Austrália	Verbruggen; Costa, 2018
NC037363	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Cremen et al., 2018
U09424B	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	Delwiche et al. 1995
AB038480	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	Hanyuda et al., 2000
AF212145	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	Woolcott et al., 2000
AY004771	<i>Bryopsis plumosa</i>	Austrália	Woolcott et al., 2000

Anexo 10. Informações das sequências obtidas do banco de dados GenBank do marcador *rbcL*, utilizadas nas análises filogenéticas.

Nº de acesso GenBank	Espécie	Localidade	Referência
AY942163	<i>Bryopsis corticulans</i>	-	Lam; Zechman, 2007
AY942165	<i>Bryopsis pennatula</i>	-	Lam; Zechman, 2006
AY942169	<i>Bryopsis hypnoides</i>	-	Lam; Zechman, 2008
FJ715718	<i>Bryopsis sp.</i>	-	Cocquyt et al., 2009
HF549162	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF549164	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF549165	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Holanda	Hollants et al., 2011
HF549166	<i>Bryopsis africana</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF549167	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Holanda	Hollants et al., 2011
HF549168	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	França	Hollants et al., 2011
HF549169	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	França	Hollants et al., 2011
HF549170	<i>Bryopsis corymbosa</i>	Espanha	Hollants et al., 2011
HF549171	<i>Bryopsis corymbosa</i>	França	Hollants et al., 2011
HF549172	<i>Bryopsis vestita</i>	Nova Zelândia	Hollants et al., 2011
HF549173	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Filipinas	Hollants et al., 2011
HF549174	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF549175	<i>Bryopsis cf. hypnoides</i>	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF549176	<i>Bryopsis cf. plumosa</i>	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583293	<i>Bryopsis corticulans</i>	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF583295	<i>Bryopsis corymbosa</i>	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583297	<i>Bryopsis foliosa</i>	Austrália	Hollants et al., 2011
HF583298	<i>Bryopsis foliosa</i>	Austrália	Hollants et al., 2011
HF583299	<i>Bryopsis muscosa</i>	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583300	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583301	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583303	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583304	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583305	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583307	<i>Bryopsis myosuroides</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583310	<i>Bryopsis sp.</i>	França	Hollants et al., 2011
HF583311	<i>Bryopsis sp.</i>	França	Hollants et al., 2011
HF583312	<i>Bryopsis sp.</i>	França	Hollants et al., 2011
HF583316	<i>Bryopsis sp.</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583318	<i>Bryopsis sp.</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583319	<i>Bryopsis sp.</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583320	<i>Bryopsis sp.</i>	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583321	<i>Bryopsis sp.</i>	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583324	<i>Bryopsis sp.</i>	Indonésia	Hollants et al., 2011

Continuação)

Nº de acesso GenBank	Espécie	Localidade	Referência
HF583420	<i>Bryopsis</i> sp.	França	Hollants et al., 2011
HF583422	<i>Bryopsis vestita</i>	Nova Zelândia	Hollants et al., 2011
HF583326	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583327	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583328	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583329	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583330	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583331	<i>Bryopsis</i> sp.	Nicarágua	Hollants et al., 2011
HF583333	<i>Bryopsis</i> sp.	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583334	<i>Bryopsis</i> sp.	África do Sul	Hollants et al., 2011
HF583335	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF583336	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF583337	<i>Bryopsis</i> sp.	Holanda	Hollants et al., 2011
HF583338	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583339	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583340	<i>Bryopsis</i> sp.	Ilha Maurícia	Hollants et al., 2011
HF583341	<i>Bryopsis</i> sp.	Sri Lanka	Hollants et al., 2011
HF583342	<i>Bryopsis</i> sp.	Malásia	Hollants et al., 2011
HF583343	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583344	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583345	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583346	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583347	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583350	<i>Bryopsis</i> sp.	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583353	<i>Bryopsis</i> sp.	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583354	<i>Bryopsis</i> sp.	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583356	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Hollants et al., 2011
HF583358	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583359	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583360	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583361	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583362	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583363	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583364	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583365	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583366	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583367	<i>Bryopsis</i> sp.	Madagascar	Hollants et al., 2011
HF583368	<i>Bryopsis</i> sp.	Japão	Hollants et al., 2011
HQ603482	<i>Bryopsis corticulans</i>	Canadá	Saunders; Kucera, 2010
HQ603483	<i>Bryopsis corticulans</i>	Canadá	Saunders; Kucera, 2010

(Continuação)

