



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3º Andar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica  
submetido para avaliação no Edital  
04/2022 (PIC/PIBIC/PIBITI/PIBIC-  
AF)

**Título do projeto:** Diversidade genética e aspectos filogeográficos de *Hypnea brasiliensis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) ao longo do litoral brasileiro

**Palavras-chave do projeto:** distribuição, diversificação, fluxo gênico, Gigartinales, marcadores moleculares

**Área do conhecimento do projeto:** Ciências Biológicas - Botânica

## Sumário

1 Resumo	2
2 Introdução e Justificativa	2
3 Objetivo e Metas	5
4 Metodologia	5
5 Viabilidade	6
6 Cronograma de atividades	6
Referências	7

## 1 Resumo

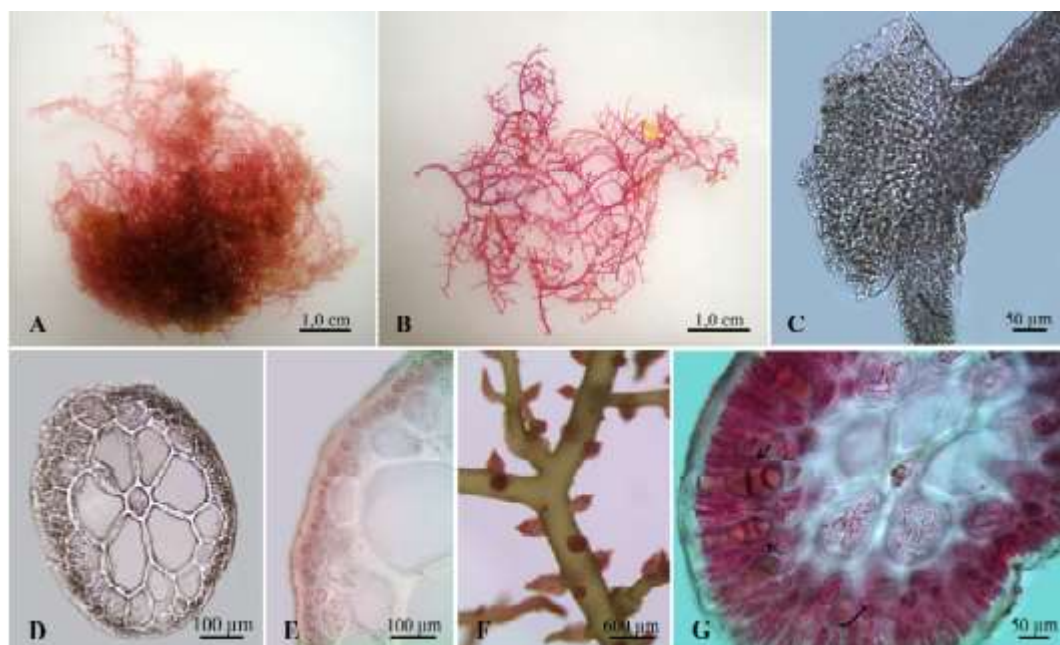
Apesar da enorme biodiversidade existente no litoral brasileiro, esta é uma das regiões menos estudadas no mundo, onde muitas espécies ainda continuam sendo pouco conhecidas. *Hypnea brasiliensis* é um exemplo disso. Este táxon foi erroneamente identificado no litoral brasileiro por décadas e só recentemente teve seu *status* taxonômico elucidado, tendo sido descrito em 2016 como endêmico e amplamente distribuído ao longo de toda a costa brasileira. Estudos recentes avaliaram a taxonomia e filogenia de *H. brasiliensis*; no entanto, os padrões de estrutura populacional, fluxo gênico, diversidade genética e história demográfica desta espécie ainda permanecem desconhecidos e carecem de investigação. Desta forma, este projeto propõe o estudo filogeográfico de populações de *H. brasiliensis* coletadas ao longo do litoral brasileiro, através de análises de dois marcadores moleculares: o mitocondrial COI-5P e o plastidial *rbcL*. Com o desenvolvimento do projeto espera-se elucidar a história evolutiva desta espécie, os processos que levaram à sua diversificação e distribuição atual no Brasil, além de averiguar a presença de estrutura genética populacional e possíveis barreiras ao fluxo gênico.

