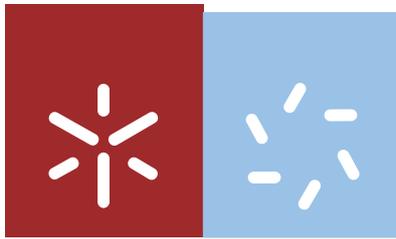


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Artur Miguel Lobo Oliveira

**Compilação de uma biblioteca de referência
de DNA *barcodes* de macroalgas vermelhas
e castanhas reportadas para Portugal e
análise dos seus perfis fitoquímicos**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Artur Miguel Lobo Oliveira

**Compilação de uma biblioteca de referência
de DNA *barcodes* de macroalgas vermelhas
e castanhas reportadas para Portugal e
análise dos seus perfis fitoquímicos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biotecnologia e Bioempendedorismo
em Plantas Aromáticas e Medicinais

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor Filipe Oliveira Costa

Outubro de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Os meus mais profundos agradecimentos dirigem-se ao orientador Doutor Filipe Oliveira Costa, pela disponibilidade incansável, pela amizade, por despertar em mim um constante recurso ao pensamento crítico tão obrigatório e útil a um investigador, pela sinceridade e incentivo diário para conseguir o melhor de nós próprios e, por último, por todo o apoio e conhecimento transmitidos para assim ultimar na realização de uma tese que impulsiona o sentimento de orgulho e esperança no futuro.

À Doutora Manuela Parente, que é “apenas” a pessoa que me fez descobrir a minha mais recente paixão e me incentivou a embrenhar pelo mundo das algas marinhas como mais ninguém o conseguiria fazer. A sua constante vontade de trabalhar e de querer saber mais é contagiante, ensinando-me assim tudo o que sei sobre a minha desejada área de investigação futura. Sem a sua força, amizade e paciência, esta tese nunca passaria a existir, e por isso devo-lhe a minha eterna gratidão e estima.

Ao Doutor Alberto Dias, co-orientador e professor nato, que através da simplicidade dos seus ensinamentos consegue fazer compreender facilmente o porquê de cada passo que se dá no laboratório. A sua perseverança, companheirismo e paciência tornaram fáceis quaisquer horas extra necessárias para conseguir o que queremos, sem recurso a quaisquer rezas ou preces para que tudo corresse melhor.

Sem qualquer surpresa, aos meus pais e ao meu irmão, porque sem eles não passaria de um aglomerado de células e não seria o ser humano digno, curioso e altruísta que luta por ajudar a criar um mundo melhor com o pouco que sabe, dia-a-dia. A eles e à minha restante família um eterno obrigado por fazerem de mim o que sou hoje com todo o orgulho.

A todos os meus colegas de laboratório (Sara, Luísa, Mónica, Jorge, Marcos, Soraia e Hugo) pelas mais variadas razões, desde o apoio incansável, as discussões de trabalho, conselhos e a companhia animada diária que facilitaram imenso o progresso deste trabalho e que fomentou em mim a importante necessidade de estar presente numa equipa que trabalha em prol de objectivos comuns, sempre com o sentido de entreatajuda em mente.

Um forte e sincero agradecimento à Cláudia, Joana, Juliana e Elisabete, minhas colegas de turma, por partilharem comigo esta viagem curta mas cheia de sucessos, cujo sabor apenas se revela doce por saber que teremos sempre a nossa amizade bem guardada para onde quer que a vida nos leve.

E por último, mas não menos importante, à minha namorada Alexandra Sousa, por tudo o que ela simboliza para mim e por conseguir iluminar os dias mais escuros que a vida traz. Todos os agradecimentos não são suficientes pela força, apoio, afecto, ânimo e felicidade que me transmite todos os dias e que são o alento para que se enfrente qualquer desafio diário com um sorriso.

Este estudo foi financiado em parte por Fundos FEDER através do Programa Operacional de Factores de Competitividade –COMPETE, por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) no âmbito dos projectos FCOMP-01-0124-FEDER-007381, PEstC/BIA/UI4050/2011, LusoMarBoL (PTDC/MAR/69892/2006) e MACROBIOMOL (PTDC/MAR/114 613/2009). Também foi financiado por (2010-2013), “Functional foods for neuroprotection: a role to *Hypericum perforatum* (Hyperic-Food)”, PTDC/AGR-ALI/105169/2008.

Compilação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* de macroalgas vermelhas e castanhas reportadas para Portugal e análise dos seus perfis fitoquímicos

Resumo

Este estudo teve como objectivo contribuir para a compilação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* de macroalgas marinhas Portuguesas com vista à avaliação de perfis fitoquímicos em espécies rigorosamente identificadas e sua utilização em potenciais aplicações biotecnológicas e farmacológicas. A biblioteca de referência aqui produzida é composta por sequências parciais do gene mitocondrial do citocromo c oxidase I (COI), obtidas por amplificação e sequenciação de espécimes de macroalgas castanhas e vermelhas colectadas no âmbito deste estudo, aliada à compilação a partir de bases de dados públicas de sequências homólogas de espécies reportadas para Portugal. Efectuaram-se também análises dos perfis fitoquímicos de 16 espécies com recurso a *High-Performance Liquid Chromatography* e *Gas Chromatography*. Foi compilada uma biblioteca de referência composta por 241 DNA *barcodes* de 100 espécies, 71 das quais pertencentes ao filo Rhodophyta e 29 ao filo Heterokontophyta. A análise dos DNA *barcodes* de COI permitiu a distinção clara de espécies em praticamente todos os casos, salvo raras excepções cujas razões para a sua ocorrência se encontram devidamente documentadas. As taxas médias de divergência intraespecífica e interespecífica congénica observadas no filo Rhodophyta foram 0,21% e 13,94%, respectivamente, e as mesmas taxas no filo Heterokontophyta foram de 0,22% e 6,94%, respectivamente. Estes padrões de variabilidade são muito próximos das reportadas em estudos de macroalgas de ambos os filios, confirmando a validade desta biblioteca de referência. A análise de perfis fenólicos por meio de HPLC não foi possível devido à concentração reduzida dos extractos analisados. A análise de perfis lipídicos por meio de GC permitiu confirmar uma maior variedade de ácidos gordos nas algas castanhas do que nas vermelhas. Os ácidos gordos maioritariamente presentes nas espécies de Rhodophyta foram C14, C16, C16:1, C18 e C18:1n9c/t e nas espécies de Heterokontophyta foram C14, C16, C16:1, C18, C18:1n9c/t, C18:3n3, C18:2n6c e C20:3n3. A combinação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* com maior representatividade de espécies de macroalgas portuguesas, com um estudo mais aprofundado de perfis fitoquímicos de populações diversas da mesma espécie e/ou género irá facilitar o acesso a um recurso biológico da costa Portuguesa com grande potencial de exploração para fins biotecnológicos e farmacológicos.

Palavras – chave: macroalgas, Heterokontophyta, Rhodophyta, Portugal, DNA *barcoding*, COI-5P, perfil fitoquímico, ácidos gordos.

Assembling a reference library of DNA barcodes for red and brown macroalgae reported for Portugal and analysis of their phytochemical profiles

Abstract

The objective of this study was to assemble a reference library of DNA barcodes for Portuguese red and brown macroalgae in order to evaluate phytochemical profiles in thoroughly identified species and use them for potential biotechnological and pharmacological purposes. The reference library produced in this study is formed by partial sequences from the cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial gene, obtained by amplification and sequencing of brown and red macroalgae specimen's collected in the scope of this study, allied to the assembling of homologous sequence's from public databases belonging to species reported from Portugal. Phytochemical analyses were also made on 16 macroalgae species using High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography. A reference library with 241 DNA barcodes from 94 species was assembled, of which 71 species belong to Rhodophyta and 23 species belong to Heterokontophyta. Analyses of COI DNA barcodes allowed to discriminate different species in almost every case, apart from a few exceptions which are duly interpreted in this study. Average intraspecific and interspecific congeneric divergences were 0,21% and 13,94% in Rhodophyta, respectively, and 0,22% and 6,94% in Heterokontophyta, respectively. These variability patterns are very similar to those reported in other Rhodophyta and Heterokontophyta macroalgae studies, confirming this reference library's validity. Phenolic analyses with HPLC were not possible due to the extract's low concentration. Lipid analyses with GC confirmed a larger fatty acid's variety within brown macroalgae. The major fatty acids present in Rhodophyta species were C14, C16, C16:1, C18 and C18:1n9c/t and in Heterokontophyta species were C14, C16, C16:1, C18, C18:1n9c/t, C18:3n3, C18:2n6c and C20:3n3. Combining a more comprehensive reference library of DNA barcodes for Portuguese macroalgae, with a deeper study on phytochemical profiles from diversified populations of the same species and/or genera will greatly facilitate the access to a biological resource from the Portuguese coast that owns a great potential for biotechnological and pharmacological purposes.

Keywords: macroalgae, Heterokontophyta, Rhodophyta, Portugal, DNA *barcoding*, COI-5P, phytochemical profile, fatty acids.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
1. Introdução.....	19
1.1. DNA <i>barcoding</i>	21
1.2. Iniciativa <i>Barcode of Life</i>	24
1.3. Algas marinhas	26
1.4. Potencial farmacológico e alimentar	35
1.5. Factores económicos, de produção e consumo humano	38
2. Objectivos.....	42
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Procedimento Global	43
3.2. Colheita e Processamento de Amostras	44
3.3. Maceração do tecido algal	46
3.4. Extracção de DNA.....	47
3.5. Amplificação.....	47
3.6. Purificação e sequenciação	49
3.7. Compilação, edição e alinhamento de sequências	50
3.8. Verificação das identificações por similaridade de DNA <i>barcodes</i>	52
3.9. Análise de dados e construção de árvores de DNA <i>barcodes</i>	52
3.10. Obtenção de extractos para análise fitoquímica.....	54
3.11. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	56
3.12. Cromatografia Gasosa (GC)	57
4. Resultados	59
4.1. Compilação da biblioteca de referência de DNA <i>barcodes</i>	59
4.2. Divergências moleculares intra e interespecíficas.....	59
4.3. Árvores de DNA <i>barcodes</i>	61
4.4. Pesquisa de sequências homólogas em bases de dados	66
4.5. Análise por HPLC	68

4.6. Análise por GC.....	68
5. Discussão.....	75
6. Conclusão.....	85
7. Referências bibliográficas	88
8. Anexos.....	112

Lista de abreviaturas e siglas

ABBI – All Birds Barcoding Initiative

AC – Antes de Cristo

AF – Anti Fouling

Alrt – Average Likelihood Ratio Test

AUS – Austrália

AST – Astúrias

AZ – Açores

Bee-BOL – Bee Barcode of Life Initiative

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BMU – Bermudas

BOLD – Barcode Of Life Database

BOLD-IDS – Barcode Of Life Database Identification System

BOLI – Barcode of Life Initiative

BRA – Brasil

C – Carbono

CAN – Canadá

CBOL – Consortium for the Barcoding Of Life

CHL – Chile

Cl – Cloro / Cloreto

COI – Citocromo oxidase I

DAD – Diode Array Detector

DDBJ – DNA Data Bank of Japan

DNA – DeoxyriboNucleic acid

dNTPs - deoxyribonucleotide triphosphates

E – Este

ECBOL – European Consortium for the Barcode Of Life

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

EMBL – European Molecular Biology Laboratory

EoL – Encyclopedia of Life

ESP – Espanha

FAO – Food and Agriculture Organization
FISH-BOL – Fish Barcode Of Life
FL – Flores
FRA – França
FRO – Ilhas Faroés
Fw - Forward
g – Grama
g - Aceleração gravítica
GBIF – Global Biodiversity Information Facility
GC – Gas Chromatography
GI – Green Island
HI – Hawaii
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
iBOL – International Barcode Of Life
i.e. – isto é
INSDC – International Nucleotide Sequence Database Collaboration
ITA – Itália
ITIS – Integrated Taxonomic Information System
IRL – Irlanda
JTT - Jones-Taylor-Thornton
K2P – Kimura 2 Parâmetros
KPa - Quilopascal
LHI – Lord Howe Island
m - Metro
MAD – Madeira
MarBOL – Marine Barcode Of Life
MBI – Mosquito Barcode Initiative
Mg – Magnésio
mg – Miligrama
ML – Maximum Likelihood
ml – Milílitro
mm – Milímetro

MOTU – Molecular Operational Taxonomic Unit
mV – Milivolt
N – Norte
nm – Nanómetro
NAM – Namíbia
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NCL – Nova Caledónia
NE – Nordeste
NJ – Neighbor-Joining
NOR – Noruega
NW – Noroeste
NZL – Nova Zelândia
PAN – Panamá
pb – Pares de base
PCR – Polymerase Chain Reaction
PEI – Prince Edward Island
PRI – Porto Rico
PRT – Portugal
psi – Pound force per square inch
QBOL – Quarantine Barcode Of Life
rDNA – ribosomal Deoxyribonucleic acid
Rev – Reverse
RRT – Relative Retention Time
S – Sul
SE – Sudeste
SM – São Miguel
SW – Sudoeste
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TBTSPC – Tributyltin Self-Polishing Copolymer
TRR – Taxonomic Resolution Ratio
UK – Reino Unido
USA – Estados Unidos da América

UV – ultravioleta

W – Oeste

WAL – País de Gales

WoRMS – World Register of Marine Species

°C – Graus centígrados

μl – Microlitro

μM - Micromol

μm – Micrometro

Índice de Figuras

Figura 1 – Talo do tipo sifonado	29
Figura 2 – Talo do tipo pseudoparenquimatoso	29
Figura 3 – Ciclo de vida género <i>Fucus</i>	30
Figura 4 – Ciclo de vida género <i>Porphyra</i>	31
Figura 5 – Aquacultura na produção global de organismos marinhos	40
Figura 6 – Esquema procedimento global	44
Figura 7 – Fotografia de gel de verificação de amplificação	49
Figura 8 – Árvore NJ de Rhodophyta	63
Figura 9 – Árvore ML (aminoácidos) de Rhodophyta	64
Figura 10 – Árvore NJ de Heterokontophyta	65
Figura 11 – Árvore ML (aminoácidos) de Heterokontophyta	66
Figura 12 – Perfil lipídico de <i>Asparagopsis armata</i>	70
Figura 13 - Perfil lipídico de <i>Asparagopsis taxiformis</i>	70
Figura 14 – Perfil lipídico de <i>Cladostephus spongiosus</i>	70
Figura 15 - Perfil lipídico de <i>Colpomenia sinuosa</i>	70
Figura 16 - Perfil lipídico de <i>Corallina caespitosa</i>	71
Figura 17 - Perfil lipídico de <i>Cystoseira humilis</i>	71
Figura 18 - Perfil lipídico de <i>Petalonia binghamiae</i>	71
Figura 19 - Perfil lipídico de <i>Fucus spiralis</i>	71
Figura 20 - Perfil lipídico de <i>Fucus vesiculosus</i>	72
Figura 21 - Perfil lipídico de <i>Gelidium microdon</i>	72

Figura 22 - Perfil lipídico de <i>Halopteris filicina</i>	72
Figura 23 - Perfil lipídico de <i>Halopteris scoparia</i>	72
Figura 24 - Perfil lipídico de <i>Plocamium cartilagineum</i>	73
Figura 25 - Perfil lipídico de <i>Pterocladia capillacea</i>	73
Figura 26 - Perfil lipídico de <i>Sargassum vulgare</i>	73
Figura 27 - Perfil lipídico de <i>Zonaria tournefortii</i>	73

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Espécies colectadas para estudo molecular	45,46
Tabela 2 – Volumes de reagentes para misturas de reacção de PCR	48
Tabela 3 – Ciclos de PCR utilizados	48
Tabela 4 – Espécies colectadas para estudo fitoquímico	54/55
Tabela 5 – Gradiente de eluição utilizado em HPLC	57
Tabela 6 – Divergências intra e interespecíficas de Rhodophyta e Heterokontophyta	60
Tabela 7 – Resultados da pesquisa de sequências homólogas	67
Tabela 8 – Leitura e identificação dos perfis lipídicos	74

1. Introdução

A taxonomia é a área científica responsável pela produção do conhecimento basal sobre a diversidade biológica, do qual dependem outras áreas das ciências biológicas. O conhecimento gerado pela taxonomia é crucial em qualquer estudo relacionado com as ciências da vida, no qual o reconhecimento das espécies, assim como a atribuição de nomes científicos, é fundamental para a pesquisa do comportamento, evolução ou qualquer outro tópico de investigação relacionado com organismos (Savage 1995). O sistema taxonómico tem por missão inferir as relações filogenéticas entre *taxa* e fornecer uma terminologia comum ao mundo científico (Einav 2004). Uma hipótese filogenética robusta é um pré-requisito para formular hipóteses evolutivas credíveis sobre como e quando indivíduos aparentados evoluíram e desenvolveram uma multicelularidade complexa (Silberfeld *et al.* 2010). Deste modo, as espécies são rotineiramente utilizadas como unidades fundamentais dos estudos ecológicos, biogeográficos, de conservação e macroevolução, embora o processo de delimitação empírica das espécies possa envolver grandes obstáculos (Wiens 1999; Agapow *et al.* 2004; Sites e Marshall 2004).

À medida que o nosso conhecimento sobre a biodiversidade aumenta, incluindo o reconhecimento do número crescente de espécies em vias de extinção (Wright e Muller-Landau 2006), existe uma necessidade premente de catalogar e descrever essa diversidade. Indubitavelmente, o contributo da taxonomia para a Ciência como um todo tem sido muito subestimado ao longo do tempo por cientistas e sociedade em geral, em grande parte devido à incompreensão da complexidade associada à biodiversidade e dos enormes desafios conceptuais e operacionais colocados na sua descrição e compreensão.

As estimativas relativas ao número de espécies eucariotas existentes variam entre 3,6 milhões até mais de 100 milhões (Wilson 2004), sendo cerca de 11 milhões uma das estimativas mais consensuais do número de espécies de seres vivos existentes no planeta (Chapman 2009). Em contraste, o número estimado de espécies formalmente descritas ronda 1,9 milhões, revelando o pouco que conhecemos proporcionalmente à

imensidão da biodiversidade na Terra. O facto de 18000 novas espécies em média serem descritas anualmente (Chapman 2009) revela a eficácia de trabalho dos taxonomistas, mas em termos conclusivos os recursos disponíveis e abordagens adoptadas estão longe de cumprir o desafio de catalogar toda a biodiversidade. Este problema foi identificado e reconhecido entre a comunidade científica, sendo a partir daí comumente referido como o “impedimento taxonómico” (Rodman e Cody 2003).

Apesar da evolução de ferramentas auxiliares na identificação de espécies, a taxonomia esteve até há relativamente pouco tempo totalmente dependente do trabalho de apenas alguns especialistas a nível mundial, no estudo de grupos específicos de organismos. A delimitação de espécies próximas é tão complexa que apenas alguns taxonomistas, mesmo aqueles que devotaram toda a sua vida à taxonomia, podem discriminar indubitavelmente mais de 1000 espécies (Costa e Carvalho 2007). Todas estas dificuldades, aliadas ao escasso número de especialistas em taxonomia e aos poucos recursos alocados a esta temática, constituem um obstáculo para a compreensão, utilização e conservação da biodiversidade (Rodman e Cody 2003; Wheeler *et al.* 2004). De facto, este obstáculo afecta toda a comunidade científica e a sociedade em geral, dado que se torna difícil ter acesso ao conhecimento taxonómico geral (Costa e Carvalho 2007).

Para os taxonomistas, o primeiro passo no processo de catalogação da vida é reconhecer as diferenças entre espécies (Saunders 2005). No entanto, apesar de um aumento na diversidade estar correlacionado com um aumento na variabilidade morfológica (Saunders 2005), a incapacidade de distinguir as características diagnosticantes que diferenciam as diversas espécies de macroalgas tem circunscrito severamente a delimitação das mesmas (De Clerck e Coppejans 1999). No caso das algas, a plasticidade morfológica e a evolução convergente combinadas com a escassez de caracteres diagnosticantes podem dificultar a inclusão de um indivíduo numa determinada família e praticamente impossibilitar a identificação de espécies (Saunders 2005). A falta de compreensão quanto à variabilidade de caracteres morfológicos tem levado a uma taxonomia errónea, onde espécimes situados nas fronteiras do espectro morfológico têm sido habitualmente descritos como espécies

diferentes (De Clerck e Coppejans 1999). Na Europa Continental, mais de 60 espécies e *taxas* interespecíficos de macroalgas têm sido descritas nos últimos dois séculos (Hornig e Schnetter 1988; De Clerck 2003), sendo que esse número é considerado uma estimativa grosseira da verdadeira diversidade taxonómica causada pela má interpretação da plasticidade morfológica. Actualmente, não há qualquer consenso quanto ao número de espécies de algas presente na Europa Continental (Tronholm *et al.* 2010).

1.1. DNA *barcoding*

Os métodos moleculares possuem características únicas e vantajosas quando utilizados como ferramentas para os taxonomistas: possuem uma série de características universais que podem ser directamente comparadas entre diversos organismos (ao contrário do que acontece em abordagens estritamente baseadas na morfologia), permitem a delimitação de espécies a um nível mais profundo, possibilitando o estudo de espécies crípticas (espécies que, apesar de serem morfológicamente idênticas ou similares, constituem unidades evolutivas independentes, com isolamento reprodutivo total ou parcial), tornam possível a identificação de espécimes fragmentados e permitem identificar um organismo em diferentes fases do seu ciclo de vida (Costa e Antunes 2012).

O DNA (deoxyribonucleic acid – ácido desoxirribonucleico) *barcoding* – a sequenciação de uma região de DNA curta e padronizada – tem sido proposta como uma nova ferramenta molecular na identificação de espécies animais (Hebert *et al.* 2003a). A região denominada possui cerca de 650 pb e situa-se na extremidade 5' da citocromo c oxidase I (COI), um locus de DNA mitocondrial. Foi demonstrado que providencia resolução ao nível da espécie dentro de um vasto leque de espécies provenientes de um diverso número de *taxa* animais (Hebert *et al.* 2004a,b; Barrett e Hebert 2005; Smith *et al.* 2005; Ward *et al.* 2005; Clare *et al.* 2007; Costa *et al.* 2007), assim como de macroalgas vermelhas (Saunders 2005; Robba *et al.* 2006) e castanhas (Kucera e Saunders 2008; McDevit e Saunders 2009).

Na altura da publicação de Hebert e seus colegas em 2003, a aplicação de marcadores moleculares para a identificação de espécies não era um conceito inovador. A utilização de marcadores moleculares tinha sido já introduzida décadas antes, resultando numa grande expansão da sua aplicação (Carvalho 1998).