Nº de acesso GenBank	Espécie	Localidade	Referência
HF583369	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583370	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583371	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583374	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583375	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
HF583378	<i>Bryopsis</i> sp.	Nicarágua	Hollants et al., 2011
HF583380	<i>Bryopsis</i> sp.	Nicarágua	Hollants et al., 2011
HF583381	<i>Bryopsis</i> sp.	Nicarágua	Hollants et al., 2011
HF583382	<i>Bryopsis</i> sp.	Costa Rica	Hollants et al., 2011
HF583383	<i>Bryopsis</i> sp.	Costa Rica	Hollants et al., 2011
HF583384	<i>Bryopsis</i> sp.	Costa Rica	Hollants et al., 2011
HF583386	<i>Bryopsis</i> sp.	Panamá	Hollants et al., 2011
HF583387	<i>Bryopsis</i> sp.	Panamá	Hollants et al., 2011
HF583388	<i>Bryopsis</i> sp.	Panamá	Hollants et al., 2011
HF583389	<i>Bryopsis</i> sp.	Panamá	Hollants et al., 2011
HF583391	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583393	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583394	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583395	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583396	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583397	<i>Bryopsis</i> sp.	Quênia	Hollants et al., 2011
HF583398	<i>Bryopsis</i> sp.	Tanzânia	Hollants et al., 2011
HF583399	<i>Bryopsis</i> sp.	Ilha Reunion	Hollants et al., 2011
HF583400	<i>Bryopsis</i> sp.	Ilha Reunion	Hollants et al., 2011
HF583401	<i>Bryopsis</i> sp.	Arquipélago de Seychelles	Hollants et al., 2011
HF583402	<i>Bryopsis</i> sp.	Arquipélago de Seychelles	Hollants et al., 2011
HF583405	<i>Bryopsis</i> sp.	Filipinas	Hollants et al., 2011
HF583406	<i>Bryopsis</i> sp.	Filipinas	Hollants et al., 2011
HF583407	<i>Bryopsis</i> sp.	Filipinas	Hollants et al., 2011
HF583408	<i>Bryopsis</i> sp.	Filipinas	Hollants et al., 2011
HF583409	<i>Bryopsis</i> sp.	Nova Caledônia	Hollants et al., 2011
HF583410	<i>Bryopsis</i> sp.	Nova Caledônia	Hollants et al., 2011
HF583411	<i>Bryopsis</i> sp.	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583412	<i>Bryopsis</i> sp.	Espanha	Hollants et al., 2011
HF583414	<i>Bryopsis</i> sp.	Holanda	Hollants et al., 2011
HF583415	<i>Bryopsis</i> sp.	França	Hollants et al., 2011
HF583417	<i>Bryopsis</i> sp.	França	Hollants et al., 2011
HF583419	<i>Bryopsis</i> sp.	França	Hollants et al., 2011
HF583423	<i>Bryopsis vestita</i>	Nova Zelândia	Hollants et al., 2011
HF583325	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011

(Continuação)

Nº de acesso GenBank	Espécie	Localidade	Referência
HQ603484	<i>Bryopsis</i> sp.	Estados Unidos	Saunders; Kucera, 2010
JF521593	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
JF521594	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
JF521595	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
JF521596	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
JF521597	<i>Bryopsis</i> sp.	México	Hollants et al., 2011
JF894104	<i>Bryopsis plumosa</i>	Japão	Togashi et al., 2011
JQ755422	<i>Bryopsis plumosa</i>	Argentina	Ciancia et al., 2012
KM820146	<i>Codium decorticans</i>	Brasil	Fucikova et al., 2014
LN810504	<i>Bryopsis plumosa</i>	França	Leliaert; Lopez-Bautista, 2015
NC037363	<i>Bryopsis</i> sp.	-	Cremen et al., 2017
X55877	<i>Bryopsis maxima</i>	-	Kono, 1990

Instructions for authors

Language editing

If English is not your first language, it is strongly recommended to have your manuscript edited for language before submission. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. Authors are liable for all costs associated with such services.

Types of articles

Original Articles

Reviews

Viewpoints

Methods

Short Communications

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see **Preparing the article file** below for details) and submitted online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/abb-scielo>). Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see **Preparing Tables, Figures and Supplementary material** below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the "**New user-register here**" link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and inform your email in "**password help**". Please never create a new account if you are already registered.