## 2 Introdução e Justificativa

*Hypnea* J.V. Lamouroux (1813) é o gênero mais especioso da família Cystocloniaceae (Rhodophyta), com 61 espécies, e presente em quase todas as listas de floras de algas bentônicas dos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Guiry; Guiry, 2022). Constitui um grupo economicamente importante para alimentação, principalmente na produção de *k*-carragenana, valiosa como emulsificante, usada para incorporar laticínios e grande variedade de alimentos processados (Castro; Huber, 2012). O gênero *Hypnea* tem sido considerado um grupo desafiador pela sua ampla distribuição geográfica, alta variação genética e morfologia relativamente simples, com alta plasticidade fenotípica e evolução convergente (Price; John; Lawson, 1992; Jesus et al., 2016; 2019). Na última década, a análise criteriosa de dados morfológicos e moleculares forneceu esclarecimentos sobre a diversidade do gênero na costa brasileira, com a descrição de oito novas espécies (Jesus et al., 2013; 2016; 2019; Nauer et al., 2014; 2016). As últimas revisões taxonômicas (Jesus et al., 2019b; Nauer et al., 2019) revelam que, apesar dos avanços obtidos, diversos problemas taxonômicos ainda são recorrentes no gênero, com um elevado número de complexos de espécies, espécies

pobremamente definidas, espécies crípticas e prováveis sinônimos, além de frequentes falhas na identificação em alguns táxons.

Neste contexto, destacam-se espécimes de *Hypnea* coletados ao redor do mundo com hábito emaranhado e que foram por muito tempo identificados como *H. spinella* (C. Agardh) Kützinger com base na sua morfologia. Jesus *et al.* (2016) reavaliaram estes espécimes com base em dados morfológicos, moleculares e análise de material tipo, e revelaram que os exemplares brasileiros vinham sendo erroneamente identificados. Estes autores descreveram então uma nova espécie, amplamente distribuída e endêmica no litoral brasileiro: *Hypnea brasiliensis* P.B. Jesus, Nauer & J.M.C. Nunes (Figura 1). Recentemente, espécimes de *H. brasiliensis* foram incluídos em estudos que avaliaram o seu *status* taxonômico e posição filogenética (Jesus *et al.*, 2019, Nauer *et al.*, 2019). Apesar disso, os padrões de estrutura populacional, fluxo gênico, diversidade genética e demografia histórica desta espécie ainda permanecem desconhecidos e carecem de investigação.



**Figura 1.** *Hypnea brasiliensis*: A- hábito; B- detalhe dos ramos; C- disco de fixação no ápice de um ramo; D- corte transversal na base do talo evidenciando uma célula axial e seis periaxiais; E- células corticais em corte transversal; F- soros tetrasporangia nos râmulos; G- corte transversal de um râmulo fértil evidenciando os tetrasporângios zonados em várias etapas do desenvolvimento na região cortical (setas). (Fonte: Jesus *et al.*, 2013 – como *H. spinella*)

O conhecimento dos processos que determinam padrões de diversidade biológica é fundamental para a conservação da biodiversidade como entidade evolutiva. Este conhecimento pode, em princípio, ser alcançado através de estudos de variação intraespecífica em populações naturais que visam revelar a história biogeográfica das espécies, ou seja, a sua Filogeografia. Segundo Avise *et al.* (1987) e Avise (2000), a Filogeografia constitui o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas em nível intra-específico. Este tipo de abordagem permite avaliar a distribuição geográfica da variabilidade genética reconstruindo a

história evolutiva das populações, ou seja, permite a realização de estudos de microevolução em uma perspectiva genealógica, histórica e filogenética. Assim, podem ser inferidos os processos que levaram aos atuais padrões de distribuição da espécie, incluindo eventos de dispersão, vicariância e o surgimento de barreiras geográficas (Avice *et al.*, 1987; Moritz; Faith, 1998). A Filogeografia também pode ser utilizada como um diagnóstico do *status* de conservação e na identificação de populações consideradas prioritárias para conservação da espécie estudada (Moritz; Faith, 1998).