A premissa da técnica consiste em associar um código de barras nucleotídico (DNA *barcode*) inequívoco para cada espécie conhecida obtido através da leitura de uma região específica do genoma. Esse código de barras não é necessariamente invariável dentro de uma espécie, pois indivíduos da mesma espécie podem partilhar sequências muito similares, no entanto o DNA *barcode* será claramente distinto quando comparado entre espécies diferentes (Costa e Carvalho 2007).

O DNA *barcoding* é essencialmente uma ferramenta prática que permite comparar uma sequência de DNA alvo com uma sequência de DNA de referência podendo confirmar a identidade da espécie alvo ou originar hipóteses alternativas à delimitação dessa espécie. No entanto, o DNA *barcoding* não deve substituir os protocolos convencionais para identificar novas espécies (Wheeler *et al.* 2004; DeSalle 2006; Hajibabaei 2006). É por isso crucial aproveitar esta ferramenta em vez de a priorizar inteiramente em relação aos métodos convencionais da taxonomia, os quais se baseiam fortemente em características ecológicas, morfológicas e comportamentais. Desta forma, o DNA *barcoding* pode tornar o sistema de Linnaeus mais acessível (Costa e Carvalho 2007).

A utilização do COI como marcador molecular é bastante útil na identificação de espécies quando a plasticidade fenotípica é um obstáculo, as chaves dicotómicas abordam apenas determinados fases do ciclo de vida e não permitem reconhecer espécies crípticas, todos problemas presentes em estudos de macroalgas (Hebert *et al.* 2003a,b). Essa região do genoma mitocondrial possui uma série de características consideradas vantajosas para o seu uso como, por exemplo: por ser uma região curta e ser possível a utilização de *primers* universais bastante robustos, que permitem a amplificação relativamente fácil da sua extremidade 5' em representantes da maioria dos filos animais; ter uma taxa de evolução molecular cerca de 3x maior que a de 12S

ou 16S rDNA e suficientemente rápida para permitir a discriminação não só de espécies evolutivamente muito próximas, mas também de grupos filogeográficos intraespecíficos; ter maior probabilidade de fornecer uma percepção filogenética mais profunda em casos de divergência recente comparativamente a outros genes mitocondriais, uma vez que as mudanças na sua sequência de aminoácidos ocorrem mais lentamente; ser uma sequência facilmente alinhável; ser informativa para distinguir espécies próximas, pois possui variabilidade semelhante a outros genes codificadores de proteínas (Hebert *et al.* 2003a).

Existem algumas limitações relativamente a esta região de DNA *barcode*, nomeadamente a falta de resolução em algumas espécies recentemente divergentes (cnidários bentónicos, grupos de anfíbios e algumas espécies de gastrópodes) ou *taxa* particulares (Waugh 2007) e a incapacidade para detectar casos de hibridização introgressiva. No entanto, estas excepções representam apenas uma percentagem muito pequena de espécies a nível global.

A metodologia associada ao DNA *barcoding* requer que a variação intraespecífica seja substancialmente menor do que variação interespecífica, permitindo uma identificação precisa dos indivíduos (Matzen da Silva *et al.* 2011). Diversas medições de divergência genética independentes são essenciais, porque um só gene pode representar erradamente a árvore das espécies e uma só espécie pode representar erradamente a história biogeográfica geral de uma região (Knowlton e Weigt 1998). Para além disso, com base em divergências padronizadas, podemos diferenciar e alocar espécies dentro da respectiva família de acordo com a sua filogenia, avaliando as respectivas distâncias evolutivas a outras espécies, como também podemos descobrir a possível existência de novas espécies para a Ciência entre as amostras colectadas mesmo sem ter efectuado antecipadamente uma verificação taxonómica mais profunda. O DNA *barcoding*, conjuntamente com colecções de grande escala e metodologias de processamento, poderá gerar de forma rápida informação capaz de responder a questões relacionadas com ecologia, distribuição local e biogeografia. No entanto, e no caso particular de alguns *taxa* de macroalgas, a falta de métodos de

extração de DNA rápidos, consistentes e automáticos (McDevit e Saunders 2009) pode por vezes ser um obstáculo na obtenção rápida de dados.

A identificação de espécies com base no DNA *barcoding* pode apresentar verdadeiros desafios aos taxonomistas, na medida em que a capacidade de delimitar diferentes espécies usando ferramentas moleculares poderá exceder a nossa capacidade de delimitar as mesmas morfologicamente, levando assim ao reconhecimento de espécies crípticas (Lindstrom 2008; LeGall e Saunders 2010).

1.2. Iniciativa *Barcode of Life*

Passaram-se quase 8 anos desde que foi lançada uma nova abordagem na catalogação da biodiversidade eucariota através do DNA *barcoding* e do *Barcode of Life Initiative* (BOLI). Esta nova abordagem tem revolucionado a forma como os investigadores trabalham e vêem a catalogação da vida, tendo gerado um número crescente de revisões, artigos e discussões sobre o assunto. As consequências destas novidades a nível científico podem demorar a surgir, mas o BOLI já conseguiu influenciar a investigação sobre a biodiversidade de diversas formas num muito curto espaço de tempo (Costa e Antunes 2012).

Em Maio de 2004, pouco mais de um ano após a publicação do artigo de Hebert e seus colegas (Hebert *et al.* 2003a), um consórcio internacional – o *Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL) (homepage <http://www.barcodeoflife.org/>) – promoveu a implementação do DNA *barcoding*, lançando um projecto único de genómica de escala global. A missão do CBOL consiste em explorar e desenvolver o potencial do DNA *barcoding* para investigação e como ferramenta prática para identificação de espécies. Desde a sua inauguração, o CBOL já registou um rápido desenvolvimento, o qual foi particularmente intenso após a primeira conferência *Barcoding of Life* no Museu de História Natural londrino, em Fevereiro de 2005 (Costa e Carvalho 2007).

O impacto do DNA *barcode* na catalogação da vida catalisou a criação de várias conferências ao longo dos anos, como a *First European DNA barcoding conference* (em Leiden, 2007) e a *Second International Barcode of Life conference* (em Taipei, 2007), as quais possibilitaram não só a criação do *European Consortium for the Barcode of Life* (ECBOL), como também a organização de mais conferências sobre este tema, o qual tem tido forte adesão e um impacto cada vez maior no seio da comunidade científica. No entanto, a influência presente do DNA *barcoding* reflecte-se não pela quantidade de estudos, mas sim pela diversidade de abordagens e de *taxa* estudados e da variedade de interesses profissionais dos membros desta comunidade heterogénea (Costa e Antunes 2012).

Neste momento, o CBOL conta com cerca de 129 organizações provenientes de 50 países. As primeiras campanhas globais de DNA *barcoding* – a *Fish Barcode of Life* (FISH-BOL) (homepage <http://www.fishbol.org/>) e a *All Birds Barcoding Initiative* (ABBI) – foram lançadas, com o intuito de recolher uma base de dados de referência de DNA *barcodes* para todos os peixes e aves, respectivamente. Existem actualmente mais projectos internacionais de DNA *barcoding*, entre os quais o *Marine Barcode of Life* (MarBOL) (homepage <http://www.marinebarcoding.org/>).

O CBOL coordena e promove o DNA *barcoding* a uma escala global e possibilita o acesso público aos dados relacionados. Tanto o *Barcode of Life Database* (BOLD) (Ratnasingham e Hebert 2007) como os repositórios públicos de genomas (nomeadamente o *GenBank of the National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) e o *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ)) fornecem acesso livre aos dados de DNA *barcoding*. Para evitar a dispersão de informação taxonómica, as soluções informáticas permitem a interacção entre bases de dados e a criação de bases de dados integradas, tais como a *Catalogue of Life* (resultante da fusão entre a *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) e a *Species 2000*) ou a *World Register of Marine Species* (WoRMS) (Appeltans *et al.* 2010), as quais fornecem acesso centralizado a dados taxonómicos. Relativamente ao acesso à informação sobre biodiversidade, a criação da *Encyclopedia of Life* (EoL) em 2008 é um desenvolvimento importante e um dos mais influentes para o futuro (Wilson

2003), que visa oferecer um conjunto global de informação detalhada e compreensível de todas as espécies conhecidas do planeta.

Outro projecto resultante da importância e do impacto do DNA *barcoding* na Ciência é o *Quarantine Barcode of Life* (QBOL), um projecto fundado em Maio de 2009 pela União Europeia, cujo objectivo centra-se em desenvolver um sistema de vigilância baseado no DNA *barcoding* para identificação de potenciais agentes patogénicos transportados em produtos biológicos através do comércio internacional antes de entrarem na Europa.

Em Setembro de 2010, é criado um projecto global de DNA *barcoding*, o *International Barcode of Life* (iBOL), cujo objectivo principal é criar uma biblioteca de DNA *barcodes* de 500000 espécies eucarióticas até 2015, constituindo assim o maior e mais ambicioso projecto de biodiversidade a nível global estabelecido até hoje. Tanto o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) como o iBOL têm conseguido estabelecer parcerias com iniciativas e instituições nacionais e internacionais relevantes (tais como *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC), *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF), *Species 2000*, *ITIS*, *EoL*), tornando-se assim agregadores importantes da investigação relacionada com a biodiversidade (Costa e Antunes 2012).

1.3. Algas marinhas

O conceito de alga não possui qualquer suporte taxonómico, sendo comumente utilizado para denominar um organismo fotossintético, polifilético, não-coeso e que produz oxigénio artificialmente (Barsanti e Gualtieri 2006). Apesar destas semelhanças com as plantas superiores, as algas distanciam-se delas devido a várias diferenças, tais como a ausência de flores, folhas, raízes e de tecidos diferenciados responsáveis pelo transporte interno de longa distância e protecção contra a perda de água (Braune e Guiry 2011).

As algas marinhas podem ser encontradas virtualmente em qualquer costa do globo. Enquanto algumas espécies são ubíquas, outras apenas podem ser encontradas em

zonas geográficas muito específicas (Braune e Guiry 2011) e restritas a substratos característicos como: rochas (epilíticas), lama ou areia (epipélicas), outras algas ou plantas (epifíticas) ou animais (epizóicas) (Barsanti e Gualtieri 2006). As algas são parte de um ecossistema marinho complexo: elas constituem a base alimentar de grande parte dos organismos marinhos (moluscos, crustáceos, peixes e equinodermes), formam matéria orgânica dissolvida (fonte alimentar para bactérias, fungos e protozoários), são portadoras de muitos organismos epizóicos tais como esponjas e anémonas e epifíticos de pequenas algas, providenciando habitat e abrigo a muitos organismos, alguns dos quais presentes no topo da cadeia alimentar, como aves, mamíferos marinhos e peixes (Braune e Guiry 2011). As algas situam-se até uma profundidade máxima de 32m aproximadamente em águas temperadas frias (ou 250m, em águas tropicais ou subtropicais muito claras), onde é apenas recebida 0.05% a 0.10% de irradiação de fotões de superfície devido à sua reflexão por acção das turbulências, matéria suspensa e coloração (Braune e Guiry 2011).

É difícil avaliar e diferenciar a influência dos vários elementos bióticos e abióticos (pH da água, temperatura, acção das marés, ar, nível de salinidade, herbivoria, biofouling, luz solar, entre outros) e suas interligações com as comunidades de algas. A luz solar fornece a luminosidade e temperatura necessárias para as elevadas taxas de fotossíntese, mas também podem causar desidratação e, conseqüentemente, a subida dos níveis salinos; a concentração e especiação de carbono inorgânico são afectadas pela temperatura, pH da água e presença de vegetação e animais na área; é também difícil de determinar o nível de competição entre espécies de macroalgas, tanto relativamente a recursos como a locais de fixação ideais. Só depois de encontrarem um substrato apropriado é que as algas começam a desenvolver-se, tornando assim a procura por substrato a razão principal para ocorrência de competição entre macroalgas marinhas (Einav 2004).

Dentro do mundo das algas existe uma enorme variedade de tipos e formas anatómicas, tais como a apresentação de diferenciação de tecidos e estruturas morfológicas avançadas em certas espécies ou, em contraste, filamentos simples ramificados ou não ramificados constituídos por uma camada singular de células

medulares (Braune e Guiry 2011). Existe uma grande variedade de tipos de talos nas algas, os quais podem ser unicelulares ou parte de colónias unicelulares (móveis ou imóveis), filamentosos (divisão celular e formação de cadeias de células-filhas ligadas pelas paredes celulares umas das outras), sifonados (formação de filamentos tubulares sem delimitação por meio de paredes celulares) (Figura 1), parenquimatosos (as células primárias começam a dividir-se em todas as direcções, não formando qualquer estrutura filamentosa – estrutura presente em grande parte das macroalgas castanhas) e pseudoparenquimatosos (constituídos por agregações de filamentos numerosos e ramificados colados entre si através de mucilagem os quais, em conjunto, formam o talo e não apresentam qualquer diferenciação celular interna – estrutura presente na maior parte das macroalgas vermelhas) (Figura 2) (Barsanti e Gualtieri 2006).

Existe hoje um conhecimento alargado relativamente ao facto de as algas possuírem estratégias nutricionais complexas, combinando fotoautotrofia e heterotrofia, referindo-se globalmente como mixotrofia. Dessa forma, referem-se quatro tipos principais de regimes nutricionais assumidos pelas algas (Barsanti e Gualtieri 2006):

- Heterotrofia obrigatória - Algas primariamente heterotróficas, mas capazes de se sustentar por fototrofia em caso de limitação no número de presas (*Gymnodium gracilentum*, Dinophyta).
- Fototrofia obrigatória - Primariamente fototróficas, mas que podem suplementar o desenvolvimento através de fagotrofia e/ou osmotrofia quando a luz solar é limitada (*Dinobryon divergens*, Heterokontophyta).
- Mixotrofia facultativa - Conseguem desenvolver-se equitativamente por fototrofia e heterotrofia (*Fragilidium subglobosum*, Dinophyta)
- Mixotrofia obrigatória - Primariamente fototróficas, embora a fagotrofia e/ou osmotrofia providenciem substâncias essenciais ao seu desenvolvimento (*Euglena gracilis*, Euglenophyta).

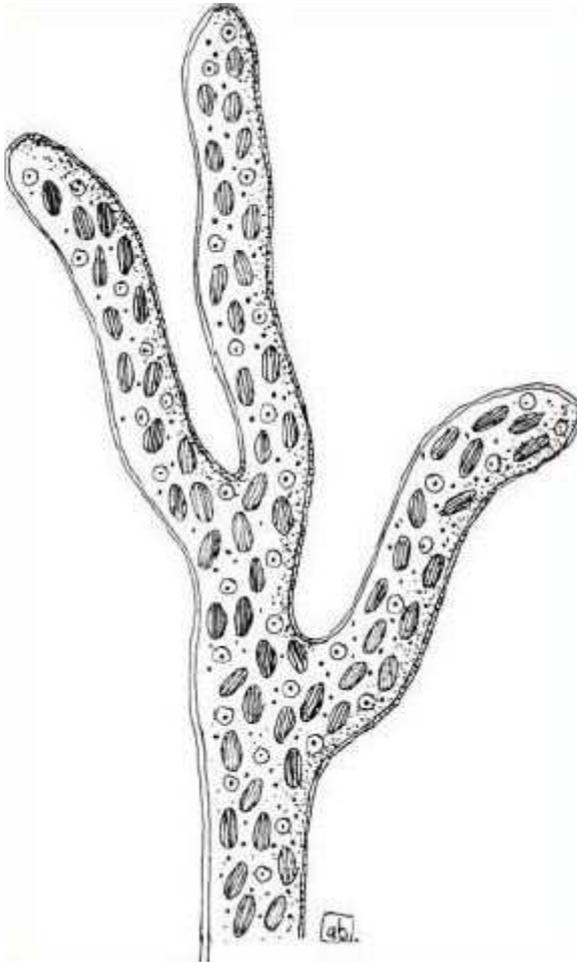


Figura 1 - Talo de tipo sifonado da espécie *Vaucheria sessilis* (Barsanti e Gualtieri 2006)

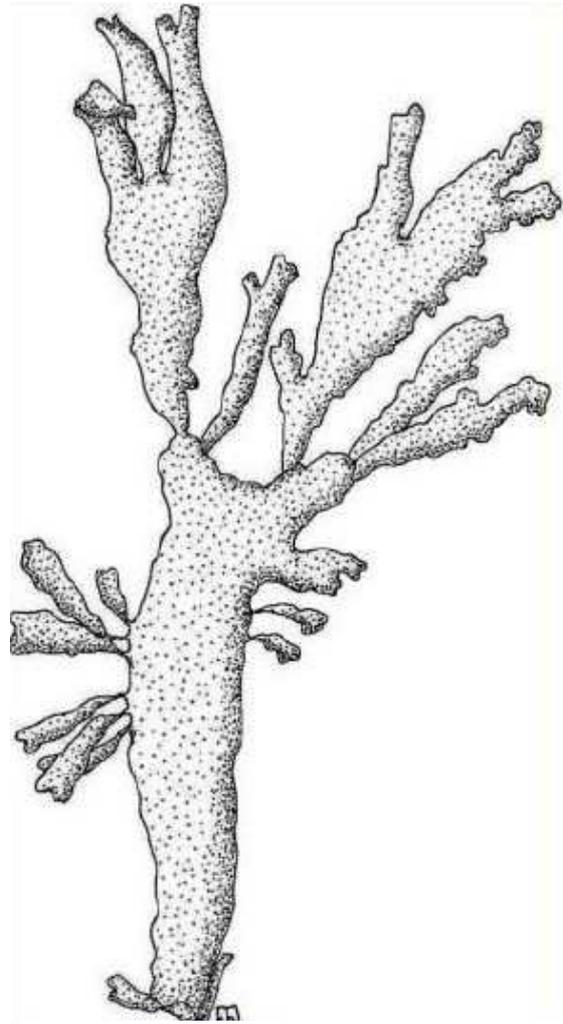


Figura 2 - Talo do tipo pseudoparenquimatoso da espécie *Palmaria palmata* (Barsanti e Gualtieri 2006)

Os ciclos de vida das macroalgas marinhas alternam regularmente entre diferentes fases de desenvolvimento (gerações) dependentes do comportamento reprodutor do organismo, ou seja, do tipo de célula reprodutora característica da fase do ciclo de vida correspondente, sendo gametófito a alga produtora de gâmetas e esporófito a alga produtora de esporos. As algas exibem 3 ciclos de vida diferentes com variações dentro de determinados grupos. As principais diferenças entre eles são o ponto em que a meiose ocorre e os tipos de células que o fenómeno produz e se existe um ou mais fases de vida livre dentro do ciclo de vida (Barsanti e Gualtieri 2006):

- Ciclo de vida haplobionte haplonte ou zigótico – caracterizado por possuir uma única fase vegetativa haplóide e onde a meiose ocorre após a germinação do zigoto (*Chlamydomonas*, do filo Chlorophyta).
- Ciclo de vida diplobionte ou gamético – caracterizado por possuir uma única fase vegetativa diplóide e onde a meiose dá origem a gâmetas haplóides (*Fucus*, do filo Heterokontophyta) (Figura 3).

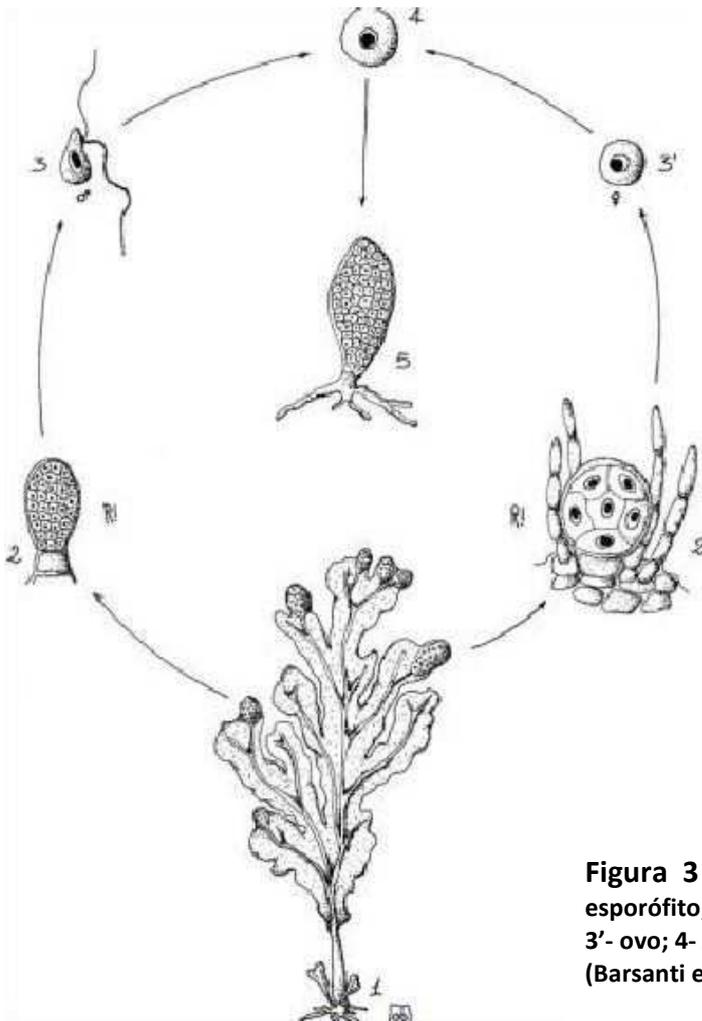


Figura 3 - Ciclo de vida do gênero *Fucus*: 1- esporófito; 2- anterídeo; 2'- oogónia; 3- esperma; 3'- ovo; 4- zigoto; 5- esporófito juvenil; R!- meiose (Barsanti e Gualtieri 2006)

- Ciclo de vida haplobionte diplonte ou de esporos – caracterizado pela presença da alternância entre duas fases diferentes constituídas por um gametófito haplóide e um esporófito diplóide, respectivamente, em que o gametófito produz gâmetas por mitose e o esporófito produz esporos por meiose. Estas alternâncias podem ser isomórficas (*Ulva*, Chlorophyta) ou heteromórficas,

com predominância da fase esporofítica (*Laminaria*, Heterokontophyta) e da fase gametofítica (*Porphyra*, Rhodophyta) (Figura 4).