If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (acta@botanica.org.br)

Cover letter

All manuscripts must be submitted with a cover letter, which should include an approximately 80 word summary of the scientific strengths of the paper that the authors believe qualify it for consideration by Acta Botanica Brasilica. The cover letter should also include a statement declaring that the manuscript reports unpublished work that it is not under active consideration for publication elsewhere, nor been accepted for publication, nor been published in full or in part (except in abstract form).

Preparing the article file

(Please consult a last issue of **Acta Botanica Brasilica** for layout and style)

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files.doc,.docx and.rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files. Do not include field code either.

The **first page** should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method or Short communication) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Each name should be followed by the **Orcid number** and an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated with an asterisk and should always be the submitting author. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. The address must be synthetic and in English with institution, postal code, city, state and country. Do not translate laboratory, department and university. Titles and positions should not be mentioned. This information is followed by the e-mail address of the corresponding author.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings.

The Abstract should be followed by between five and ten **Keywords**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

Title page

Abstract

Introduction

Materials and methods

Results

Discussion

Acknowledgements

References

Tables and Figures legends

Supplementary Data (if applicable)

Materials and methods and **Results** should be clear and concise.

The **Discussion** section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (**Results and Discussion**), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Materials and methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* 'Jumbo'). Authors must include in Materials and methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Abbreviations must be avoid except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

Units of Measurement. *Acta bot. bras.* adopts the *Système International d'Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). For concentrations, use μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . For size and distance use meters (cm, mm, μm , etc) and be consistent in the manuscript.

Numbers up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a; b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Simmons *et al.* 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

References should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of 'in press' papers whenever possible.

For papers with **six** authors or fewer, please give the names of all the authors. For papers with **seven** authors or more, please give the names of the first three authors only, followed by et al.

Please follow the styles:

Books

Smith GM. 1938. Cryptogamic botany. Vol. II Bryophytes and Pteridophytes. 2nd. edn. New York, McGraw-Hill Book Company.

Chapters in books

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

Research papers

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.

Papers in press (ahead of print)

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. *Acta Botanica Brasilica* (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339.

Online-only journals

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

Thesis (citation should be avoided)

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD or MSc Thesis, University, City.

Websites and other sources (citation should be avoided)

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: author(s) name author(s) initial(s). year. Full title of article. Full URL. 21 Oct. 2014 (Date of last successful access).

Acknowledgements should be in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos for assistance with the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (ID number).

For **SHORT COMMUNICATIONS** note that the editorial guidelines applying to original papers must also apply here. In general, the difference between original papers and short communications is the **lack of subsections in the text** and limited space for illustrations in the latter. Figures and tables can be present, assuming that the overall size of the manuscript does not exceed the five printed page limit (supplementary material can be added). The abstract (as described for original articles) must be followed by a “running text” (a single section, without subheadings), followed by the acknowledgments and references.

Preparing Figures, Tables and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 10A-D, Fig. 11A, Figs. 3A, 4C, Tab.1).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 10, Fig. 11, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 10) should not be inserted into the plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g., Fig. 10A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar. Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files, which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate.doc file for text and tables and.tiff file at 300dpi for figures and graphics. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as "Table S1" and/or "Figure S1".

Acta bot. bras. intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. *Acta bot. bras.* reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.

The Review Process

All authors will receive an email acknowledging the submission of the manuscript, with its correspondent reference number. The Editor-in-Chief will evaluate manuscript adherence to instructions, quality and novelty and will decide on the suitability for peer reviewing. Manuscripts failing to adhere to the format will be returned to the authors. Manuscripts are sent to at least two anonymous referees that are given 21 days to return their reports.

Submitting a revised paper

After peer review, go to “click here to submit a revision” and upload the new manuscript version. Remember to delete the documents in duplicate.

Publication and printing process

After acceptance, a PDF proof will be sent to corresponding authors as an e-mail attachment. Corrected proofs should be returned within 72 h. It is the sole responsibility of the corresponding author to check for errors in the proof.

Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code used in bibliographic referencing and searching.

The dates of submission and acceptance will be printed on each paper.

The corresponding author will receive a free PDF or URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF.

The corresponding author is responsible for distributing this PDF or URL to any co-authors.

Misconduct

Misconduct on submitted manuscripts will lead to immediate rejection. Duplicate publication, plagiarism, figure manipulation, dual-submission, and any other fraudulent method will not be tolerated.

If misconduct is detected after the manuscript publication, the article will be retracted and a retraction note will be published.

Submitted manuscripts can be scanned to detect plagiarism and verify the papers' originality.