De acordo com Hu *et al.* (2016), apesar de a Filogeografia ter se expandido desde a sua criação, os estudos filogeográficos com espécies marinhas ainda são escassos, o que se constitui um enorme problema uma vez que os ecossistemas marinhos são fortemente influenciados pelas condições ambientais. No que diz respeito às algas, este tipo de pesquisa tem esclarecido questões sobre a sua evolução e dispersão, sobre como as espécies invasoras afetam os ecossistemas marinhos e como as algas se adaptaram a nichos de habitat heterogêneos. Esse conhecimento é crucial para vincular a diversificação e a evolução das algas com diversos fatores biológicos, ambientais e climáticos para o planejamento e a conservação da biodiversidade marinha (Hu; Fraser, 2016). Esta escassez fica ainda mais evidente no litoral da América do Sul, o que é considerado surpreendente, uma vez que evidências recentes indicam que esta região é um importante *hotspot* de biodiversidade marinha (Selig *et al.*, 2014).

Em algas vermelhas (Rhodophyta), os recentes estudos filogeográficos tem demonstrado que, para estes organismos que liberam esporos na coluna d'água, populações podem ser muito estruturadas em pequenas escalas espaciais (Faugeron *et al.*, 2001, Zuccarello; Sandercock; West, 2002, Gurgel; Fredericq, 2004, Zuccarello; Buchanan; West, 2006, Necchi, 2008, Vidal; Meneses; Smith, 2008, Zuccarello *et al.*, 2011, Vis; Hodge; Kim; Hoarau; Boo, 2012). No Brasil, poucos estudos de Filogeografia foram realizados com algas marinhas vermelhas (Vis; Hodge; Necchi, 2008, Paiano; Necchi, 2013, 2017, Ayres-Ostrock *et al.*, 2019) e, para o gênero *Hypnea* J.V. Lamouroux, até a última década eles eram inexistentes. Geraldino e colaboradores avaliaram a diversidade genética de *Hypnea asiatica* P.J.L. Geraldino, E.C. Yang & S.M. Boo (Geraldino *et al.*, 2009) e *H. cervicornis* J. Agardh (Geraldino; Boo; Boo, 2015 – como *H. flexicaulis*), embora sem o suporte de análises robustas. Jesus (2016) investigou as histórias evolutivas de *H. musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux e *H. pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C. Oliveira, com base em uma detalhada análise Filogeográfica. Este estudo corroborou a diferenciação entre as populações de *H. musciformis* e *H. pseudomusciformis*, indicando que a primeira espécie é restrita ao Hemisfério Norte e encontra-se em equilíbrio, enquanto que a segunda divergiu mais recentemente e encontra-se em expansão na América do Sul. Através de análises filogeográficas, Nauer *et al.* (2019) indicaram ainda a ocorrência, no Oceano Atlântico, de espécies crípticas neste complexo. Tais resultados despertam o interesse para a compreensão dos processos que levaram à diversificação e distribuição atual das espécies do gênero na América do Sul.

O estudo filogeográfico de macroalgas marinhas é uma abordagem inovadora que apresenta grande potencial para elucidar padrões de fluxo gênico, hibridação, expansão demográfica e especiação em diversas espécies; exigindo a interação com várias disciplinas tais como a Ecologia, Biologia, Genética, Oceanografia e Geografia.

Além disso, estes estudos podem proporcionar informações relevantes para melhor compreensão dos eventos históricos e recentes que contribuíram para a distribuição geográfica atual, além de sua conservação. Existem poucos estudos desenvolvidos nesse sentido no Brasil, especialmente devido ao pequeno número de pesquisadores atuando em estudos de evolução molecular de algas marinhas. Diante deste contexto, o trabalho proposto pretende mitigar a carência deste tipo de abordagem em macroalgas marinhas de grande importância econômica no Brasil. O litoral brasileiro abriga um número significativo de espécies de *Hypnea* (Jesus *et al.*, 2019, Nauer *et al.*, 2019), um gênero de algas vermelhas com vasta importância econômica; e sua conservação depende do conhecimento amplo e detalhado de suas espécies e dos mecanismos envolvidos na dinâmica de suas populações. *Hypnea brasiliensis* é uma espécie amplamente distribuída ao longo da costa brasileira com ocorrência relatada desde o Ceará até Santa Catarina. Nesse sentido, uma investigação filogeográfica comparativa entre populações coletadas ao longo de todo o litoral, associada ao estudo da diversidade genética das mesmas poderá elucidar padrões de distribuição espacial e eventos importantes para a evolução deste importante grupo de taxonomia complexa.