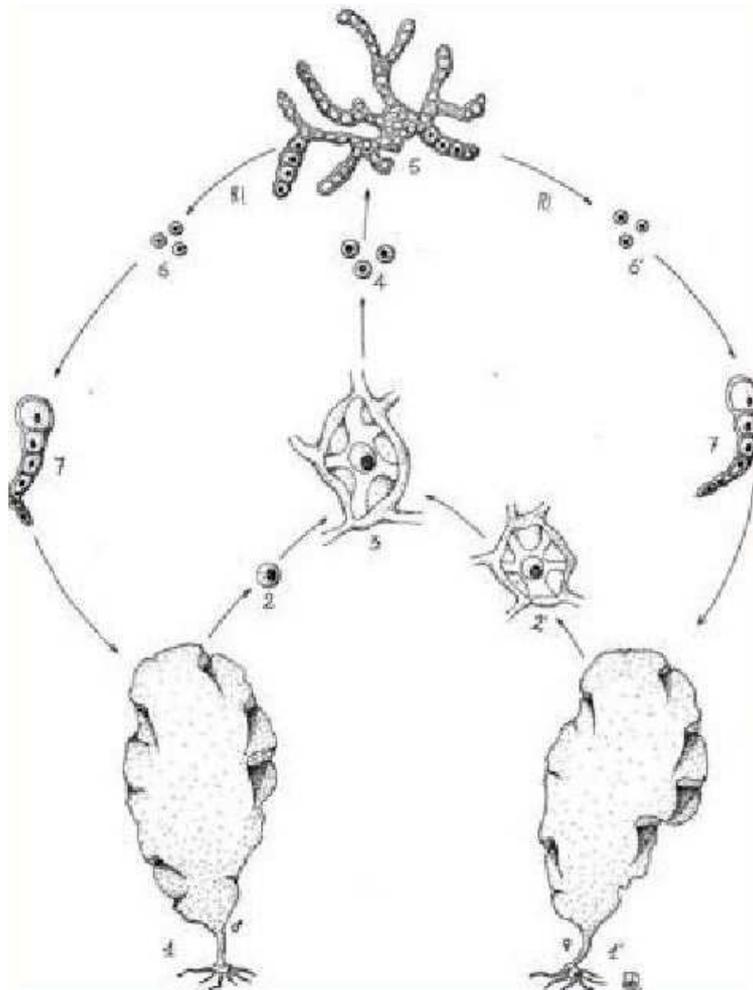


Figura 4 - Ciclo de vida do gênero *Porphyra*: 1- gametófito macho; 1'- gametófito fêmea; 2- esperma; 2' - ovo; 3- fertilização e zigoto; 4- esporos; 5- esporófito; 6- esporos macho; 6' - esporos fêmea; 7- gametófito macho juvenil e gametófito fêmea juvenil; R! - meiose (Barsanti e Gualtieri 2006)

A existência de diferentes fases reprodutoras no ciclo de vida de uma espécie em concreto acarreta uma série conveniente de vantagens (e respectivas desvantagens) que marcam a diferença dentro do respectivo habitat num determinado espaço de tempo. Enquanto que a fase vegetativa e assexuada assegura estabilidade a um genótipo adaptado intra-especificamente de uma geração para a próxima, providenciando um meio rápido e acessível para aumentar o número de indivíduos restringindo a variabilidade genética, a fase sexuada envolve plasmogamia (união de

células), cariogamia (união de núcleos), associação cromossoma/gene e meiose, resultando em recombinações genéticas, permitindo assim variação intra-específica mas a um custo energético alto dado o número de gâmetas formados que falham o cruzamento (Barsanti e Gualtieri 2006).

Existem diversos fenómenos e processos de reprodução assexuada e sexuada levados a cabo dentro das algas. Relativamente à reprodução vegetativa ou assexuada, os processos reprodutivos conhecidos são: a fissão binária ou bipartição celular, onde ocorre divisão do organismo-mãe em dois organismos iguais, a formação automática de colónias, a fragmentação, a ocorrência de estádios de repouso, nos quais se dá a produção de células com paredes celulares espessas (tais como hipnósporos, hipnozigos, estatosporos e aquinetas) quando sob exposição a condições desfavoráveis, e a formação de esporos (Barsanti e Gualtieri 2006). No âmbito do último processo referido, existem diferentes tipos de esporos: os zoósporos (esporos flagelados móveis), aplanósporos (esporos sem flagelo que iniciam o seu desenvolvimento dentro da parede da célula-mãe antes de serem libertados e que se podem tornar em zoósporos) e autósporos (esporos sem flagelo que se libertam a partir da ruptura da parede celular da célula-mãe, sendo impossível tornarem-se zoósporos). A reprodução assexuada das algas castanhas ocorre por meio de zoósporos ou aplanósporos imóveis (contidos em grupos de quatro num esporocisto em alguns géneros como *Dictyota*, formando tetraesporos). Em relação à reprodução sexuada nas algas marinhas, são possíveis diferentes tipos de combinações entre gâmetas. Na isogamia, os gâmetas são ambos móveis e indistinguíveis, enquanto que na heterogamia os gâmetas diferem nas suas dimensões. Dentro da heterogamia podem ocorrer dois géneros de combinações: anisogamia, onde ambos os gâmetas são móveis, mas um deles é mais pequeno (esperma) do que o outro (ovo) e a oogamia, no qual apenas um dos gâmetas é móvel (esperma) e se funde a um gâmeta imóvel de maiores dimensões (ovo) (Barsanti e Gualtieri 2006).

A delimitação e classificação dos diferentes filos das algas marinhas baseiam-se na pigmentação, natureza química do produto de reserva fotossintético, estruturação dos tilacóides e outras características relevantes dos cloroplastos, composição química e

estrutura das paredes celulares, número e organização dos flagelos (se presentes), ocorrência de quaisquer outras características de interesse e ciclos reprodutores (Barsanti e Gualtieri 2006). Em traços gerais, as macroalgas marinhas encontram-se taxonomicamente organizadas dentro de três filios principais: as macroalgas verdes (filio Chlorophyta), macroalgas castanhas (filio Heterokontophyta, Phaeophyceae – a única classe existente de macroalgas castanhas) e macroalgas vermelhas (filio Rhodophyta) (Braune e Guiry 2011). A distribuição e ocorrência de vários pigmentos fotossintéticos fornecem a principal característica para a criação dessa classificação simples e clara das macroalgas marinhas, permitindo uma avaliação mais sensível na determinação prévia dos organismos. A fucoxantina é um pigmento acessório presente em espécies de Heterokontophyta que lhes atribui a característica cor castanha, enquanto que a r-ficoeritrina e r-ficocianina são os pigmentos presentes em espécies de Rhodophyta responsáveis pela sua cor vermelha (Hunt 1978). Para além dessa dissemelhança superficial, as macroalgas marinhas vermelhas e castanhas constituem grupos de organismos com um vasto rol de divergências estruturais, fitoquímicas, moleculares, reprodutoras, entre outras.

Rhodophyta

A ausência de qualquer estágio flagelar e a presença de ficobiliproteínas acessórias organizadas em ficobilissomas são características únicas dentro deste filio (Barsanti e Gualtieri 2006). A clorofila a e d são as únicas clorofilas presentes. Relativamente aos cloroplastos, estes encontram-se envolvidos por uma dupla membrana e os tilacóides não se sobrepõem, mas situam-se equidistantes e solitários dentro do cloroplasto. Encontra-se também presente um tilacóide ao redor da periferia do cloroplasto, situado paralelamente à membrana cloroplástica interna. Para além disso, o DNA cloroplástico organiza-se num género de bolhas espalhadas por todo o cloroplasto (Barsanti e Gualtieri 2006). O polissacarídeo de reserva mais importante é o amido florídeo, um 1-4-glucano, que se localiza apenas no citoplasma, ao contrário do que acontece com os resíduos de amido produzidos pelos membros do filio Chlorophyta. A maior parte das Rhodophyta são fotoautotróficas e a sua citocinese é incompleta. A reprodução neste grupo apresenta-se normalmente sob um ciclo de vida haplobionte diplonte isomórfico ou heteromórfico, sendo rara a presença de um ciclo de vida

haplobionte (Barsanti e Gualtieri 2006). Nas algas vermelhas, os gâmetas e os esporos são imóveis (desprovidos de flagelos) e os seus ciclos de vida são bastante variáveis e apresentam processos bastante complexos.

Para além disso, as macroalgas vermelhas são representadas actualmente por mais de 9000 espécies conhecidas pertencentes a mais de 943 géneros (Algaebase, Guiry e Guiry 2012), sendo o tipo de macroalgas marinhas mais abundante.

Heterokontophyta

As algas deste grupo mostram uma maior preponderância para conter carotenóides na sua estrutura química ao invés de clorofilas, resultando numa tonalidade dourada no talo e não esverdeada como ocorre com a maioria dos outros filios de algas (Barsanti e Gualtieri 2006). As algas deste grupo contêm as clorofilas a, c1, c2 e c3, com a excepção dos indivíduos da classe Eustigmatophyceae que apenas possuem clorofila a. Os pigmentos acessórios principais são o b-caroteno, a fucoxantina e a vaucherixantina (Barsanti e Gualtieri 2006); os tilacóides encontram-se agrupados em grupos de três, denominados por lamelas – geralmente uma lamela percorre toda a periferia do cloroplasto, apenas ausente na classe Eustigmatophyceae. Os cloroplastos encontram-se envolvidos numa dupla membrana e por uma dobra do retículo endoplasmático. O DNA cloroplástico encontra-se integrado num nucleóide com forma anelada. O polissacarídeo de reserva principal é o crisolaminarin, um b-1,3-glucano, localizado dentro do citoplasma de uns vacúolos especiais (Barsanti e Gualtieri 2006). As macroalgas deste filo podem desenvolver-se fotoautotroficamente, mas podem também combinar diferentes estratégias de trofismo tais como heterotrofia. Para além disso, a reprodução dentro deste grupo apresenta-se sob um ciclo de vida haplobionte haplonte (Chrysophyceae), diplobionte (Bacillariophyceae) ou haplobionte diplonte (Phaeophyceae) (Barsanti e Gualtieri 2006). Relativamente aos tipos de alternância das diferentes fases do ciclo de vida, as algas castanhas apresentam casos de isogamia (*Ectocarpus*), anisogamia (*Cutleria*) e oogamia (*Dictyota*, *Fucus*), sendo mais característica das algas castanhas a alternância heteromórfica de gerações, entre as quais ocorrem grandes variações morfológicas e anatómicas, tais como reduções dos esporófitos (*Cutleria*) ou gametófitos (*Laminaria*) (Braune e Guiry 2011).

Para além disso, as macroalgas castanhas (Phaeophyceae) são representadas por mais de 1500 espécies conhecidas de 250 géneros (Graham e Wilcox 2000) e a sua identificação morfológica é difícil e existem numerosas incertezas taxonómicas na literatura actual (Sears 2002; Gabrielson *et al.* 2006).

1.4. Potencial farmacológico e alimentar

O interesse nos organismos marinhos como fonte potencial e promissora de agentes farmacológicos e/ou alimentares tem aumentado ao longo dos anos (Lindequist e Schweder 2001; Newman *et al.* 2003; Mayer e Hamann 2005; Blunt *et al.* 2008; Jiao *et al.* 2011). O mercado de procura de fontes naturais de antioxidantes e de outros compostos de natureza farmacêutica tem aumentado por parte dos consumidores devido à preocupação inerente aos possíveis efeitos tóxicos de antioxidantes sintéticos (Zubia *et al.* 2007) e ao conhecimento geral de que o consumo regular de fitoquímicos distintos podem fornecer uma prevenção antioxidante relevante contra várias doenças (Ribeiro *et al.* 2007). Uma das maiores limitações quanto à criação de produtos naturais a partir de macroalgas marinhas é a necessidade de grandes quantidades de material biológico, o que pode causar um impacto ecológico negativo, exceptuando os casos em que o material biológico em questão seja proveniente de espécies invasoras que constituam um grave problema para a biodiversidade marinha de determinados habitats (Plouguerné *et al.* 2010).

Apesar de as macroalgas marinhas serem uma das fontes mais ricas em produtos naturais quimicamente diversos (Mayer *et al.* 2009), o seu potencial absoluto em diversas vertentes permanece amplamente inexplorado.

A ausência de dano oxidativo nos compostos estruturais das macroalgas (como ácidos gordos polinsaturados) e a sua estabilidade à oxidação durante o armazenamento sugere que as suas células possuem defesas antioxidantes (Zubia *et al.* 2007). As macroalgas são assim uma fonte de obtenção viável e economicamente acessível de

compostos bioactivos tais como carotenóides, fenóis (flavonóides e cumarinas), tocoferóis, compostos azotados (alcalóides, derivados clorofílicos, aminoácidos e aminas), carotenóides, ácido ascórbico, glutaniona, ácido úrico, vitaminas antioxidantes, halogénios, metanos, cetonas, acetatos e acrilatos (McConnell e Fenical 1977; Woolard *et al.* 1979; Kim *et al.* 2005; Maeda *et al.* 2008; Celikler *et al.* 2009). Determinadas macroalgas marinhas podem ser fontes naturais de compostos tão específicos como ácido elágico (Shimogaki *et al.* 2000), oxiresveratrol (Kim *et al.* 2002) e cloroforina (Shimizu *et al.* 1998) - inibidores da enzima tirosinase - úteis no combate a doenças dermatológicas, nomeadamente as associadas a hiperpigmentação ou a despigmentação (Cabanes *et al.* 1994; Shiino *et al.* 2001) e à neurotoxicidade pela dopamina e neurodegeneração associadas à doença de Parkinson (Xu *et al.* 1997).

A bioactividade de certos metabolitos secundários presentes em macroalgas pode ser exemplificada com o grupo dos diterpenos, que em diversos estudos com algas castanhas revelam actividade algicida (Kim *et al.* 2006), antibacteriana (Finer *et al.* 1979; Amico *et al.* 1980; Enoki *et al.* 1983; Tanaka e Higa 1984; Ochi *et al.* 1986), antifúngica (Tringali *et al.* 1986), antiviral (Pereira *et al.* 2004; Siamopoulou *et al.* 2004), citotóxica (Alvarado e Gerwick 1985; Ishitsuka *et al.* 1988; Duran *et al.* 1997; Jongaramruong e Kongkam 2007), pesticida (Tanaka e Higa 1984; Hardt *et al.* 1996; Pereira *et al.* 2000; Barbosa *et al.* 2004) ou *antifouling* (Schmitt *et al.* 1998; Barbosa *et al.* 2007). Para além dos diterpenos, as algas castanhas também possuem florotaninos, um subgrupo de compostos fenólicos existentes apenas na classe Phaeophyceae, onde podem constituir mais de 25% do peso seco correspondente (Targett *et al.* 1992; Van Alstyne *et al.* 1999), apenas ultrapassado pelos 40% de peso seco correspondentes às paredes celulares das algas castanhas, as quais são principalmente constituídas por polissacáridos: ácido algínico, alginatos (polissacáridos carboxilados, sais de ácido algínico) e fucanas (polissacáridos sulfatados) (Mabeu e Kloareg 1987; van den Hoek *et al.* 1995). Alguns florotaninos actuam como defesas químicas contra a herbivoria (Steinberg 1988; Targett e Arnold 1998; Arnold e Targett 2000; Pavia e Toth 2000a) e como agentes *antifouling* (Sieburth e Conover 1965; Wikström e Pavia 2004).

As concentrações presentes de florotaninos apresentam plasticidade fenotípica de acordo com os parâmetros ambientais, tais como salinidade, disponibilidade de luz e nutrientes, irradiação ultravioleta e intensidade de herbivoria (Yates e Peckol 1993; Peckol *et al.* 1996; Pavia *et al.* 1997; Pavia e Toth 2000b; Honkanen *et al.* 2002; Swanson e Druehl 2002). Como agentes contra a herbivoria, os florotaninos possuem um papel fulcral na defesa global das macroalgas marinhas, sendo moléculas grandes e difíceis de purificar (Ragan e Glombitza 1986) ou de quantificar com precisão (Appel *et al.* 2001), raramente são testadas directamente e isoladamente como defesas contra a herbivoria (Steinberg 1988; Clausen *et al.* 1990; Steinberg e van Altena 1992). Para além dos florotaninos e outros compostos *antifouling*, os pigmentos fotossintéticos, como a fucoxantina, podem assumir um papel importante na defesa química da superfície de algas castanhas, por acção de mecanismos de libertação que levam ao aumento da concentração do metabolito na superfície do talo, constituindo assim uma estratégia de defesa das macroalgas contra a colonização bacteriana até então desconhecida (Saha *et al.* 2011).

Em habitats com herbivoria intensa (como recifes de coral), as macroalgas são mais susceptíveis à eliminação se não possuírem as respectivas defesas (Hay 1996; Cronin 2001), não sendo surpresa o facto de grande parte das espécies de algas tropicais possuírem defesas anti-herbivoria (Hay e Fenical 1988; Hay 1996). Estudos teóricos sugerem que as plantas e algas apresentam maioritariamente defesas permanentes ao invés de defesas por indução quando a herbivoria é previsível (Adler e Karban 1994) ou intensa (Karban *et al.* 1999). Por outro lado, a defesa química constitutiva apresenta desvantagens selectivas, tais como a adaptação dos organismos invasores às defesas (Agrawal e Karban 1999), o risco de autotoxicidade (Agrawal e Karban 1999) e os custos energéticos altos associados à manutenção da defesa (Karban 1993; Agrawal 1998; Baldwin 1998). No entanto, em caso de habitats com herbivoria imprevisível, as algas podem otimizar a defesa anti-herbivoria através da sua activação após indução em vez de a expressar permanentemente (Harvell e Tollrian 1999).

Actualmente, não existe uma noção clara acerca do quão taxonomicamente dispersas as defesas químicas por indução se encontram no mundo das algas. Foi verificada

recentemente a presença de defesas anti-herbivoria por indução nas algas vermelhas *Pterocladia capillacea* (Weidner *et al.* 2004) e *Hypnea pannosa* (Ceh *et al.* 2005), sugerindo que as suas ocorrências não se restringiam às algas castanhas ou a climas temperados, como se pensava no passado. Para além disso, indica a necessidade de um estudo mais aprofundado quanto à presença de defesas anti-herbivoria por indução em algas numa maior amplitude taxonómica e geográfica.

Estudos mostram que cada *taxon* de algas marinhas possui a sua própria sazonalidade relativamente à produção de compostos antibióticos (Chester e Stott 1956; Sreenivasa Rao e Parekh 1981; Padmakumar e Ayyakkannu 1997), atingindo o pico de produção geralmente na época de crescimento activo do talo. O conteúdo de compostos antibióticos pode também variar consoante a zona do talo (Conover e Sieburth 1964; Hornsey e Hide 1976), o estágio reprodutivo (Moreau *et al.* 1984; Hornsey e Hide 1985) e locais geográficos (Vidyavathi e Sridhar 1991). Sendo assim, a variação nas concentrações de metabolitos secundários pode ocorrer entre indivíduos da mesma população (Paul e Van Alstyne 1988a,b; Puglisi e Paul 1997; Matlock *et al.* 1999) ou entre populações da mesma espécie em habitats diferentes (Paul e Fenical 1986, 1987; Paul *et al.* 1987; Paul e Van Alstyne 1988a). Para além da noção presente de que o total conhecimento destes detalhes sazonais, ecológicos, anatómicos e geográficos para cada *taxon* seriam extremamente úteis para o difícil estudo da taxonomia de macroalgas marinhas, outros estudos defendem que existem metabolitos secundários que podem representar um papel importante como marcadores taxonómicos dadas as suas diferenças nas estruturas químicas em diferentes espécies do mesmo género, como é o caso dos diterpenos presentes em espécies do género *Dictyota* (Teixeira e Kelecom 1988; Teixeira *et al.* 1990; De-Paula *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2001; Cavalcanti *et al.* 2006; De-Paula *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2007).

1.5. Factores económicos, de produção e consumo humano

Registos da Antiguidade relatam que o Homem colecta macroalgas marinhas para fins alimentícios desde o ano 500AC na China e cerca de mil anos mais tarde na Europa (Barsanti e Gualtieri 2006). Apesar de a presença de compostos de interesse

farmacológico em algas marinhas ser reconhecida desde o final do século XIX (Rath e Adhikary 2007) e a utilização de extractos de algas como antissépticos estar documentado desde 1937 (Emerson e Taft 1945), desde tempos antigos que os japoneses e chineses utilizam extractos de algas para tratamento de infecções parasitárias, assim como de outros problemas médicos (Moo-Puc *et al.* 2008).

Actualmente, no Japão, mais de 70 espécies de algas marinhas são consumidas e existem extensos cultivos de géneros como *Porphyra*, *Undaria* e *Laminaria*, constituindo 10% do consumo alimentar humano dentro do Japão (Braune e Guiry 2011). Devido ao facto de possuírem um grande número de hidratos de carbono não-assimiláveis pelo ser humano, as algas possuem um valor calórico muito baixo, tornando-as um alimento essencial na dieta japonesa (Einav 2004). Ainda dentro da indústria alimentar, o fabrico de produtos gelificados com alta viscosidade, como o agár e carragena extraídos de algas vermelhas e o alginato extraído de algas castanhas, possibilita a sua inclusão como estabilizantes, espessantes e gelificantes numa vasta gama de produtos alimentares pré-preparados. Para além disso, a utilização desses produtos é essencial em áreas científicas como a microbiologia, medicina, engenharia química, entre outras (Braune e Guiry 2011). Outros biocompostos de interesse presentes nas macroalgas marinhas são utilizados no fabrico de produtos farmacêuticos, produtos de higiene, aditivos alimentares animais, fertilizantes e cosméticos (Barsanti e Gualtieri 2006).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a cultura de plantas aquáticas tem resultado num crescimento consistente desde 1970, com uma taxa média anual de crescimento de 7,7% (FAO 2010), revelando o papel preponderante que a evolução da prática de aquacultura teve ao longo das décadas (Figura 5). Segundo a FAO, entre 1981 e 2002 a produção anual total mundial de macroalgas subiu de 3 para quase 13 milhões de toneladas (em peso húmido). Em 2008, a aquacultura produziu 15,8 milhões de toneladas (peso húmido) de plantas aquáticas, num valor total estimado de 7,4 biliões de dólares americanos. A produção é praticamente dominada pelo cultivo de macroalgas marinhas (99,6% em quantidade e 99,3% em valor em 2008) (FAO 2010).

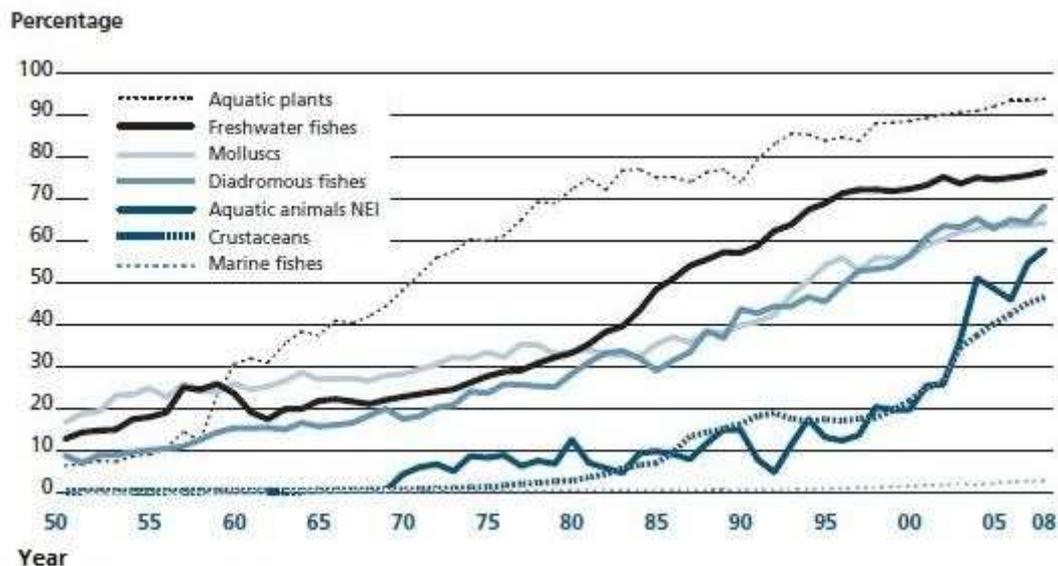


Figura 5 - Contribuição da prática de aquacultura para a produção global dos principais organismos marinhos, incluindo as plantas aquáticas (99,6% constituídas por macroalgas marinhas no período de 2008), de 1950 até 2008 (FAO 2010)

Neste momento, a actividade comercial de macroalgas tem lugar em 42 países, os quais satisfazem o crescente mercado da procura registado em países como a Irlanda, onde se mostra um renovado interesse na recuperação de antigas dietas tradicionais (Barsanti e Gualtieri 2006). Os países no Este e Sudeste da Ásia dominam a produção de algas, destacando-se a China com 62,8% da produção mundial de macroalgas em quantidade. Outros grandes produtores mundiais de macroalgas são a Indonésia (13,7%), as Filipinas (10,6%), a República da Coreia (5,9%), o Japão (2,9%) e a República Democrática da Coreia (2,8%) (FAO 2010).

Apesar de grande parte da produção se destinar à indústria alimentar, existe um mercado cada vez mais abrangente, abrindo caminho a um maior fluxo de capital através de importações e exportações e, conseqüentemente, maiores lucros. Relativamente a valores monetários, o Japão mantém o segundo lugar como o produtor mais lucrativo, em grande parte devido à cultura de Nori (*Porphyra* sp.) (FAO 2010), a mais lucrativa na indústria de cultivo de macroalgas, com um volume de negócios correspondente a mais de 2 biliões de dólares americanos por ano. Os

registos altos de turnover de capital são possíveis devido em parte aos valores da procura, tendo como exemplo as importações de macroalgas por parte União Europeia em 2002, que atingiram as 70000 toneladas (Barsanti e Gualtieri 2006).

O Chile é o maior produtor de macroalgas fora da Ásia, produzindo 21700 toneladas em 2008, seguido por países como Tanzânia, África do Sul e Madagáscar, os quais juntos produziram 14700 toneladas em 2008, com cultivos fortes de *Euchema*. Em 2008, a maior produção por espécie de alga registou-se com a *Laminaria japonica* (4,8 milhões de toneladas), seguida da *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* sp. (3,8 milhões de toneladas), *Undaria pinnatifida* (1,8 milhões de toneladas), *Gracilaria* sp. (1,4 milhões de toneladas) e *Porphyra* sp. (1,4 milhões de toneladas) (FAO 2010).

Apesar de as algas frescas ou secas serem consumidas em larga escala, particularmente por populações costeiras de vários países, elas são consideradas um recurso sub-explorado (Fayaz *et al.* 2005).

Apesar da abundância de algas marinhas comestíveis ao longo da costa, as algas não fazem parte da dieta tradicional em Portugal. As macroalgas têm sido maioritariamente utilizadas em Portugal como fertilizantes, especialmente em campos de cultura próximos da costa (Palminha 1971). Algumas comunidades do arquipélago dos Açores utilizam certas espécies de algas para fins gastronómicos: a *Osmundea pinnatifida* e *Laurencia viridis* como especiarias conhecidas como “erva malagueta” (Palminha 1971; Neto *et al.* 2005), a *Fucus spiralis* como aperitivo e a *Porphyra* sp. como ingrediente de sopas, omeletes ou tortas (Neto *et al.* 2005).

2. Objectivos

Este estudo teve por objectivo global a implementação de um sistema robusto de identificação molecular de macroalgas marinhas Portuguesas com vista à despistagem de compostos fitoquímicos em espécies rigorosamente identificadas, para sua utilização em potenciais aplicações biotecnológicas e farmacológicas.

Os objectivos específicos deste estudo são:

- Contribuir para a compilação de uma biblioteca de códigos de barras de DNA (DNA *barcodes*) para identificação de macroalgas marinhas castanhas e vermelhas reportadas para Portugal continental e ilhas.
- Aferir a robustez do sistema de identificação em construção, analisando a capacidade de discriminação de espécies das sequências do gene da sub-unidade I do citocromo oxidase, e verificando a congruência taxonómica destas com sequências obtidas partir de bases de dados públicas.
- Avaliar os perfis fitoquímicos das espécies de algas recolhidas para identificação dos diferentes compostos químicos.

Estes objectivos contribuirão não só para reforçar a importância do DNA *barcoding* como ferramenta taxonómica útil no discernimento e delimitação específica entre diferentes grupos taxonómicos, referentes a todas as macroalgas vermelhas e castanhas de Portugal continental e ilhas com DNA *barcodes* conhecidos, como também para identificar compostos fitoquímicos de interesse presentes em espécies geralmente pouco estudadas e viáveis para cultivo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Procedimento Global

Na figura 6 encontram-se esquematizadas as etapas gerais do processo típico de criação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes*, ao qual também está associado o estudo fitoquímico subsequente. O processo inicia-se com a recolha dos espécimes e a sua identificação taxonómica com base nos caracteres morfológicos, inserção dos dados da colheita (por exemplo, coordenadas do local da colheita, data da recolha e respectiva profundidade), processamento e conservação das amostras. De seguida procede-se à amostragem de tecidos dos espécimes, dos quais se destaca uma pequena porção para fins de análise molecular, sobrando o restante tecido para as análises químicas.

As análises moleculares com vista à obtenção das sequências dos DNA *barcodes* iniciaram-se com a extracção de DNA genómico total de cada espécime, seguida da amplificação da região alvo através de reacção em cadeia de polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) com recurso a primers específicos. Após sucesso na amplificação, procede-se à purificação e sequenciação dos produtos de PCR, seguida da edição e alinhamento das sequências conseguidas. De forma a despistar eventuais contaminações ou outras falhas operacionais, procedeu-se à verificação da genuinidade das sequências obtidas (i.e. provenientes de COI de macroalgas) através da submissão a bases de dados públicas (por exemplo BOLD e GenBank) e comparação com sequências homólogas aí depositadas. Por fim, realizou-se uma série de análises dos dados em conjunto com as sequências retiradas das bases de dados públicas (GenBank), por forma a verificar a capacidade global de discriminação de espécies dos DNA *barcodes*.

Relativamente ao procedimento das análises fitoquímicas, os tecidos de todas as espécies de macroalgas foram processados de forma a ficarem preparados para as diversas extracções posteriores com recursos a diferentes solventes. Após a obtenção dos extractos a concentrações pré-determinadas, seguiu-se a respectiva obtenção e

análise dos perfis fitoquímicos através das técnicas de *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e *Gas Chromatography* (GC).

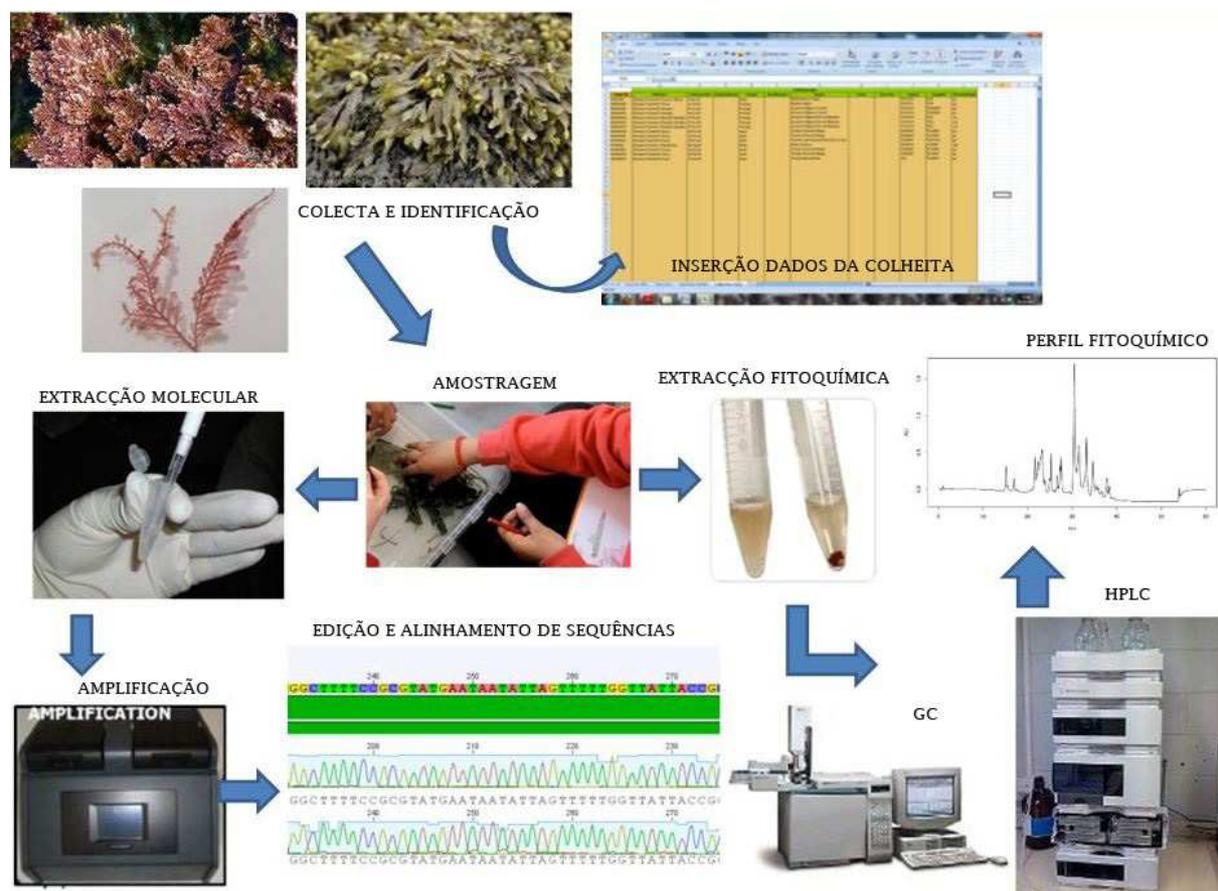


Figura 6 - Representação esquemática do procedimento global seguido para a criação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* de macroalgas marinhas com estudo fitoquímico associado às espécies em estudo

3.2. Colheita e Processamento de Amostras

Os espécimes colectados pertencem aos filos Rhodophyta (algas vermelhas) e Heterokontophyta (algas castanhas), classes Florideophyceae e Phaeophyceae, respectivamente, sendo todos eles provenientes da ilha de São Miguel, no arquipélago dos Açores, mais especificamente dos seguintes locais: Praia de São Vicente (intertidal), Praia das Calhetas (intertidal), Praia da Caloura (subtidal -5 a -9m), Praia das Feteiras (subtidal -15 a -19m), Capelas (subtidal -16 a -19m) (para análise fitoquímica) e Praia dos Mosteiros (intertidal) (para análise fitoquímica) (Tabela 1). A identificação das espécies recolhidas foi efectuada *in situ*, restringindo a colecta a

espécies de macroalgas relativamente fáceis de identificar macroscopicamente, eliminando deste modo a necessidade de recorrer a observações à lupa e microscópio, ou a uma análise molecular antecipada. Após a colheita, as amostras foram fotografadas, como registo para futura verificação taxonómica caso seja necessário, e limpas com recurso a pincel e bisturi de forma a eliminar quaisquer resíduos contaminantes e organismos epifíticos e epizóicos que pudessem adulterar os resultados futuros. Após destacar uma porção entre 4 a 7mm de cada espécime para as análises moleculares, esta foi colocada em sílica para garantir uma total desidratação e assim conservar a integridade molecular da amostra, sendo depois armazenada em microtubos *ependorf*. Todo o material biológico restante de cada espécime foi colocado no congelador para futura liofilização.

Tabela 1 - Lista das espécies da flora açoriana, o seu local de origem e o número de espécimes sobre os quais se efectuaram os estudos moleculares e obtiveram DNA *barcodes*; código identificativo atribuído a cada uma das amostras

Espécies	Localização (número de espécimes)	N.º Amostra
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile)	Caloura, Açores (2)	MD0002256
Trevisan de Saint-Léon		MD0002259
<i>Callithamnion granulatum</i> (Ducluzeau)	São Vicente, Açores (2)	MD0002242
C.Agardh		MD0002243
<i>Cladostephus spongiosus</i> (Hudson)	Calhetas, Açores (1)	MD0002253
C.Agardh		
<i>Corallina caespitosa</i> R.H.Walker,	São Vicente, Açores (2)	MD0002238
J.Brodie e L.M.Irvine		MD0002244
<i>Petalonia binghamiae</i> (J.Agardh)	São Vicente, Açores (2)	MD0002237
K.L.Vinogradova		MD0002239
<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	Calhetas, Açores (2)	MD0002247
		MD0002248
<i>Gelidium microdon</i> Kützing	São Vicente, Açores (2)	MD0002240
		MD0002241
<i>Halopteris scoparia</i> (Linnaeus)	Calhetas, Açores (2)	MD0002245
Sauvageau		MD0002246
<i>Plocamium cartilagineum</i> (Linnaeus)	Calhetas, Açores (2)	MD0002235

P.S.Dixon		MD0002250
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin)	São Vicente, Açores (1)	MD0002234
Santelices e Hommersand	Calhetas, Açores (1)	MD0002249
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux)		MD0002261
Montagne	Feteiras, Açores (2)	MD0002262

Toda a informação relativa aos detalhes da colheita e processamento de cada espécime, tal como as coordenadas geográficas dos locais de colheita ou código de identificação das amostras está inserida numa tabela padrão (Anexo/Imagem I1) para futura referência em estudos comparativos e como ferramenta padronizada de consulta universal.

3.3. Maceração do tecido algal

Na fase de amostragem de tecido para posterior extracção de DNA genómico, é muito importante estabelecer um ambiente estéril e com ausência de contacto entre as diferentes amostras, de forma a evitar a contaminação cruzada entre amostras que pode comprometer a validade dos resultados. A amostragem de tecido efectuou-se sempre na proximidade da chama de um bico de Bunsen e com o auxílio de material esterilizado, com especial atenção à esterilização das pinças e bisturis com álcool a 96% entre a manipulação de cada espécime. Tendo em conta estes factores, o tecido de cada espécime foi retirado do microtubo *ependorf* (1,5ml) e posteriormente transferida para um novo microtubo previamente identificado. Como se tratam de tecidos com paredes celulares, o passo seguinte consistiu em macerar os tecidos até à sua pulverização completa com o auxílio de azoto líquido. Após a maceração total, uma pequena porção de material algal macerado ($\pm 1\mu\text{l}$) foi colocado dentro de um microtubo, ficando preparado para a extracção de DNA.

3.4. Extracção de DNA

Para que a extracção de DNA se tornasse eficaz no caso das macroalgas castanhas foi necessária uma lavagem prévia da amostra com acetona, de modo a remover alguns compostos inibidores de PCR (McDevit e Saunders 2009). Para isso, colocaram-se as amostras em contacto com acetona pura à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 15000g durante alguns minutos e eliminação do sobrenadante. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes, permitindo a evaporação da acetona à temperatura ambiente após a última lavagem. Seguiu-se depois a extracção do DNA genómico total com recurso ao kit de extracção E.Z.N.A seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante, nomeadamente procedendo à digestão dos tecidos com 25µl de Proteinase K a 70°C durante 4 horas.

3.5. Amplificação

A amplificação de fragmentos de 658 pb do gene mitocondrial COI foi efectuada com recurso a dois pares de primers: o par GazF2 (5'-CCAACCAAYAAAGATATWGGTAC) (Saunders 2005) e GazR2 (5'-GGATGACCAAARAACCAAAA) (Lane *et al.* 2007) e o par LoboF1 e LoboR1 (Lobo *et al.* não publicados). As amplificações foram realizadas a partir de dois protocolos de preparação de soluções diferentes (volumes aconselhados segundo as instruções do kit de extracção E.Z.N.A), tendo como volume total de reacção 25µl e contendo 2µl de extracto de DNA (DNA *template*) na concentração original ou diluído a diferentes concentrações (1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) (Tabela 2).

Tabela 2 – Volumes unitários dos reagentes constituintes das misturas de reacção de PCR para os dois pares de primers distintos utilizados neste estudo

Reagentes	Volumes unitários (para GazF2/GazR2) (μ l)	Volumes unitários (para LoboF1/LoboR1) (μ l)
Água estéril	17,24	14,375
10x Buffer	2,5	2,5
MgCl ₂	2,5	2,5
dNTPs	0,48	0,5
10 μ M Primer Fw	0,08	1,5
10 μ M Primer Rev	0,08	1,5
Taq Polimerase	0,12	0,125
DNA template	2	2

Para além da preparação da mistura de reacção para as amostras de DNA em estudo, incluiu-se um controlo positivo (amostra de amplificação garantida anteriormente para cada par de primers) e um controlo negativo (sem adição de extracto de DNA à mistura de reacção). As reacções de PCR foram realizadas num termociclador VWR Doppio (VWR International, Pennsylvania, USA) de acordo com os ciclos de temperatura apresentados na Tabela 3 para os pares de primers GazF2/GazR2 e LoboF1/LoboR1.

Tabela 3 – Ciclos de temperatura e respectivas durações nas diferentes etapas de PCR para os pares de primers GazF2/GazR2 e LoboF1/LoboR1

Primers	GazF2/GazR2		LoboF1/LoboR1	
Condições PCR Etapas PCR	Temperatura (°C) / Tempo (minutos)	Nº de ciclos	Temperatura (°C) / Tempo (minutos)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 / 4	1	94 / 1	1
Ciclos de desnaturação, hibridização e extensão	94 / 1 50 / 0,5 72 / 1	38	94 / 0,5 45 / 1,5 72 / 1	5
			94 / 0,5 54 / 1,5 72 / 1	45
Extensão final	72 / 7	1	72 / 5	1
Armazenamento	4 / ∞	1	4 / ∞	1

Os produtos de PCR foram submetidos a electroforese (75mV) em gel de agarose a 1% e tampão de corrida (TAE - Tris-Acetato-Ácido etilenodiamino tetra-acético) usando 1% *GelRed* (*GelRed*, Biotium Incorporate, California, USA) como método de coloração dos ácidos nucleicos. No final da electroforese o gel foi fotografado num transiluminador UV VWR (VWR International, Pennsylvania, USA) para verificação do sucesso da amplificação (Figura 7).

3.6. Purificação e sequenciação

Os produtos de PCR que revelaram bandas de DNA nítidas e definidas foram seleccionados para purificação, procedimento que visa reduzir ao máximo o volume de pequenos oligonucleotídeos (< 30 pb) e nucleotídeos não incorporados durante a reacção de PCR de forma a obter um produto melhorado para uma sequenciação mais eficaz. O método utilizado foi o de purificação por propanol, que consiste em lavagens sucessivas do produto em propanol a altas centrifugações e com temperatura definida (4°C). Sempre que foi necessário armazenar os produtos purificados, os mesmos foram colocados a -20°C. Após o processo de purificação e conservação a 4°C, as amostras foram enviadas para a empresa StabVida Ltd.^a (Oeiras, Portugal) para sequenciação bidireccional.

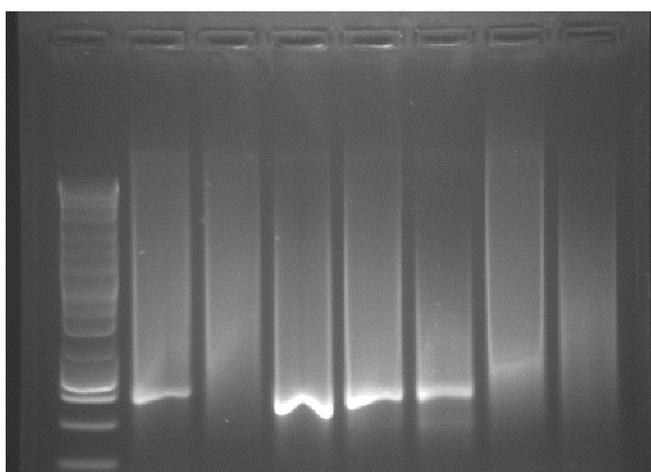


Figura 7 – Exemplo de gel de verificação com sucesso na amplificação dos DNA *barcodes*. Podemos verificar (da esquerda para a direita) a presença do DNA *ladder* no 1º poço, do controlo positivo no 2º poço, dos produtos de PCR do 3º ao 7º poço (amplificação sem sucesso apenas no 3º poço) e do controlo negativo no último poço. Imagem de um gel de agarose a 1% corado por meio de *GelRed* e fotografado sob radiação ultravioleta

3.7. Compilação, edição e alinhamento de sequências

De forma a cumprir o objectivo relativo à compilação de uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* de espécies de macroalgas vermelhas e castanhas reportadas para a flora marinha Portuguesa, foi efectuada a consulta de diversas fontes bibliográficas (De Mesquita Rodrigues 1963; André 1970; Leving 1974; Gil-Rodriguez e Afonso-Carillo 1980; Nizamuddin 1981; Audiffred e Weisscher 1984; Price *et al.* 1986; Neto 1994; Tittley e Neto 1994; Ribera *et al.* 1996; Parente *et al.* 2000; Neto *et al.* 2001; Cremades *et al.* 2002; Haroun *et al.* 2002; Garreta *et al.* 2002; Araújo *et al.* 2003; Parente *et al.* 2003; Pereira e Mesquita 2003; Toste *et al.* 2003; John *et al.* 2004; De Clerck *et al.* 2005; Rueness 2005; Rull Lluch *et al.* 2005; Tittley e Neto 2005; Billard *et al.* 2006; Valera-Alvarez *et al.* 2006; Zuccarello *et al.* 2006; Perrin *et al.* 2007; Eugelen *et al.* 2008; Araújo *et al.* 2009; Cairrão *et al.* 2009; Rodriguez-Prieto e Hommersand 2009; Schneider *et al.* 2010; Teasdale *et al.* 2009; Tittley *et al.* 2009; Abreu *et al.* 2011; Canovas *et al.* 2011; Lopes *et al.* 2011) e bases de dados *online* relativas a essa temática. Foram utilizadas as bases de dados *online* MACOI (Pereira *et al.* 2008) e Algaebase (Guiry e Guiry 2012), disponibilizando esta última informação acerca da distribuição geográfica das várias espécies, classificação taxonómica, sinónimas, entre outros aspectos. Através do cruzamento de dados entre as fontes bibliográficas e as bases de dados, foi possível especificar o número total de espécies de macroalgas vermelhas e castanhas com ocorrência reportada para Portugal. Subsequentemente, pesquisaram-se sequências COI publicadas de espécies reportadas para Portugal, independentemente da origem geográfica do espécime sequenciado, recorrendo ao portal BOLD (permitindo simultaneamente a avaliação da qualidade das sequências) e GenBank, tornando possível a percepção quantitativa e qualitativa do panorama global actual relativo à identificação molecular através de DNA *barcodes* de espécies de macroalgas vermelhas e castanhas reportadas para a flora marinha Portuguesa (Anexo/Tabela T1).