### 3 Objetivo e Metas

O objetivo deste projeto é investigar a filogeografia da espécie endêmica do litoral brasileiro, *Hypnea brasiliensis*, com base em sequências de dois marcadores moleculares disponíveis no GenBank: o mitocondrial COI-5P e o plastidial *rbcL*.

As metas do projeto são:

- Construir um mapa de distribuição da espécie no litoral brasileiro;
- Elaborar redes de haplótipos e árvores filogenéticas para cada marcador, individualmente;
- Investigar a diversidade genética e história demográfica das populações de *Hypnea brasiliensis* na costa brasileira;
- Testar a presença de estrutura genética populacional e possíveis barreiras ao fluxo gênico;
- Sugerir os processos históricos que conduziram à formação desta espécie e os processos que possam explicar sua ampla distribuição atual;

### 4 Metodologia

O estudo da filogeografia e diversidade genética de *Hypnea brasiliensis* será realizado a partir de sequências de dois marcadores: a região mitocondrial 5' do gene *cox1*, COI-5P e o gene plastidial *rbcL*, que codifica a subunidade larga da RuBisCO. Serão utilizadas sequências publicadas para esta espécie previamente coletadas ao longo de todo o litoral brasileiro, do estado do Ceará até Santa Catarina e disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As etapas laboratoriais de extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos marcadores moleculares estão finalizadas, de modo que o projeto proposto focará nas etapas de bioinformática. Um mapa de distribuição será construído com a inclusão das coordenadas geográficas de cada espécime analisado no DIVA-GIS 7.5 (<http://www.diva-gis.org/>, Hijmans *et al.*, 2012).

Um alinhamento múltiplo será gerado com a ferramenta ClustalW (Thompson; Higgins; Gibson, 1994), disponível no Geneious v6.0.6 (excluindo as sequências dos primers). Em seguida, árvores de agrupamento serão construídas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2013) utilizando o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) baseado nas distâncias corrigidas do Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980), com 2.000 réplicas de *bootstrap*, a fim de verificar as relações entre os espécimes analisados. A estrutura populacional será analisada através de redes de haplótipos (Bandelt; Forster; Rohl, 1999) construídas no NETWORK 5.0.0.1 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) e através de Inferência Bayesiana com o auxílio do BAPS 5.4 (*Bayesian Analysis of Population Structure*, Corander *et al.*, 2008). Para determinar o nível de estrutura populacional dentro e entre populações, uma análise de variância molecular (AMOVA) será realizada no Arlequin v 3.5. (Excoffier; Lischer, 2010) para cada linhagem principal recuperada através do NETWORK e BAPS.

Para testar os sinais de expansão demográfica, os testes de neutralidade Tajima's D e Fu's Fs (Ramos-Onsins; Rozas, 2002) serão calculados para cada marcador usando o DnaSP 5.10 (Librado; Rozas, 2009). A diversidade de haplótipos (Hd) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) também serão estimadas com o DnaSP 5.10. Adicionalmente, a história demográfica de cada grupo será reconstruída aplicando a análise Mismatch de distribuição (Rozas; Rozas, 1999).

## 5 Viabilidade

Destaca-se o fato de que este é um projeto de Bioinformática onde todas as etapas laboratoriais necessárias para a geração de sequências de DNA (extração, amplificação e sequenciamento) já se encontram finalizadas. A execução das atividades acima descritas não requer infraestrutura robusta nem grandes equipamentos; o aluno se dedicará à realização de análises filogenéticas e filogeográficas utilizando programas computacionais, sendo necessário apenas um computador e acesso à internet. A ideia inicial deste projeto foi enviada no Edital 01/2021, porém houve desistência da bolsista que adquiriu vínculo empregatício e não conseguiu dar continuidade às atividades. Deste modo, foi realizada uma reestruturação do projeto para reenvio por parte do(a) novo(a) candidato(a) e orientador (a), a fim de que o mesmo seja treinado e seja dada continuidade à pesquisa proposta.

De acordo com as Resoluções CGEN nº 7, de 20/03/2018 e CGEN nº 10, de 19/06/2018, o prazo para cadastro de acessos no SisGen que envolvam pesquisadores das áreas como Filogenia e Biogeografia, e em que sejam necessários mais de cem registros de procedência de patrimônio genético por cadastro ainda não foi iniciado, dependendo da disponibilização de formulário simplificado em nova versão do SisGen. O projeto proposto não necessita de aprovação da comissão de ética em pesquisa (CEP) e da comissão de ética no uso de animais (CEUA).

## 6 Cronograma de atividades

1. Revisão Bibliográfica
2. Prospecção de sequências de COI-5P E *rbcL* de *Hypnea brasiliensis*
3. Análises filogenéticas e de diversidade genética

4. Análises filogeográficas
5. Construção do mapa de distribuição
6. Elaboração do relatório parcial
7. Análise e interpretação dos dados
8. Elaboração do relatório final
9. Apresentação dos resultados - Semana de Iniciação Científica da UFABC

Tabela 1 – Cronograma de atividades previstas

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X						
Prospecção de sequências	X	X										
Análises filogenéticas e de diversidade genética			X	X	X							
Análises filogeográficas					X	X	X	X	X	X		
Construção do mapa							X	X				
Elaboração do relatório parcial					X	X						
Análise e interpretação dos dados						X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do relatório final											X	X
Apresentação dos resultados	A ser definida!											

## Referências

AVISE, J. C. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, England, 2000.

AYRES-OSTROCK, L. M. *et al.* Dual influence of terrestrial and marine historical processes on the phylogeography of the Brazilian intertidal red alga *Gracilaria caudata*. *Journal of Phycology*, 55, p. 1096–1114, 2019.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, p. 37-48, 1999.

BOUCKAERT, R. *et al.* BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, p. e1003537, 2014.



CASTRO, P.; HUBER, M. E. Marine Biology. McGraw-Hill Education, 8ª edição. 2009.

CORANDER, J. *et al.* Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9: 1-14. 2008.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAU, T. A.; SHAPIRO, B. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, p. 1185–1192, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, p. 564-567, 2010

FAUGERON, S. *et al.* Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 37, p. 705–716, 2001.

GERALDINO, P. J. L. *et al.* Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU, plastid *rbcL*, and mitochondrial *cox1*. *Taxon*, 58, p. 606-616, 2009.

GERALDINO, P. J. L.; BOO, G. H.; BOO, S. M. Genetic variability and biogeography of the widespread red alga *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcL* and *cox1* sequences. *Botanica Marina*, 58, p. 167-174, 2015.

GRIFFITHS, C.L. *et al.* Marine biodiversity in South Africa: an evaluation of current states of knowledge. *PLoS ONE*, 5, p. e12008, 2010.

GURGEL, C.F.D.; FREDERICQ, S. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *Journal of Phycology*, 40, p. 138-159, 2004.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>; Acesso em 24 de maio de 2022.

HU, Z.M.; FRASER, C.I. (eds). *Seaweed phylogeography: adaptation and evolution of seaweeds under environmental change*. Springer, Heidelberg, Berlin, 2016.



JESUS, P. B. *Estudos biossistemáticos em espécies do gênero Hypnea J.V. Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta)*. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2016.

JESUS, P. B. *et al.* Species delimitation and phylogenetic analyses of some cosmopolitan species of *Hypnea* (Rhodophyta) reveal synonyms and misapplied names to *H. cervicornis*, including a new species from Brazil. *Journal of Phycology*, 52, p. 774-792, 2016.

Jesus, P. B. *et al.* Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Cystocloniaceae, Rhodophyta): Convergent evolution and its implications in the infrageneric classification. *Botanica Marina*, 62, p. 563–575, 2019.

JESUS, P. B.; SCHNADELBACH, A. S.; NUNES, J.M.C. O gênero *Hypnea* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) no litoral do estado da Bahia, Brasil. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 13, p. 1-21, 2013.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, p. 1647-1649, 2012.