A edição e alinhamento das sequências foram executados com o programa Geneious 4.8.5 (Biomatters, NZL), que permite efectuar o emparelhamento simultâneo de sequências bidireccionais de vários espécimes, bem como editar facilmente as

sequências com recurso a cromatogramas com índices percentuais de qualidade, e detectar incongruências na complementaridade entre as sequências *forward* e *reverse*.

A edição e alinhamento de sequências obedeceu às etapas seguintes, por forma a eliminar ambiguidades e garantir a qualidade e rigor do alinhamento final:

1. Observação cuidadosa dos cromatogramas em toda a sua extensão de forma a eliminar as extremidades não legíveis da sequência e a detectar bases ambíguas (Ns) e/ou eventuais picos mal definidos.
2. Alinhamento das sequências *forward* e *reverse* de cada espécime, utilizando o reverso complementar da sequência *reverse*. Havendo boa concordância, converter as duas sequências numa sequência consenso a utilizar no alinhamento final. No caso de ocorrência de ambiguidades, procede-se à tentativa da sua resolução através de nova observação e comparação de cromatogramas.
3. Eliminação das extremidades correspondentes à hibridização dos primers *forward* e *reverse*.
4. Pesquisa de sequências similares na base de dados BOLD com o objectivo de despistar eventuais contaminações com epífitos ou DNA de outro organismo no processo de amplificação e sequenciação e assim obter uma primeira confirmação, ainda que preliminar, da genuidade da sequência.
5. Uma vez obtidas sequências editadas para todos os espécimes, realizar um alinhamento múltiplo automático através do método ClustalW (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).
6. Verificação da congruência do alinhamento, nomeadamente pela detecção de eventuais inserções ou deleções (sabendo-se à partida que a ocorrência de indels é muito rara na região *barcoding* do gene COI) e tradução para aminoácidos para despistagem de possíveis codões stop ou sequências aminoacídicas muito atípicas, indicativos de incorrecções no alinhamento ou da presença de eventuais pseudogenes.

3.8. Verificação das identificações por similaridade de DNA *barcodes*

O *Identification System* do BOLD (BOLD-IDS) permite a identificação de espécies através da leitura de uma sequência de DNA inserida pelo utilizador, retornando uma identificação taxonómica até ao nível da espécie, caso seja possível, mediante uma lista decrescente de percentagens de similaridade molecular. Utilizou-se a ferramenta BOLD-IDS para averiguar não só a congruência entre a análise morfológica dos espécimes de macroalgas colectados no âmbito desta tese e as suas respectivas sequências, como também para averiguar se as sequências descarregadas do GenBank correspondiam realmente às espécies de macroalgas pretendidas, tendo sempre em atenção a possível existência de sinónimos através da consulta da base de dados da Algaebase (Guiry e Guiry 2012).

3.9. Análise de dados e construção de árvores de DNA *barcodes*

Com base nos alinhamentos finais das sequências, compostos por sequências originais em conjunto com sequências descarregadas do GenBank, foram construídas árvores de DNA *barcodes* separadamente para espécimes de Rhodophyta e Heterokontophyta, utilizando três metodologias distintas:

Para esse efeito, procedeu-se à construção das seguintes árvores filogenéticas:

- Segundo o método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei 1987), usando o modelo de substituição de dois parâmetros de Kimura (K2P) (Kimura 1980) e o teste Bootstrap (Felsenstein 1985) baseado em 1000 réplicas para determinação do grau de suporte dos nós. Análise realizada no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).
- Segundo o método Maximum Likelihood (ML), usando o modelo de evolução K2P (Kimura 1980) e o teste aLRT (*Approximate Likelihood Ratio Test*) (Guindon e Gascuel 2003) para determinar o grau de suporte dos nós (opção “*Minimum of SH-like* (Shimodaira e Hasegawa 1999) *and Chi-square based support*”). Análise realizada no programa PhyML (Guindon e Gascuel 2003).

- Segundo o método Maximum Likelihood (ML), usando o modelo de substituição de aminoácidos de Jones-Taylor-Thornton (JTT) e o teste aLRT para determinar o grau de suporte dos nós (opção “*Minimum of Shimodaira and Hasegawa (SH)-like* (Shimodaira e Hasegawa 1999) and *Chi-square based support*. Análise realizada no programa PhyML (Guindon e Gascuel 2003).

No primeiro caso seleccionou-se o método NJ em conjunto com o modelo K2P por ser o mais comumente utilizado para analisar DNA *barcodes*, permitindo assim a comparação directa entre estudos. Os restantes métodos de reconstrução utilizados permitiram por sua vez a comparação da topologia das árvores obtidas pelos métodos NJ e ML usando sequências nucleotídicas, e entre a árvore ML baseada em sequências nucleotídicas comparativamente à obtida pelo mesmo método com sequências aminoácídicas. Optou-se pela utilização do teste aLRT na determinação do suporte dos nós das árvores ML por ser substancialmente mais rápido e menos exigente ao nível de recursos informáticos que o método *bootstrap*, embora produza geralmente estimativas semelhantes.

Foram determinados os padrões médios de divergência intra e interespecífica separadamente para Rhodophyta e Heterokontophyta, e em particular para os géneros de macroalgas seleccionados entre os que detinham uma representação mínima de espécies. Estas análises foram efectuadas no programa MEGA 5, usando o modelo K2P para facilitar comparações com outros estudos. Esta análise foi complementada com o cálculo do quociente entre as divergências congénica e intraespecífica, sendo denominado por *taxonomic resolution ratio* (TRR) (Costa *et al.* 2009). Para além disso, de forma a facilitar a delimitação visual das muitas espécies apresentadas a par da apresentação dos valores de divergências intraespecíficas e interespecíficas congénicas, os clados que agrupam espécimes com base na sua reciprocidade monofilética foram sombreados e assinalaram-se ao lado das árvores as famílias correspondentes aos espécimes agrupados em clados que partilham um ancestral comum.

Tendo por base os padrões divergência de COI em macroalgas reportados na literatura (Saunders 2005; McDevit e Saunders 2009), tomou-se como hipótese de partida para a

análise e discussão dos resultados considerar todos os conjuntos de sequências com divergências superiores a 2% como unidades taxonómicas independentes. As situações de incongruência entre o número de unidades taxonómicas assim obtidas e aquelas atribuídas pela identificação original mereceram-nos um escrutínio detalhado e tentativa de explicação com base na informação disponível sobre as espécies envolvidas.

3.10. Obtenção de extractos para análise fitoquímica

A análise fitoquímica centrou-se no estudo de 16 espécies de macroalgas vermelhas e castanhas (Tabela 4), sendo que a partir de 10 dessas espécies (19 espécimes diferentes) foi destacado o material algal para efectuar o protocolo de DNA *barcoding*.

Tabela 4 - Lista das espécies utilizadas para análise fitoquímica, o seu local de recolha; código identificativo atribuído a cada uma das amostras utilizadas

Espécies	Localização	N.º Amostra
<i>Asparagopsis armata</i> Harvey	Mosteiros, Açores	MD0002283
		MD0002284
		MD0002285
		MD0002286
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevisan de Saint-Léon	Caloura, Açores	MD0002259
<i>Cladostephus spongiosus</i> (Hudson) C.Agardh	Calhetas, Açores	MD0002253
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens ex Roth) Derbès & Solier	Mosteiros, Açores	MD0002287
		MD0002288
		MD0002289
		MD0002290
<i>Corallina caespitosa</i> R.H.Walker, J.Brodie e L.M.Irvine	São Vicente, Açores	MD0002238
<i>Cystoseira humilis</i> Schousboe ex Kützing	Mosteiros, Açores	MD0002272
<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	Calhetas, Açores	MD0002247
<i>Fucus vesiculosus</i> Linnaeus	Vila do Conde, Portugal Continental	-

<i>Gelidium</i> sp. (anteriormente identificado como <i>G. microdon</i>)	São Vicente, Açores	MD0002240
<i>Halopteris filicina</i> (Grateloup) Kützing	Caloura, Açores	MD0002255
<i>Halopteris scoparia</i> (Linnaeus) Sauvageau	Calhetas, Açores	MD0002245
<i>Petalonia binghamiae</i> (J.Agardh) K.L.Vinogradova	São Vicente, Açores	MD0002237
<i>Plocamium cartilagineum</i> (Linnaeus) P.S.Dixon	Calhetas, Açores	MD0002250
<i>Pterocliadiella capillacea</i> (S.G.Gmelin) Santelices e Hommersand	São Vicente, Açores	MD0002234
<i>Sargassum vulgare</i> C.Agardh	Mosteiros, Açores	MD0002269
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	Feteiras, Açores	MD0002261

As algas colhidas foram liofilizadas num liofilizador Christ Alpha 1-4, B. (Braun Biotech International, Alemanha) durante vários dias até completa desidratação da biomassa vegetal. O material foi de seguida tratado de forma individual mantendo a identificação dos espécimes e colheitas independentes. Assim, a biomassa de cada espécime foi moída num triturador, transferido para tubos de Falcon previamente identificados, pesado e armazenado em ambiente seco e frio (4°C) até posterior utilização. Alíquotas de 0,3g de material biológico de cada espécie em estudo foram utilizados para a extracção sequencial com solventes. A obtenção de várias classes de compostos orgânicos foi efectuada por extracção sequencial com vários solventes; numa primeira fase, todos os espécimes foram expostos a hexano, de forma a extrair todos os compostos lipídicos e mais apolares das macroalgas; na segunda fase, todos os espécimes foram expostos a água destilada, para assim se extrair os açúcares e compostos mais polares das amostras; na terceira fase, todos os espécimes foram expostos a metanol a 80%, de forma a extrair compostos fenólicos.

Na extracção com recurso a hexano, cada alíquota dos espécimes foi colocado em tubos de vidro e foi extraído hexano (5ml), tapando os tubos com papel de alumínio para evitar a evaporação do solvente. De seguida, os tubos foram colocados no ultra-

sons durante 10 minutos, centrifugados e o sobrenadante colectado para tubos para posterior evaporação do hexano. A biomassa remanescente foi novamente processada de forma idêntica e todo o processo de extracção repetido até se verificar uma coloração muito ténue ou mesmo inexistente no sobrenadante (cessação da extracção de pigmentos). Os sobrenadantes (hexano) recolhidos de cada espécime foram secos sob fluxo de azoto e os extractos guardados em frascos para posterior análise por GC. Após a exaustão do material biológico com hexano, este foi seco por exposição ao ar e à temperatura ambiente por forma a proceder à extracção com água destilada. A biomassa foi extraída três vezes com água destilada.

Após a secagem das amostras à temperatura ambiente e transferência do material biológico para tubos de Falcon 15ml, iniciou-se a última fase da extracção com metanol (80%) como solvente. A extracção processou-se de forma exaustiva, com o auxílio de ultra-sons, à temperatura ambiente, e centrifugação para recolha do sobrenadante. A extracção foi repetida as vezes necessárias para que o sobrenadante (solução metanólica contendo compostos fenólicos) não apresentasse coloração. O total de sobrenadante de cada espécime foi evaporado sob fluxo de azoto até secagem completa das amostras. O extracto seco de cada espécime foi de seguida redissolvido em metanol e filtrado (filtro nylon Gelman 0,2 micra, USA) para posterior análise por HPLC.

3.11. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

As análises de HPLC foram efectuadas num sistema VWR-Hitachi (Darmstadt, Alemanha) equipado com uma bomba tipo 305, uma bomba tipo 302 e uma válvula de injeção tipo 7125. As separações foram efectuadas numa coluna LichroCart RP18 (150x4mm; 4µm) da Merck (Darmstadt, Alemanha), equipada com uma pré-coluna do mesmo material. Para a fase móvel, foi utilizada a água com ácido fórmico (95:5) como eluente A e metanol como eluente B. O gradiente de eluição final seleccionado para a análise das amostras encontra-se descrito na Tabela 5.

A detecção dos compostos foi efectuada com recurso a um detector de *diode array detector* (DAD). Os dados do espectro cromatográfico foram acumulados dentro do intervalo de 200 a 600nm e os cromatogramas foram gravados aos 260, 280, 350 e 590nm. Esses mesmos dados foram processados pelo *software* EZChrome Elite (VWR, Darmstadt, Alemanha).

Tabela 5 - Gradiente de eluição seleccionado para a análise dos extractos de metanol (80%) da biomassa das macroalgas marinhas em estudo

Tempo (minutos)	% Eluente A	% Eluente B
0	90	10
2	70	30
8	70	30
13	65	35
20	50	50
22	50	50
30	30	70
35	30	70
45	20	80
50	20	80

3.12. Cromatografia Gasosa (GC)

Antes de proceder à cromatografia gasosa, as amostras foram derivatizadas. Para esse efeito, adicionou-se 25µl de ácido metil pentadecanóico (C₁₅) (solução de 24mg de ácido metil pentadecanóico em 2ml de metanol) a cada tubo contendo os extractos lipídicos (hexânicos) dos vários espécimes. O C₁₅ serviu como padrão interno e é um composto ideal para esse fim devido ao seu comportamento semelhante aos ácidos gordos naturais, embora não esteja presente em biomassa de plantas ou algas; os lípidos naturais possuem sempre um número par de carbonos na sua estrutura.

De forma a concluir a derivatização (inter-esterificação), adicionou-se às amostras 1ml de metanol anídrico na presença de um catalisador, o trifluoreto de boro (metanol BF₃) (Morrison *et al.* 1964), colocaram-se todos os tubos em ultra-sons durante alguns

minutos (entre 5 e 10 minutos), e de seguida foram colocados numa placa a 80°C durante 5 minutos. A solução resultante de cada amostra foi extraída com 1ml de hexano (depois de colocar 1ml de água destilada em cada frasco) após agitação intensa (em vortéx) durante alguns segundos, verificando-se posteriormente a formação de uma fase orgânica superior distinta, constituída pelos metil-estéres de interesse, que foi pipetada e colocada em frascos rolhados para posterior análise por GC.

A análise por GC foi efectuada num sistema Perkin Elmer 8600 (Perkin Elmer, Reino Unido), com coluna capilar de sílica SUPELCO OMEGAWAX-250 com 30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme (SUPELCO, USA). As condições introduzidas no sistema para a análise de perfis cromatográficos de ácidos gordos foram as seguintes: injector a 240°C, detector a 250°C, temperatura inicial do forno de 120°C, com um tempo isotérmico de 2 minutos e taxa de subida de temperatura de 5°C /minuto até atingir a temperatura final do forno de 220°C, seguida de um tempo isotérmico de 20 minutos, sob pressões de ar, hidrogénio e gás de arrasto a 130kPa, 100kPa e 12psi, respectivamente. Para além disso, o volume de amostra injectado para análise foi de 0,05µl para todas as espécies em estudo. A identificação dos compostos foi efectuada com o auxílio de uma amostra padrão contendo 37 ácidos gordos (Supelco-mix, USA) usando como termo de comparação os *relative retention times* (RRTs) dos compostos padrão.

4. Resultados

4.1. Compilação da biblioteca de referência de DNA *barcodes*

A biblioteca de referência de DNA *barcodes* contém um total de 241 sequências de COI das quais 59 são provenientes de espécimes de Portugal e 182 são provenientes de espécimes de outras zonas do globo (Anexo/Tabela T1). Das 59 sequências provenientes de espécimes de Portugal oito foram obtidas durante o presente estudo e 45 são sequências não publicadas da autoria de M. Parente. As restantes 188 sequências foram obtidas após pesquisa no GenBank.

As oito sequências de DNA *barcodes* obtidas no presente estudo correspondem a dois filos (5 sequências de Heterokontophyta e três sequências de Rhodophyta), duas classes, sete ordens, sete famílias, sete géneros e sete espécies. Estas variam, em média, entre os 651 e os 664 pb, sendo de 573 pb a sequência mais pequena. Não foram detectados codões *stop*, nem inserções ou deleções após alinhamento. As restantes 233 sequências de DNA *barcodes* incluídas no presente estudo pertencem a dois filos (82 sequências de Heterokontophyta e 151 sequências de Rhodophyta), duas classes, 25 ordens, 46 famílias, 71 géneros e 96 espécies. O conjunto de todas as sequências COI referidas constitui o contributo inicial de 100 espécies para a construção da biblioteca de referência pretendida de macroalgas castanhas e vermelhas reportadas para a flora marinha Portuguesa.

4.2. Divergências moleculares intra e interespecíficas

Na Tabela 6 encontram-se discriminadas as divergências intra e interespecíficas de géneros representativos de Rhodophyta e Heterokontophyta obtidas através do modelo de evolução K2P. Dada a presença genérica desse padrão em todas as árvores, também se constata que as taxas de divergência intra e interespecíficas se encontram bem delimitadas e nunca se sobrepõem em qualquer um dos filos. No caso do filo Rhodophyta, a taxa média de divergência intraespecífica e interespecífica congénica foi de 0,21% (variação entre 0 – 1,39%) e 13,94% (6,91 – 18,86%), respectivamente, e

no caso do filo Heterokontophyta a taxa média de divergência intraespecífica e interespecífica congênica foi de 0,22% (variação entre 0 – 0,95%) e 6,94% (variação entre 3,1 – 16,07%), respectivamente. Verifica-se também um padrão geral de valores de divergência intraespecífica baixo e de valores mínimos de divergência interespecífica mais elevado, excepto no caso do género *Fucus* (*Fucus spiralis* e *Fucus vesiculosus*), no qual se verifica a taxa máxima de divergência intraespecífica de 0,26% e a taxa mínima de divergência interespecífica de 0,17%.

Tabela 6 - Divergências médias, mínimas e máximas intra e interespecíficas de géneros representativos Rhodophyta e Heterokontophyta calculadas segundo o modelo K2P. A métrica TRR consiste no quociente entre as divergências congénicas e intraespecíficas

		Tipo de divergência	N.º de espécimes	N.º taxa	Valor médio (%)±Erro padrão	Valor mínimo e máximo (%)	TRR
Rhodophyta	Global	Intraespecífica	95	19	0,21±0,02	0,00 – 1,39	66,4
		Interespecífica	67	21	13,94±0,75	6,91 – 18,86	
	Género <i>Gracilaria</i>	Intraespecífica	10	2	0,28±0,08	0,00 – 0,59	54,9
		Interespecífica	10	2	15,38±0,00	15,38 – 15,38	
	Género <i>Porphyra</i>	Intraespecífica	12	2	0,12±0,02	0,00 – 0,3	110,8
		Interespecífica	12	2	13,29±0,00	13,29 – 13,29	
	<i>Hypnea musciformis</i> ¹	Intraespecífica	3	1	0,00±0,00	0,00 – 0,00	~139,2
		Interespecífica	6	3	13,92±0,69	11,43 – 16,37	
	<i>Gelidium crinale</i> ¹	Intraespecífica	4	1	0,61±0,18	0,15 – 1,07	26,4
		Interespecífica	9	4	16,13±0,3	14,87 – 16,89	
	<i>Laurencia majuscula</i>	Intraespecífica	5	1	0,23±0,04	0,00 – 0,49	37,7
		Interespecífica	6	2	8,67±0,00	8,67 – 8,67	
	<i>Corallina officinalis</i>	Intraespecífica	6	1	0,76±0,11	0,00 – 1,37	12,8
		Interespecífica	7	2	9,74±0,00	9,74 – 9,74	
	<i>Plocamium cartilagineum</i>	Intraespecífica	6	1	0,12±0,02	0,00 – 0,3	57,6
		Interespecífica	7	2	7,09±0,00	7,09 – 7,09	
<i>Liagora distenta</i>	Intraespecífica	4	1	0,00±0,00	0,00 – 0,00	~170,9	
	Interespecífica	6	3	17,09±1,74	13,62 – 18,86		
Heterokontophyta	Global ²	Intraespecífica	71	14	0,22±0,08	0,00 – 0,95	31,7
		Interespecífica	48	7	6,94±2,43	3,1 – 16,07	
	Género <i>Fucus</i>	Intraespecífica	20	3	0,11±0,00	0,00 – 0,26	20
		Interespecífica	20	3	2,2±1,02	0,17 – 3,34	
	Género <i>Sargassum</i>	Intraespecífica	13	2	0,07±0,01	0,00 – 0,33	110,6
		Interespecífica	13	2	7,74±0,00	7,74 – 7,74	
	Género <i>Dictyota</i>	Intraespecífica	9	2	0,14±0,05	0,00 – 0,27	114,8
		Interespecífica	9	2	16,07±0,00	16,07 – 16,07	

1 – Exclusão de espécimes com a mesma nomenclatura para o cálculo da divergência intraespecífica.

2 – Exclusão das espécies *Fucus spiralis* e *Fucus vesiculosus* no cálculo da divergência interespecífica.

Por uma necessidade operacional e para detectar situações de divergência que se afastem do padrão global dos dados, estabeleceu-se um valor empírico de divergência com base na literatura (Saunders 2005; McDevit e Saunders 2009) e nos dados deste estudo. Assim, dentro do filo Rhodophyta verificou-se que 80% dos valores de divergência intraespecífica são iguais ou menores que 0,5% e dentro do filo Heterokontophyta 84% desses mesmos valores são iguais ou menores que 0,3%. Tendo em consideração estas percentagens e os valores máximos de divergência intraespecífica de grande parte dos clados representados neste estudo, distinguiram-se como grupos monofiléticos todos os grupos cuja divergência intraespecífica fosse menor do que 2%, de forma a não subestimar o conceito de diferenciação entre espécies e o poder de discernimento do COI tendo em conta a possível existência de espécies crípticas ou de fenómenos como a hibridização introgressiva entre as espécies analisadas. Para além disso, esta medida permite assinalar casos específicos para discussão e futuros estudos mais aprofundados.