KIM, K. M.; HOARAU, G.; BOO, S. M. Genetic structure and distribution of *Gelidium elegans* (Gelidiales, Rhodophyta) in Korea based on mitochondrial cox1 sequence data. *Aquatic Botany*, 98, p. 27-33, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, p. 1547-1549, 2018.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452, 2009.

MANEL, S. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, p. 189–197, 2003.

- MILLER, M. P. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96, p. 722-724, 2005.
- MILLER, M. A. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, 2010.
- MONMONIER, M. S. Maximum-Difference Barriers: An Alternative Numerical Regionalization Method. *Geographical Analysis*, 5, p. 245–261, 1973.
- MORITZ, C.; FAITH, D. P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7, p. 419-429, 1998.
- NAUER, F. *et al.* *Hypnea* species (Gigartinales, Rhodophyta) from the southeastern coast of Brazil based on molecular studies complemented with morphological analyses, including descriptions of *Hypnea edeniana* sp. nov. and *H. flava* sp. nov. *Eur. J. Phycol.*, v. 49, p. 550-575. 2014.
- NAUER, F. *et al.* A taxonomic review of the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) in Brazil based on DNA barcode and morphology. *Revista Brasileira de Botânica*, 42, p. 561–574, 2019.
- NAUER, F., CASSANO, V.; OLIVEIRA, M. C. Description of *Hypnea pseudomusciformis* sp. nov., a new species based on molecular and morphological analyses, in the context of the *H. musciformis* complex (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 27, p. 2405-2417. 2015.
- NAUER, F.; CASSANO, V.; OLIVEIRA, M. *Hypnea wynnei* and *Hypnea yokoyana* (Cystocloniaceae, Rhodophyta), two new species revealed by a DNA barcoding survey on the Brazilian coast. *Phytotaxa*, v. 268, p. 123-134. 2016.
- PAIANO, M. O.; NECCHI JR, O. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycological Research*, 61, p. 249–255, 2013.
- PAIANO, M. O.; NECCHI JR, O. Phylogeography of the freshwater red alga *Batrachospermum viride-brasiliense* (Rhodophyta, Batrachospermales). *Phycological Research*, 65, p. 80-85, 2017.

- PRICE, J.; JOHN, D.; LAWSON, G. Seaweeds of the western coast of tropical Africa and adjacent islands: a critical assessment: Rhodophyta (Florideae). Genera H-K. Bull Br Mus Nat Hist, n 22, p. 123-146. 1992.
- RAMBAUT, A. *Tracer v1.6*. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>, 2014.
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19, p. 2092-2100, 2002.
- ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics: Application Notes*, 15, p. 174-175, 1999.
- SCHENKMAN, R. P. F. *Cultura de Hypnea (Rhodophyta) in vitro como subsídio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos*. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.
- SELIG, E. R. Global Priorities for Marine Biodiversity Conservation. *PLoS ONE* 9, p. e82898, 2014.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal, W: Improving the sensitivity of progressive weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, p. 4673-4680, 1994.
- VIDAL, R.; MENESES, I.; SMITH, M. Phylogeography of the genus *Spongites* (Corallinales, Rhodophyta) from Chile. *Journal of Phycology*, 44, p. 173–82, 2008.
- VIS, M.L; HODGE, J.C.; NECCHI JR., O. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. *Journal of Phycology*, 44, p. 882–888, 2008.
- ZUCCARELLO, G. C. *et al.* Genetic diversity of the mangrove-associated alga *Bostychia radicans*/*B. moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta) from southern Central America. *Journal of Applied Phycology*, 59, p. 98–104, 2011.
- ZUCCARELLO, G.C.; BUCHANAN, J.; WEST, J. A. Increased sampling for inferring phylogeographic patterns in *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the eastern USA. *Journal of Phycology*, 42, p. 1349–1352, 2006.

ZUCCARELLO, G.C.; SANDERCOCK, B.; WEST, J. A. Diversity within red algal species: variation in world-wide samples of *Spyridia filamentosa* (Ceramiales) and *Murrayella pericladus* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies. *European Journal of Phycology*, 37, p. 403–417, 2002.