4.3. Árvores de DNA *barcodes*

Após obter todas as árvores segundo os modelos previamente delineados e comparar as árvores nucleotídicas NJ e ML (árvores ML nucleotídicas presentes nos Anexos/Imagens I2 e I3), verificou-se que ambos os modelos convergiam na sua topologia e relações evolutivas e, por essa mesma razão, decidiu-se expor para análise apenas as árvores NJ (Figuras 8 e 10) e ML de aminoácidos (Figuras 9 e 11). Através da análise das árvores de NJ e de ML, é possível observar que a quase totalidade dos 241 espécimes se agruparam em clados monofiléticos com baixa divergência (grupos com <2% de divergência intraespecífica) correspondentes às respectivas espécies, quer de Rhodophyta quer de Heterokontophyta. As exceções a este padrão foram o caso dos clados correspondentes a *Fucus spiralis* e *Fucus vesiculosus* nas macroalgas castanhas e dos clados correspondentes a *Asparagopsis taxiformis*, *Champia parvula*, *Gelidium crinale* e *Hypnea musciformis* nas macroalgas vermelhas.

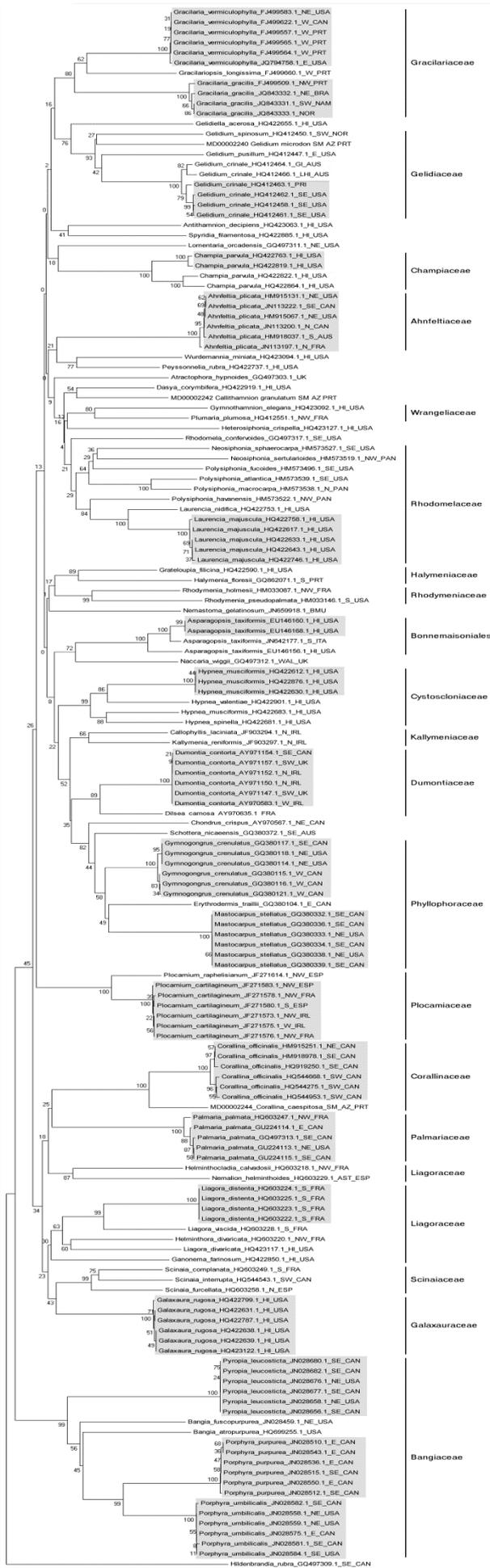


Figura 8 - Árvore NJ de sequências COI provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Rhodophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução K2P e o teste de Bootstrap com 1000 replicações. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado

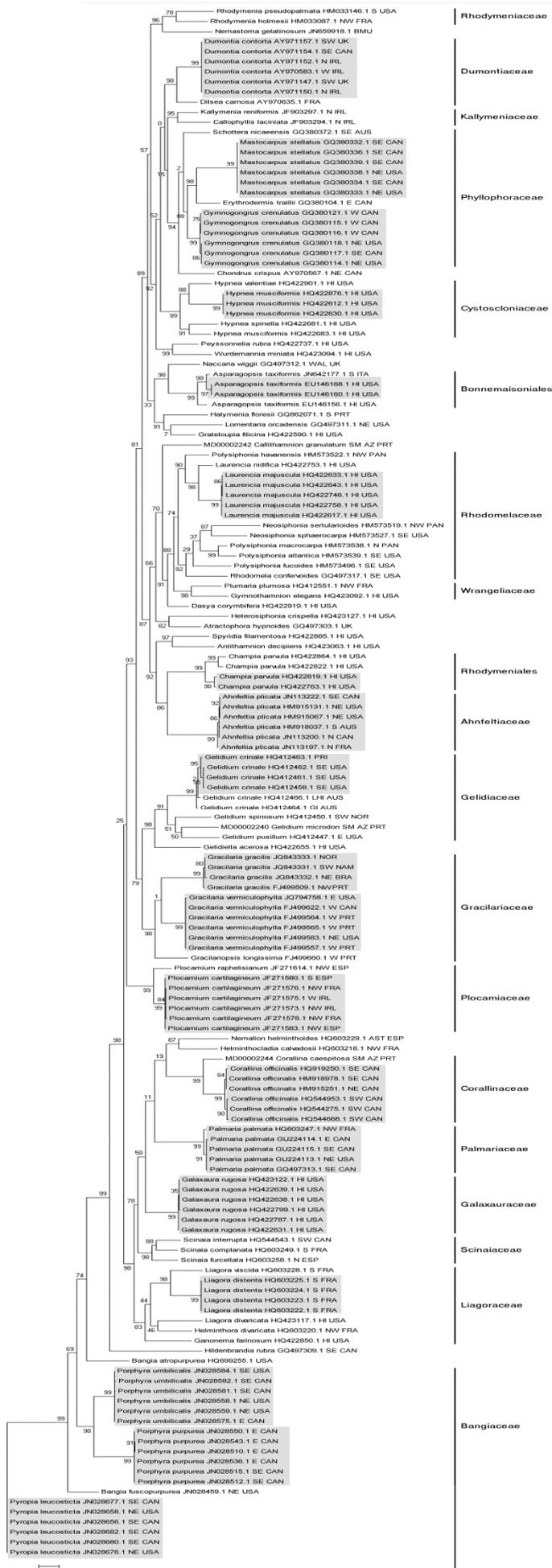


Figura 9 - Árvore ML de sequências COI traduzidas (aminoácidos) provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Rhodophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução JTT e o teste de Minimum of SH-Like and Chi2 base support. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado

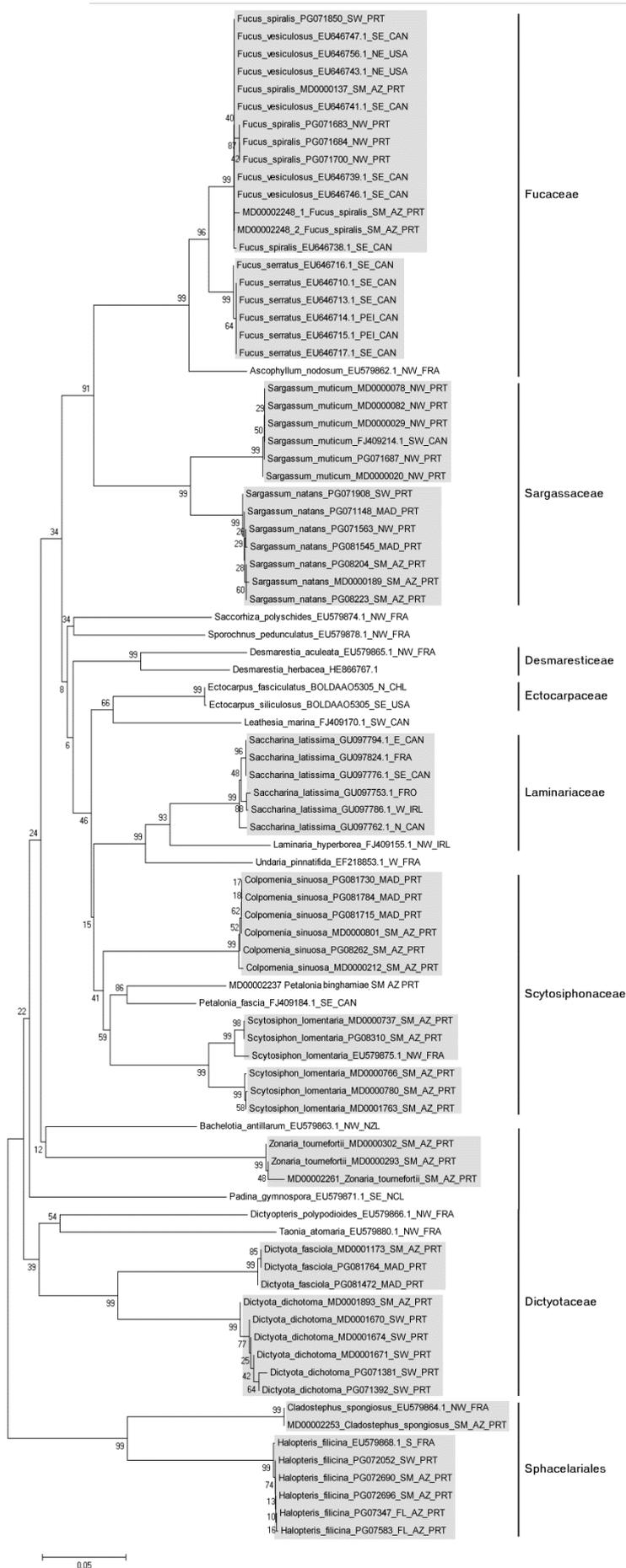


Figura 10 - Árvore NJ de seqüências COI provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Heterokontophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução K2P e o teste de Bootstrap com 1000 replicações. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado

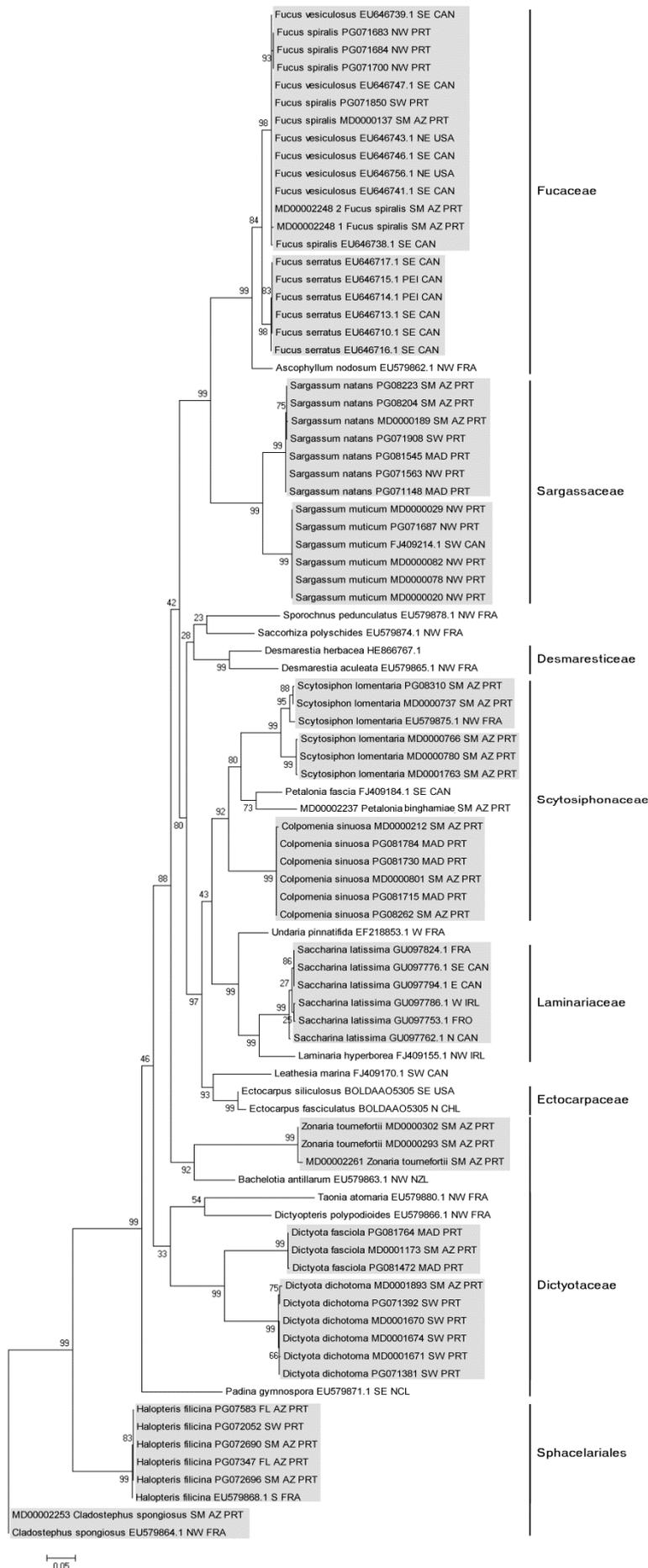


Figura 11 - Árvore ML de seqüências COI traduzidas (aminoácidos) provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Heterokontophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução JTT e o teste de Minimum of SH-Like and Chi2 base support. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado

4.4. Pesquisa de sequências homólogas em bases de dados

No seguimento da pesquisa de sequências similares através da ferramenta BOLD-IDS, foi possível atribuir identificações prováveis ao nível da espécie para 5 dos espécimes sequenciados neste estudo (Tabela 7). Devido à ausência de sequências muito similares na BOLD, os restantes espécimes foram identificados até ao género, no caso de *Callithamnion granulatum*, *Gelidium microdon* e *Petalonia binghamiae*.

Após a averiguação de sinónimos na nomenclatura de todas as espécies aqui analisadas, procedeu-se à alteração das mesmas para as denominações actualmente aceites (Anexo/Tabela T2). Não foram consideradas três sequências de DNA *barcode* disponíveis no GenBank atribuídas a *Porphyra dioica*, *Corallina elongata* e *Jania rubens* devido a tratarem-se com grande probabilidade de sequências obtidas de espécies do filo *Arthropoda*, segundo a ferramenta BOLD-IDS.

Tabela 7 - Resultados da pesquisa de sequências similares usando a ferramenta BOLD-IDS. Identificação dos organismos com sequências mais próximas, percentagem de similaridade e nível de identificação provável na hierarquia taxonômica

Identificação prévia dos espécimes	Espécie mais próxima	Similaridade entre espécies (%)	Nível de identificação
<i>Callithamnion granulatum</i> (Ducluzeau) C.Agardh	<i>Callithamnion stuposum</i> Suhr	94,28	Género
<i>Cladostephus spongiosus</i> (Hudson) C.Agardh	<i>Cladostephus spongiosus</i> (Hudson) C.Agardh	99,23	Espécie
<i>Corallina caespitosa</i> R.H.Walker, J.Brodie e L.M.Irvine	<i>Corallina caespitosa</i> R.H.Walker, J.Brodie e L.M.Irvine	99,23	Espécie
<i>Petalonia binghamiae</i> (J.Agardh) K.L.Vinogradova	<i>Petalonia</i> sp. 1	100	Género
	<i>Petalonia fascia</i> (O.F.Müller) Kuntze	91,18	
<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus (1)	<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	99,69	Espécie
<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus (2)	<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	100	Espécie
<i>Gelidium microdon</i> Kützing	<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Bornet	88,11	Género
	<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Santelices e Homersand	87,85	
	<i>Gelidium</i> sp.	87,17	
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	94,78	Espécie

4.5. Análise por HPLC

O procedimento de análise fitoquímica das 16 espécies de macroalgas vermelhas e castanhas em estudo iniciou-se com a injeção dos respectivos extractos metanólicos (80%) no equipamento de HPLC de forma a revelar os perfis de compostos fenólicos correspondentes. Apesar de se terem delineado várias análises cromatográficas distintas, com uso de dois gradientes de eluição distintos e injeção das amostras em concentrações diferentes (na segunda análise todas as amostras estavam 3 vezes mais concentradas), nunca foi possível registar perfis cromatográficos com compostos fenólicos detectáveis para qualquer das espécies de macroalgas em estudo.

4.6. Análise por GC

No seguimento da análise fitoquímica por HPLC das 16 espécies de macroalgas vermelhas e castanhas, procedeu-se à análise dos extractos lipídicos para leitura dos perfis de ácidos gordos por GC. Foi possível o registo de vários perfis cromatográficos com presença de diversos tipos de compostos em concentrações distintas entre amostras, sendo verificável a presença de determinados padrões de composição lipídica em algumas espécies (Figuras 12 a 27). Numa análise qualitativa dos perfis cromatográficos, confirmou-se uma maior variedade de ácidos gordos no filo Heterokontophyta em relação ao filo Rhodophyta, principalmente ao nível de compostos com tempos de retenção superiores a 21 minutos. De entre todos os compostos identificados nos perfis, os ácidos gordos maioritariamente presentes nas espécies do filo Rhodophyta foram C14, C16, C16:1, C18 e C18:1n9c/t e os ácidos gordos maioritariamente presentes nas espécies do filo Heterokontophyta foram C14, C16, C16:1, C18, C18:1n9c/t, C18:3n3, C18:2n6c e C20:3n3 (Tabela 8).

Além dessa análise mais superficial, verificou-se que determinados ácidos gordos estão exclusivamente presentes em algumas das espécies estudadas. Dentro do filo Rhodophyta, os compostos C18:2n6c, C20:3n3 e C20:5n3 são exclusivos de *Gelidium microdon*, C18:2n6t e C18:3n3 são exclusivos de *Plocamium cartilagineum* e C20:2c é exclusivo de *Pterocladia capillacea*. Relativamente ao filo Heterokontophyta, os

compostos C20, C18:3n6 e C18:2n6t são exclusivos de *Fucus vesiculosus*, C14:1 é exclusivo de *Fucus spiralis*, C20:5n3 é exclusivo de *Cystoseira humilis* e *Fucus vesiculosus*, C20:2c é exclusivo de *Petalonia binghamiae* e C18:3n3 é exclusivo de espécies da ordem Fucales (*Cystoseira humilis*, *Fucus spiralis*, *Fucus vesiculosus* e *Sargassum vulgare*). É também importante referir que as espécies que partilham o mesmo género dentro do filo Rhodophyta (*Asparagopsis taxiformis*/*Asparagopsis armata*) revelam o mesmo perfil lipídico, enquanto que as espécies que partilham o mesmo género dentro do filo Heterokontophyta (*Halopteris filicina*/*Halopteris scoparia* e *Fucus vesiculosus*/*Fucus spiralis*) revelam algumas diferenças pontuais na sua composição lipídica.

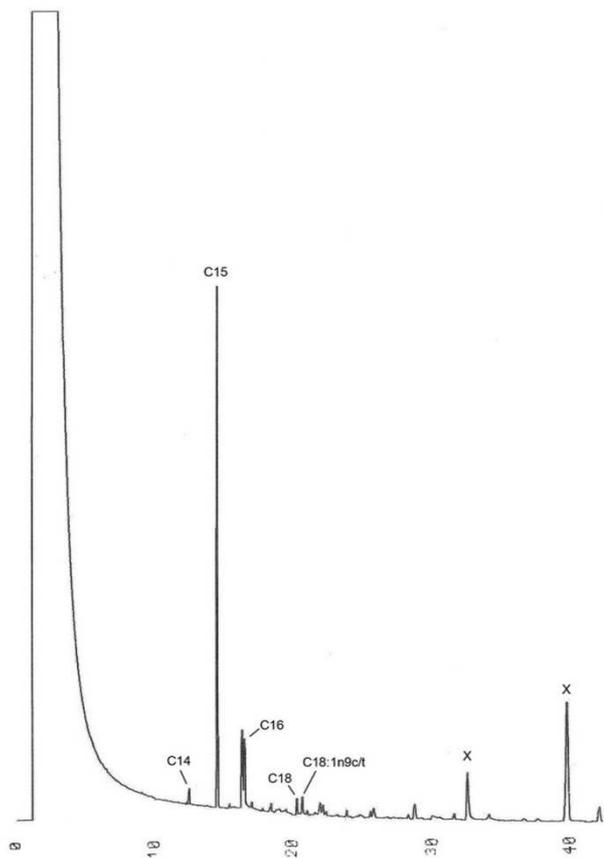


Figura 12 - Perfil lipídico de *Asparagopsis armata* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

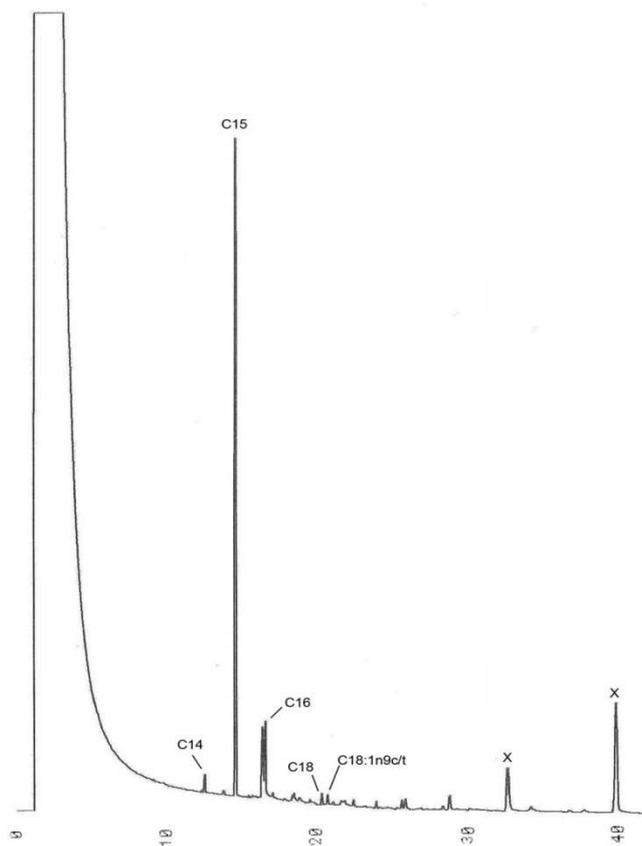


Figura 13 - Perfil lipídico de *Asparagopsis taxiformis* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

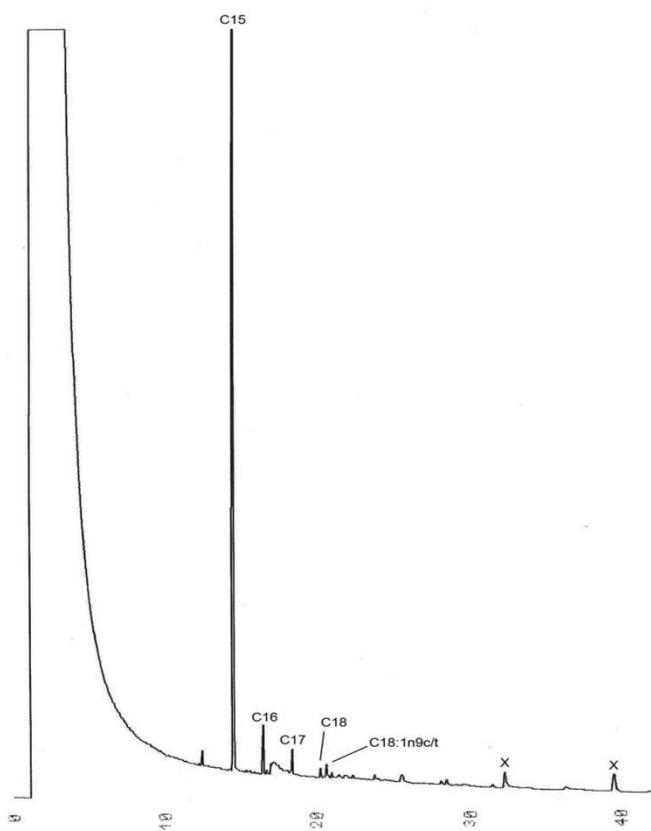


Figura 14 - Perfil lipídico de *Cladostephus spongiosus* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

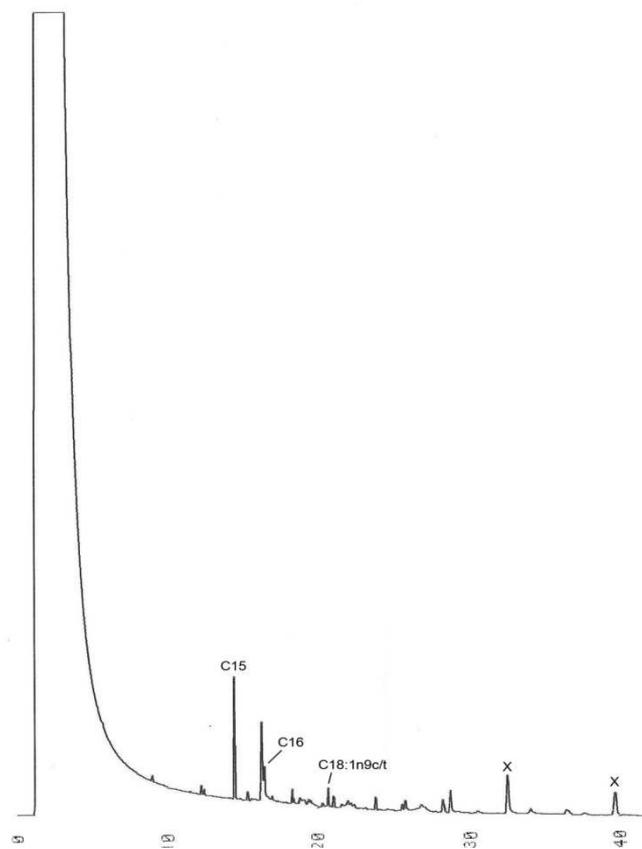


Figura 15 - Perfil lipídico de *Colpomenia sinuosa* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

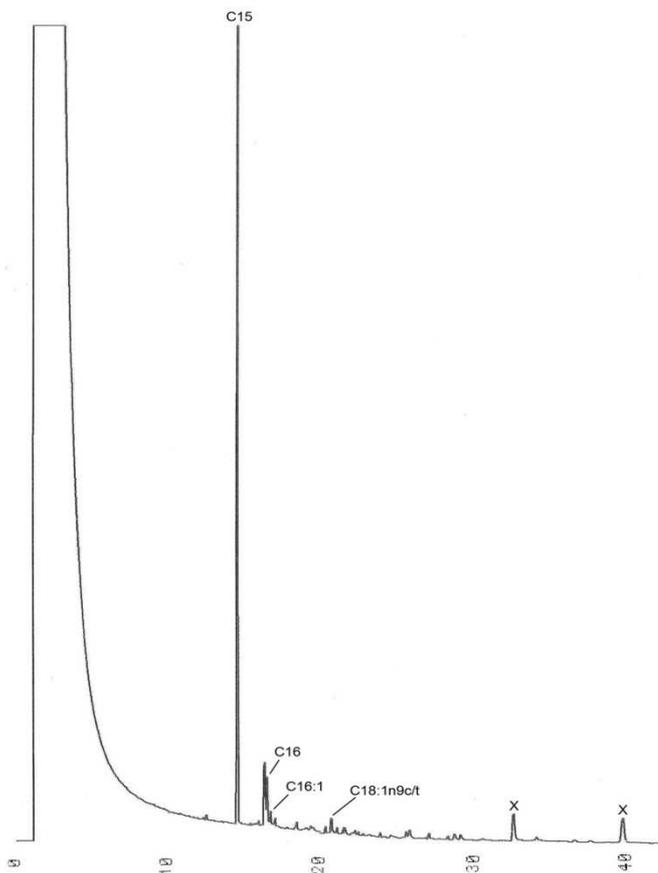


Figura 16 - Perfil lipídico de *Corallina caespitosa* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

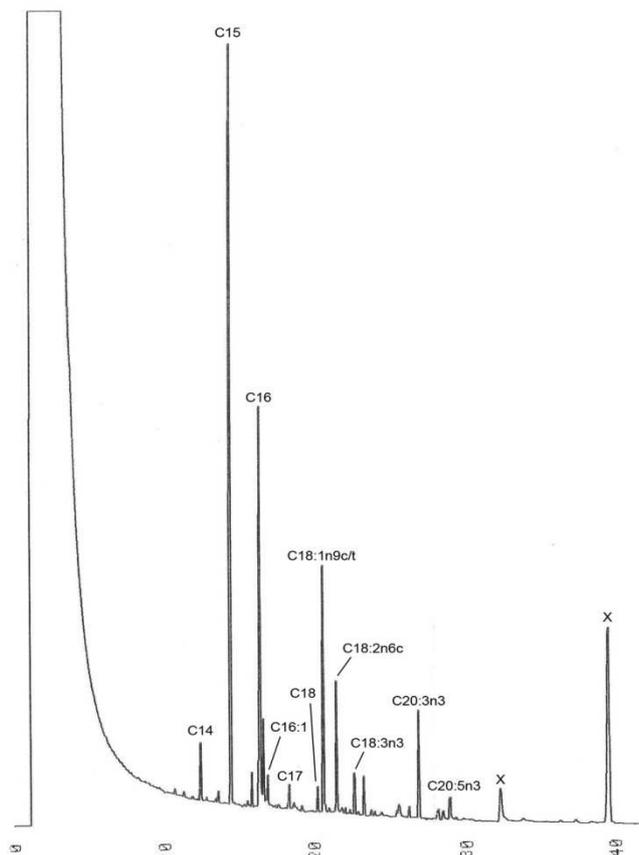


Figura 17 - Perfil lipídico de *Cystoseira humilis* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

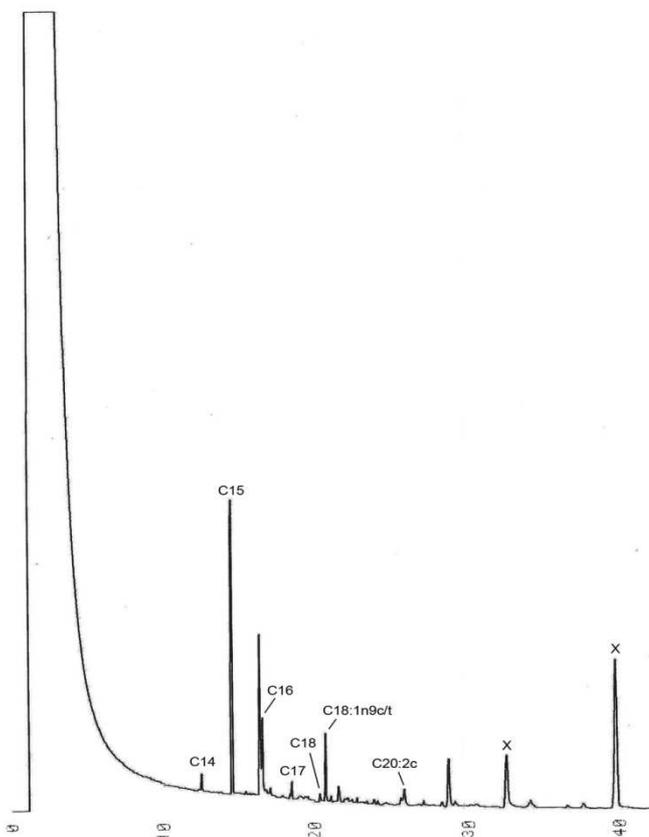


Figura 18 - Perfil lipídico de *Petalonia binghamiae* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

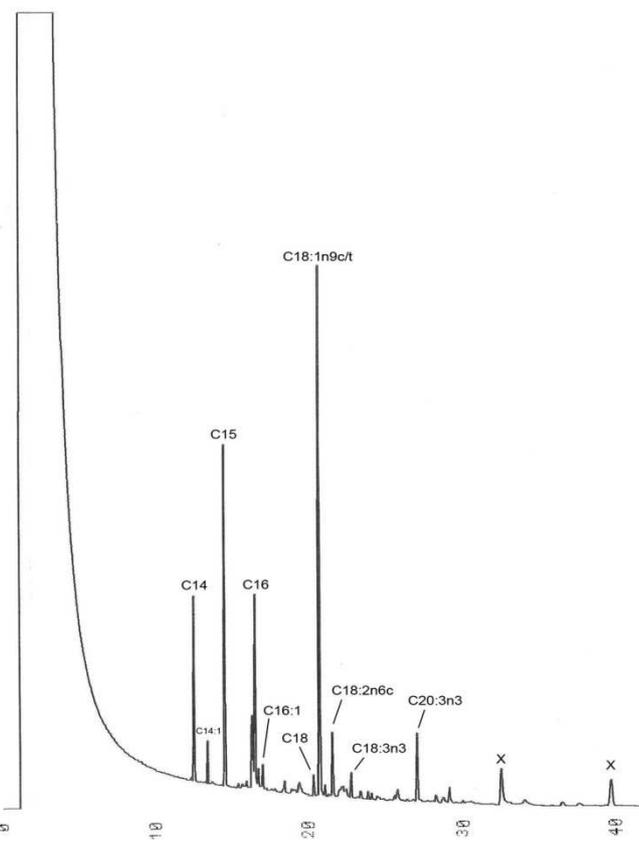


Figura 19 - Perfil lipídico de *Fucus spiralis* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

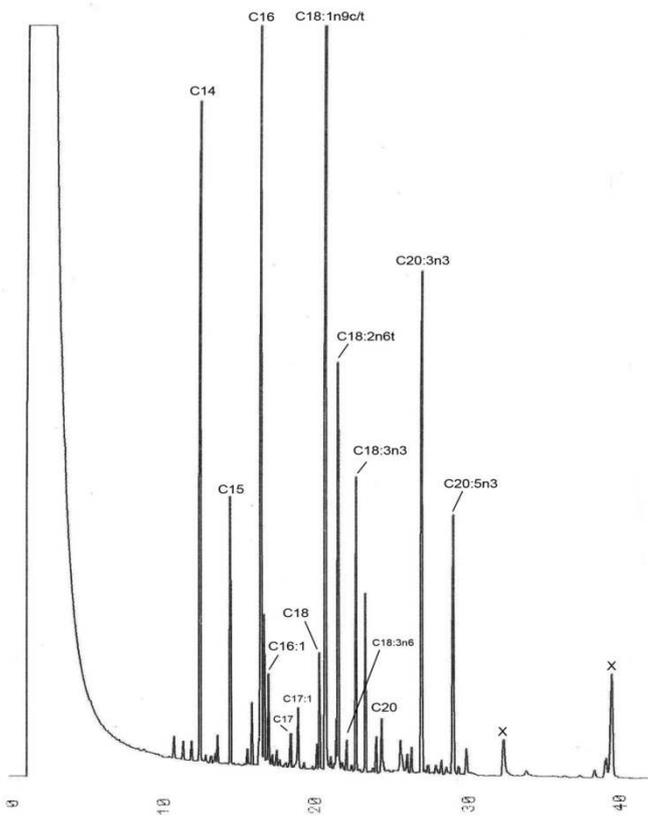


Figura 20 - Perfil lipídico de *Fucus vesiculosus* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

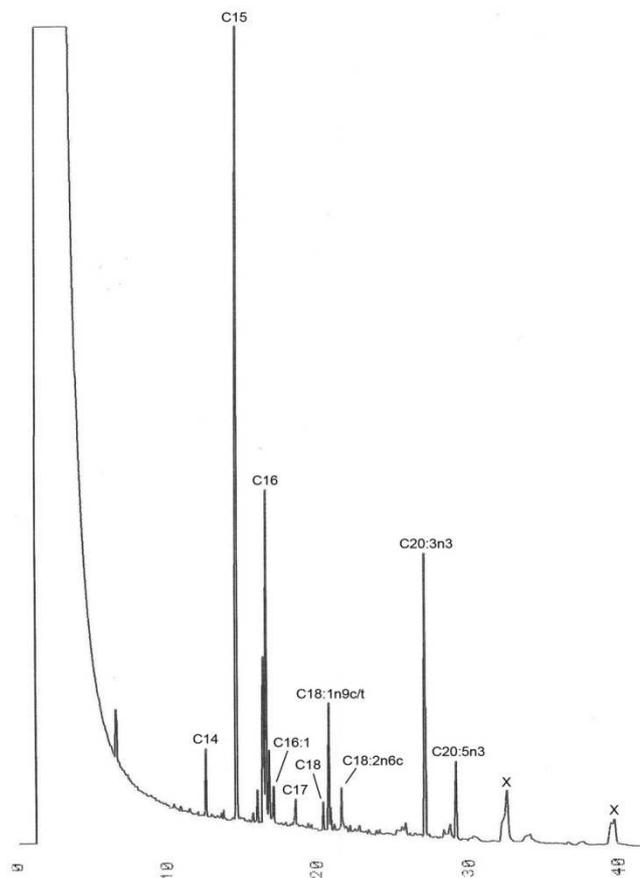


Figura 21 - Perfil lipídico de *Gelidium microdon* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

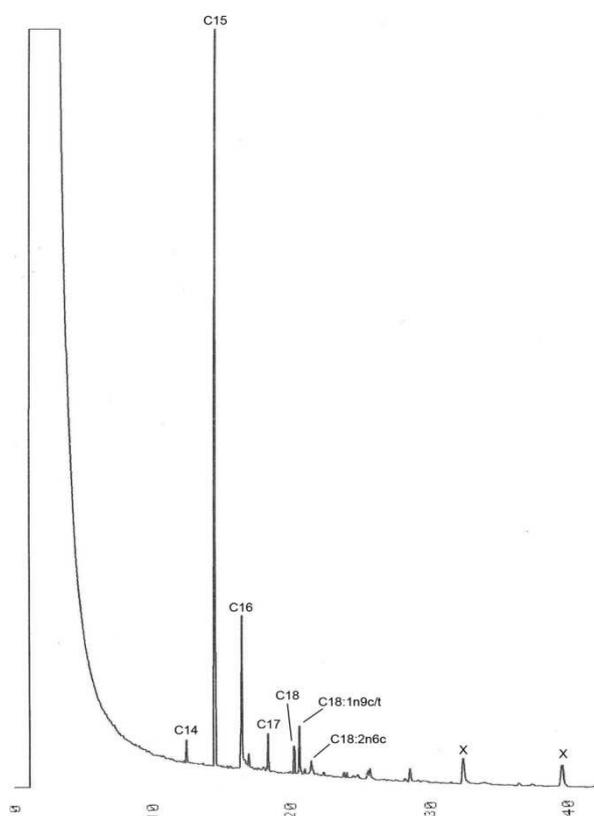


Figura 22 - Perfil lipídico de *Halopteris filicina* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

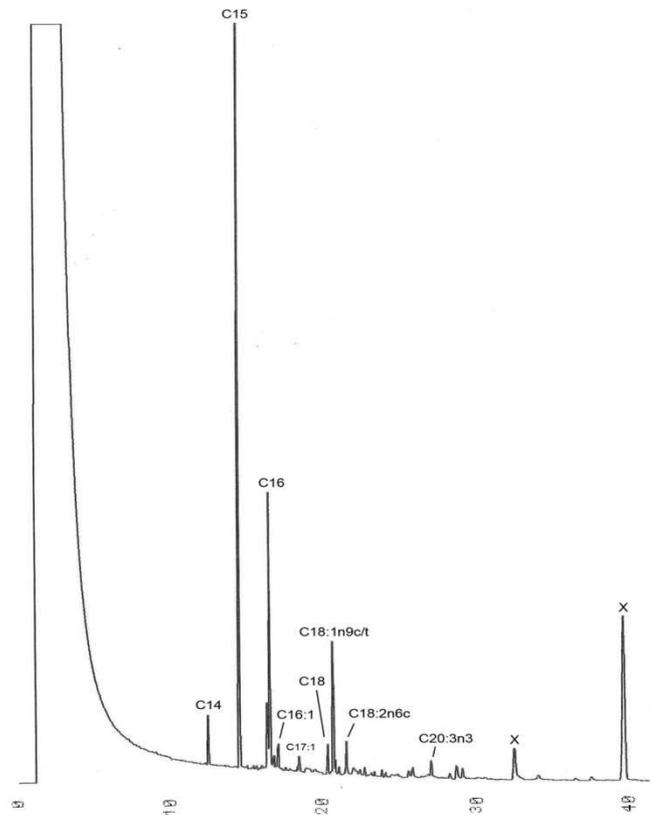


Figura 23 - Perfil lipídico de *Halopteris scoparia* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

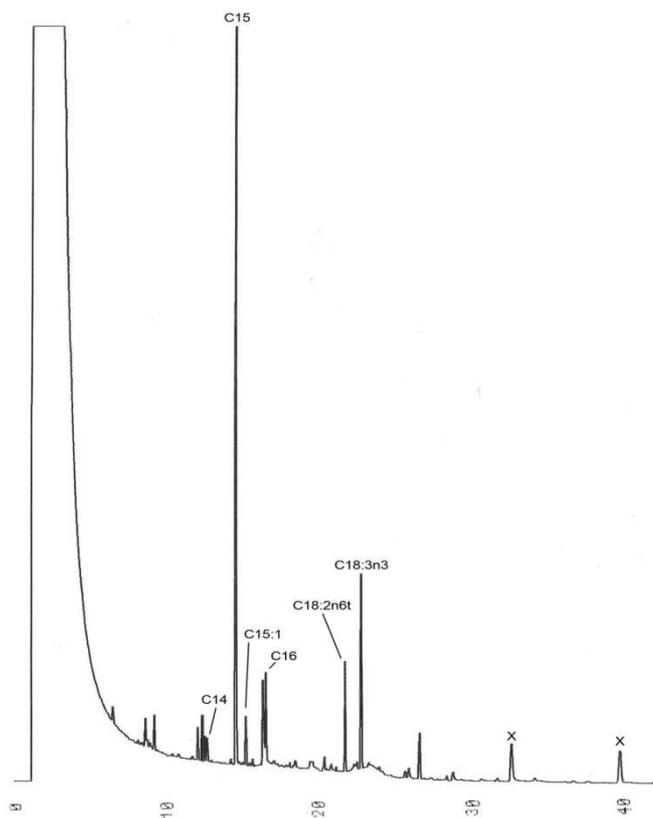


Figura 24 - Perfil lipídico de *Plocamium cartilagineum* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

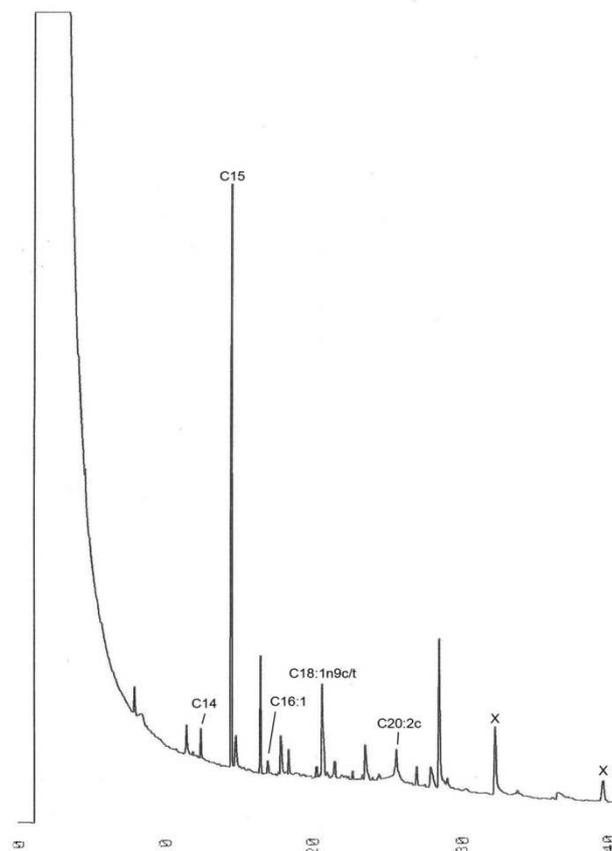


Figura 25 - Perfil lipídico de *Pterocliadiella capillacea* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

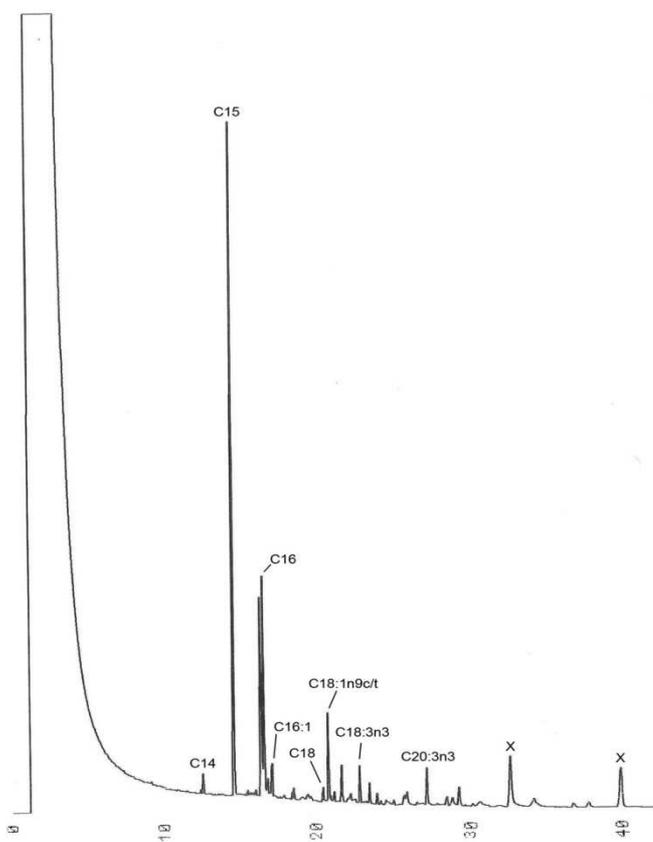


Figura 26 - Perfil lipídico de *Sargassum vulgare* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

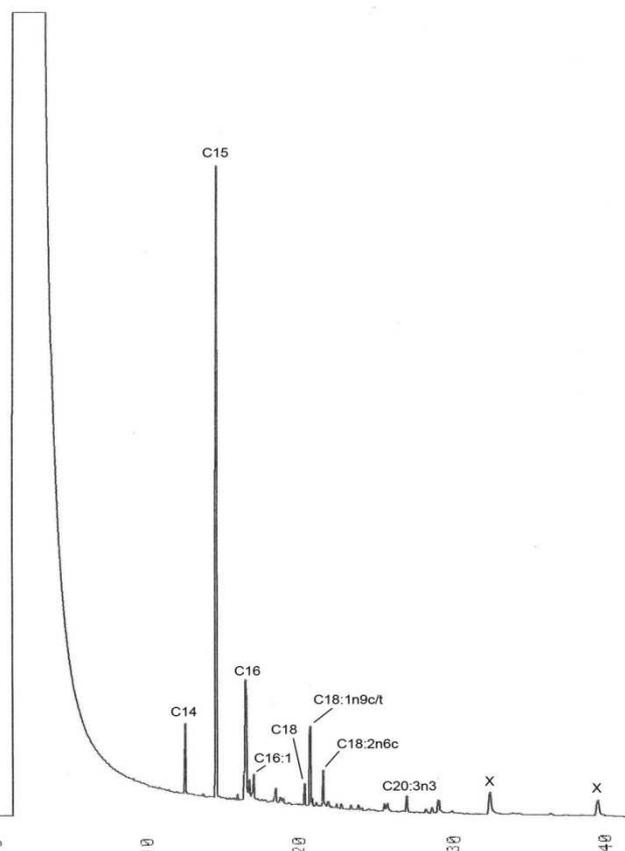


Figura 27 - Perfil lipídico de *Zonaria tournefortii* obtido em análise de 42 minutos por GC, com respectiva identificação dos picos representados (X – contaminante)

		Compostos													
Espécies		C14	C14:1	C16	C16:1	C18	C18:1n 9c/t	C18:2n6t	C18:2n6c	C18:3n6	C18:3n3	C20	C20:2c	C20:3n3	C20:5n3
Rhodophyta	<i>Asparagopsis armata</i>	X		X		X	X								
	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	X		X		X	X								
	<i>Corallina caespitosa</i>			X	X		X								
	<i>Gelidium microdon</i>	X		X	X	X	X		X					X	X
	<i>Plocamium cartilagineum</i>	X		X				X			X				
	<i>Pterocladia capillacea</i>	X			X		X						X		
Heterokontophyta	<i>Cladostephus spongiosus</i>			X		X	X								
	<i>Colpomenia sinuosa</i>			X			X								
	<i>Cystoseira humilis</i>	X		X	X	X	X		X		X			X	X
	<i>Fucus spiralis</i>	X	X	X	X	X	X		X		X			X	
	<i>Fucus vesiculosus</i>	X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X
	<i>Halopteris filicina</i>	X		X		X	X		X						
	<i>Halopteris scoparia</i>	X		X	X	X	X		X					X	
	<i>Petalonia binghamiae</i>	X		X		X	X						X		
	<i>Sargassum vulgare</i>	X		X	X	X	X				X			X	
	<i>Zonaria tournefortii</i>	X		X	X	X	X		X					X	

Tabela 8 - Leitura e identificação dos perfis lipídicos de cada uma das 16 espécies adquiridos através do método GC

5. Discussão

A compilação de uma biblioteca de DNA *barcodes* robusta para qualquer grupo taxonómico de um determinado habitat ou zona geográfica exige o levantamento de um elevado número de sequências COI, de forma a assegurar a representatividade tanto da diversidade sistemática da região como da variabilidade intraespecífica. Neste estudo efectuou-se o levantamento total de 233 sequências correspondentes a 96 espécies a partir da base de dados GenBank e de dados não publicados, entre as quais 151 sequências pertencentes a 68 espécies do filo Rhodophyta e 82 sequências pertencentes a 28 espécies do filo Heterokontophyta. Apesar deste número ser comparativamente pequeno (i.e. cerca de 10%) em relação ao número total de 849 espécies reportadas para a flora marinha portuguesa, já constitui um ponto de partida muito relevante, pois trata-se da criação de um sistema de identificação de espécies mais rigoroso, reprodutível e fiável.

Importa contudo referir que apenas 21% do número total de DNA *barcodes* compilados (pertencentes a 4 espécies de macroalgas vermelhas e 9 espécies de macroalgas castanhas) foram obtidos a partir de espécimes colectados em Portugal. Atendendo aos pressupostos da utilização de DNA *barcodes* e numerosos estudos entretanto realizados (Moritz e Cicero 2004; Dasmahapatra e Mallet 2006; Ward *et al.* 2008) seriam teoricamente suficientes entre 1 a 3 sequências de uma determinada espécie para efectuar uma identificação rigorosa, independentemente do local de colheita do espécime. Contudo, os mesmos DNA *barcodes* têm contribuído para revelar a existência provável de mais espécies do que as que previamente conhecidas em quase todos os grandes grupos de organismos, inclusive no caso de espécies crípticas cuja detecção se faz por via exclusivamente molecular (Costa e Carvalho 2010; Costa e Antunes 2012).

Dentro de um universo de 849 espécies de macroalgas vermelhas e castanhas reportadas para a flora marinha Portuguesa, apenas 90 delas possuem as suas respectivas sequências COI publicadas, entre as quais somente quatro das espécies se encontram caracterizadas por sequências *barcode* de espécimes colectados em

território português. Apesar de ser defendido que a amostragem geográfica limitada é um factor improvável de refutação ou diminuição da utilidade da metodologia do DNA *barcoding* na identificação e descrição de uma determinada espécie (teoria fortemente relacionada com espécies de peixes de água salgada) (Moritz e Cicero 2004; Dasmahapatra e Mallet 2006; Ward *et al.* 2008), pode ainda assim revelar-se como uma limitação deste estudo, tendo em conta o desconhecimento geral relativamente aos graus de variabilidade genética que possam ocorrer entre macroalgas da mesma espécie originárias de locais geográficos distintos, podendo comprometer a futura implementação de um sistema robusto de identificação molecular de macroalgas marinhas portuguesas para extracção de compostos fitoquímicos de interesse biotecnológico e farmacológico.

Com base na análise das sequências de COI aqui compiladas é possível identificar com grande clareza padrões de organização dos espécimes presentes em cada uma das árvores filogenéticas de Rhodophyta e Heterokontophyta. Nomeadamente é bastante evidente o agrupamento de espécimes em clados coincidentes com níveis taxonómicos superficiais, como a espécie e o género (sombreado nas árvores) ou a partilha de um ancestral comum em clados de níveis taxonómicos mais profundos, como família e a ordem (chavetas das árvores).

Na globalidade, considerando tanto as análises dos padrões de divergências e as reconstruções filogenéticas, todos os indicadores apresentados confirmam a capacidade das sequências de COI de delimitar e discernir entre diferentes níveis taxonómicos, nomeadamente considerando a baixa variabilidade intraespecífica e a grande diferença entre o valor máximo de divergência intraespecífica e o valor mínimo de divergência interespecífica congénica. Uma das poucas excepções a este padrão verificou-se no caso da proximidade filogenética elevada entre as espécies *Fucus vesiculosus* e *Fucus spiralis*, as quais formam um só grupo monofilético e em alguns casos partilham haplótipos, resultando assim numa taxa de divergência interespecífica muito baixa. Este caso em concreto já foi reportado por Kucera e Saunders (2008) e McDevit e Saunders (2009). Os autores deste estudo sugerem que as duas espécies de *Fucus* estão bem estabelecidas e descritas, não se tratando de um caso de sinonímia,

mas provavelmente de separação incompleta de linhagens a partir de um ancestral comum relativamente recente ou, eventualmente, de hibridização introgressiva. Em todo o caso, devido ao seu carácter excepcional, estas espécies foram retiradas do cálculo global das taxas de divergências do filo Heterokontophyta, de forma a não influenciar desproporcionadamente a obtenção do padrão geral de variabilidade realista.

A discussão neste estudo relativamente ao assunto das divergências intra e interespecíficas nos filios Heterokontophyta e Rhodophyta terá como base fundamental os resultados dos trabalhos de Saunders (2005) e McDevit e Saunders (2009), a partir dos quais se estabeleceram limites percentuais bem definidos para utilização em análises de divergências evolutivas em macroalgas vermelhas e castanhas.

Os valores médios determinados dentro de cada filo revelam-se similares aos valores médios apresentados nos estudos de Saunders (2005) e McDevit e Saunders (2009), embora os valores mínimos e máximos globais se revelem mais altos nos resultados desta tese do que nos estudos anteriormente referidos, nomeadamente no caso do valor máximo de divergência intraespecífica no filo Rhodophyta que foi de 0,3% segundo Saunders (2005) e 1,39% neste estudo. A causa destas diferenças está provavelmente relacionada com a presença de espécies crípticas e espécies divergentes com base na sua origem geográfica, sendo essa a razão para a implementação de <2% de divergência intraespecífica como valor empírico para determinação dos grupos monofiléticos deste estudo, de forma a englobar dentro do possível todos esses indivíduos que não constituem espécies diferentes. Importa salientar ainda que as divergências intra e interespecíficas obtidas para o filo Heterokontophyta foram globalmente menores (divergências intraespecíficas entre 0 – 0,95%, com valor médio de 0,21% e divergências interespecíficas entre 3,1 – 16,07%, com valor médio de 6,94%) do que as do filo Rhodophyta (divergências intraespecíficas entre 0 – 1,39%, com valor médio de 0,22% e divergências interespecíficas entre 6,91 – 18,86%, com valor médio de 13,94%), enquanto que os resultados obtidos por Saunders (2005) e McDevit e Saunders (2009) mostram valores de divergência intraespecífica mais elevados no filo Heterokontophyta (0 – 0,46%) do que no filo

Rhodophyta (0 – 0,3%) e valores de divergência interespecífica menores no filo Heterokontophyta (3,04% - 10,8%) do que no filo Rhodophyta (4,5% - 13,6%).

No global, obtiveram-se 19 grupos monofiléticos na árvore de *barcodes* referente ao filo Rhodophyta e 13 grupos monofiléticos na árvore de *barcodes* referente ao filo Heterokontophyta. No geral, os *taxa* monofiléticos terminais também se agruparam em nós mais profundos de acordo com a sua hierarquia taxonômica familiar e ordinal. Tanto nas árvores NJ como nas árvores ML não foi praticamente observada qualquer sobreposição entre diferentes clados. Contudo, foram verificadas cinco exceções a este padrão em ambas as árvores relativas ao filo Rhodophyta:

- Na árvore NJ, a espécie *Dasya corymbifera* (ordem Ceramiales, família Dasyaceae, gênero confirmado por similaridade molecular de 100% com *Dasya* sp.) tem um ancestral mais próximo da espécie *Callithamnion granulatum* (ordem Ceramiales, família Callithamniaceae) com um suporte do nó de 54% do que da espécie da mesma família *Heterosiphonia crispella* (gênero confirmado por similaridade molecular de 87,25% com *Heterosiphonia callithamnion*). Apesar da elevada divergência interespecífica que separa estes 3 indivíduos, a ainda maior e curiosa divergência molecular de *Dasya corymbifera* com *Heterosiphonia crispella* é também comprovada por Sherwood *et al.* (2010), apesar de sustentar as suas observações a partir de apenas um espécime de *Heterosiphonia crispella* (atribuição ao nível da espécie por confirmar). Será necessário um maior número de indivíduos de cada uma destas espécies e de outras espécies congênicas para compreender e concluir algo sobre as estruturas evolutivas formadas.
- Um espécime de *Hypnea musciformis* e dois espécimes de *Champia parvula* apresentam uma elevada divergência relativamente aos seus consespecíficos (16,4%, 6,7% e 7,5%, respectivamente) embora se encontrem inseridos nos clados dos respectivos gêneros e famílias. Dado não ser conhecido nenhum caso documentado com rigor relativamente a tão elevada divergência consespecífica dos DNA *barcodes* de macroalgas (Saunders 2005; McDevit e Saunders 2009), é provável que esta divergência decorra da existência de

espécies crípticas em *Hypnea musciformis* e *Champia parvula* ou de um eventual erro de identificação. É possível que se trate de um eventual equívoco na identificação morfológica, dado que Sherwood *et al.* (2010) obteve o mesmo resultado dentro da análise dos géneros referidos com as mesmas sequências, no qual os espécimes se distanciam do grupo consespecífico a uma divergência demasiado elevada para serem considerados como pertencentes a espécies crípticas, tendo como base os valores de divergência interespecífica conseguidos por Saunders (2005) e os deste estudo. O mesmo autor verificou que certas espécies de Rhodophyta provenientes das ilhas do Hawaii formavam clados intraespecíficos distintos entre si, defendendo que podiam estar associados a novas espécies para a flora marinha reportada até então para a região do Hawaii e, eventualmente, novas espécies para a Ciência. Para além disso, o autor concluiu que se deve possuir um conhecimento mais alargado da plasticidade fenotípica para cada espécie, dado que todas as suas identificações tiveram apenas como base a morfologia e anatomia das macroalgas descritas num conjunto bibliográfico limitado.

- Dois espécimes de *Asparagopsis taxiformis* apresentam uma divergência acima da média em relação ao grupo monofilético consespecífico (2% e 5,5%), embora se encontrem inseridos no clado do género *Asparagopsis* e dentro da ordem Bonnemaisoniales. Tendo em conta que o espécime que apresenta 5,5% de divergência é o único que corresponde realmente à espécie *Asparagopsis taxiformis* (EU146156 – 100% de similaridade molecular com *Asparagopsis taxiformis*), é provável que as divergências dos restantes espécimes do clado decorram da existência de novas espécies do género *Asparagopsis*, não só pelas razões descritas no ponto anterior (Sherwood *et al.* 2010), mas também porque os seus valores de divergência são superiores ao valor de divergência interespecífica mínima para Rhodophyta especificada no estudo de Saunders (2005). Para além disso, as similaridades moleculares desses espécimes na BOLD correspondem a 98,27% e 99,84% da espécie *Asparagopsis sp.1Jeju* (para EU146148/EU146140 e JN642177, respectivamente).
- Dois espécimes de *Gelidium crinale* integrados dentro do clado do género *Gelidium* apresentam uma divergência acima da média em relação aos seus

consespecíficos (entre 2 e 2,2%) e uma divergência de 1,2% entre eles. Segundo Freshwater *et al.* (2010) e Kim e Boo (2012), é provável que esta divergência decorra do facto de diferentes indivíduos de *Gelidium crinale* apresentarem variabilidade genética dependendo da sua distribuição geográfica oceânica, estruturando-se dentro da árvore em clados distintos consoante a sua origem, como se pode observar através da divergência entre o clado de Porto Rico e Costa Este dos Estados Unidos da América (Oceano Atlântico) e o clado de Austrália (Oceano Pacífico). Não se registou esse factor de divergência relativamente à outra espécie estudada por Kim e Boo (2012), *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis. Contudo, tendo em conta que a espécie *Gelidium pusillum* está apenas reportada para a Europa e costa Este dos Estados Unidos da América (Oceano Atlântico), não é realmente possível concluir se a divergência genética dependente da distribuição geográfica oceânica ocorre em mais alguma espécie do género *Gelidium* para além de *Gelidium crinale*. Para além disso, Freshwater *et al.* (2010) conclui que o COI é um excelente marcador molecular para discernir espécies dentro da ordem Gelidiales, mesmo quando estas são muito próximas entre si (como, por exemplo, o caso de *Gelidium pristoides* (Turner) Kützinger e *Gelidium foliaceum* (Okamura) E.M.Tronchin).

Relativamente aos dados fornecidos através dos diferentes modelos de reconstrução filogenética NJ e ML, estes revelaram-se concordantes, apresentando o mesmo número de grupos monofiléticos e graus de suporte dos nós similares (principalmente em níveis taxonómicos inferiores), afirmando de igual forma o poder de discernimento dos DNA *barcodes* de COI (Figuras 9 a 12). Contudo, verificou-se a ocorrência de uma excepção nesta concordância no caso do filo Heterokontophyta: a *Zonaria tournefortii* (Dictyotaceae) partilha um ancestral comum com *Bachelotia antillarum* (Bachelotiaceae) na árvore NJ (embora com um valor de suporte do nó de 12%), enquanto que na árvore ML (Anexo/Imagem I2) a mesma espécie partilha um ancestral comum com *Padina gymnospora*, ambas pertencentes à mesma família e com um valor de suporte do nó de 83%.

Quanto à avaliação da congruência entre a identificação taxonómica prévia das macroalgas recolhidas e a identificação molecular com base na sua similaridade face a espécies mais próximas presentes na base de dados BOLD-IDS, não foi possível encontrar sequências suficientemente similares (>98,5% em sequências com um mínimo de 658 pb) que permitissem uma confirmação de identificação das espécies *Callithamnion granulatum*, *Gelidium microdon* e *Petalonia binghamiae*. A espécie *Callithamnion granulatum* foi confirmada apenas ao nível do género, apresentando 94,28% de similaridade com a espécie *Callithamnion stuposum*, no entanto é impossível associar a amostra em questão a uma determinada espécie. Contudo, manteve-se o nome científico inicialmente adoptado devido à confirmação quanto ao género e à inexistência de qualquer sequência COI publicada de *Callithamnion granulatum* para efeitos de comparação. Relativamente à espécie *Gelidium microdon*, apesar de a avaliação de similaridades moleculares ter sido apenas conclusiva quanto ao género a que pertence (87,17% com *Gelidium* sp.), o seu nome não foi alterado dada a sua localização dentro do clado do género *Gelidium* (embora com apenas 27% como valor de suporte do respectivo nó) e devido à inexistência de qualquer sequência COI publicada de *Gelidium microdon* para efeitos de comparação. Uma vez mais, o estado prematuro actual da identificação molecular de macroalgas através de COI impossibilita uma determinação taxonómica mais precisa do espécime em questão. Quanto à espécie *Petalonia binghamiae*, o seu nome científico foi mantido porque apresenta similaridade relativamente ao género (100% com *Petalonia* sp. e 91,18% com *Petalonia fascia*) de acordo com a BOLD-IDS e à sua localização dentro das árvores de DNA *barcodes* deste estudo, onde se verifica a sua ligação ao género *Petalonia* com um valor de suporte alto e uma elevada divergência quanto à espécie *Petalonia fascia* (10,1%). Dado que a espécie *Petalonia binghamiae* é a única correspondente ao género *Petalonia* descrita na região geográfica dos Açores e tendo em conta a relativa facilidade na sua identificação morfológica macroscópica, optou-se por manter a nomenclatura adoptada no início deste estudo.

Antes de dar início às análises fitoquímicas das espécies de algas marinhas recolhidas colectou-se uma espécie de macroalga adicional que pudesse funcionar como alga padrão para o desenvolvimento das metodologias, uma vez que para as algas em

estudo não foram encontrados referências na literatura que pudessem nortear o trabalho experimental. A espécie selecionada foi o *Fucus vesiculosus*, não só devido à sua abundância no litoral Norte de Portugal Continental e facilidade de identificação taxonómica, bem como é uma espécie amplamente estudada em diversos pontos geográficos do mundo na área da análise e quantificação fitoquímica, constituindo assim uma importante ferramenta de avaliação dos resultados finais deste estudo (Deal *et al.* 2003; Saha *et al.* 2011). Todas as amostras foram liofilizadas no início do protocolo de forma a permitir uma melhor preservação dos extractos durante o armazenamento (para além de não ser possível proceder ao trabalho experimental logo após a recolha dos espécimes), reduzindo a possibilidade de ocorrer alterações, como por exemplo, hidrólises ou evaporação de solvente (Valentão *et al.* 2010).

A técnica de HPLC é um tipo de cromatografia líquida em que a fase móvel é constituída por um líquido e a fase estacionária por um sólido. Esta técnica permite várias aplicações em diferentes áreas, embora seja primariamente utilizada para analisar o conteúdo químico de uma solução complexa, promovendo a separação dos vários componentes através da diferença de afinidades relativamente à fase estacionária e natureza dos eluentes. Em relação à análise de compostos fenólicos dos espécimes de macroalgas, a ausência de compostos e/ou inaptidão de leitura dos perfis fenólicos deveram-se provavelmente ao baixo valor de massa algal processada na extracção (0,3g e 1g apenas na amostra de *Fucus vesiculosus*), o que resultou em amostras com concentrações demasiado reduzidas para serem analisadas e identificadas. Este facto será um aspecto inerente às algas em estudo, que apresentarão teores muito reduzidos de compostos fenólicos, quando comparados com os teores verificados normalmente nas plantas superiores (Plouguerné *et al.* 2010). Para além disso, existem estudos em que não é sequer possível concluir quais as razões que impedem o registo de compostos fenólicos por HPLC (Valentão *et al.* 2010).

A técnica de GC é um tipo de cromatografia por partição em que a fase móvel é constituída por um gás e a fase estacionária é constituída por um líquido. A técnica GC é utilizada para análise lipídica na qual os ácidos gordos não-voláteis são quimicamente convertidos nos seus compostos metil-esterificados voláteis

correspondentes. Existem muito poucos dados relativamente a análises efectuadas em macroalgas marinhas com recurso a GC e os poucos estudos que têm como objectivo a identificação de compostos do perfil lipídico de macroalgas normalmente focam-se em apenas uma ou duas espécies diferentes (Valentão *et al.* 2010). Porém, o sucesso na aquisição dos perfis cromatográficos permitiu estabelecer algumas comparações pertinentes, embora se verifique que a análise de amostras com concentrações mais elevadas poderia trazer novos dados até então impossíveis de reter, nomeadamente no caso das espécies *Corallina caespitosa*, *Cladostephus spongiosus* e *Colpomenia sinuosa*. A prova dessa afirmação reside no caso do perfil cromatográfico de *Fucus vesiculosus*, dentro do qual a larga variedade de ácidos gordos exclusivos no filo Heterokontophyta pode ser mais derivado do maior valor de massa algal utilizado nas extracções do que propriamente da sua caracterização fitoquímica específica.

Embora não exista qualquer suporte nos dados observados que permita diferenciar macroalgas de diferentes filios, é possível confirmar uma maior presença/concentração geral de ácidos gordos com tempo de retenção maior do que 21 minutos (tempo de retenção médio do composto C18:1n9c/t) nas espécies do filo Heterokontophyta do que Rhodophyta. Contudo, esta mesma observação permite a diferenciação entre perfis lipídicos de espécies de macroalgas vermelhas de famílias completamente distintas. Neste caso em concreto, a espécie *Gelidium microdon* (família Gelidiaceae) é a única espécie que possui C18:2n6c, C20:3n3 e C20:5n3 na sua composição, *Plocamium cartilagineum* (família Plocamiaceae) é a única espécie que possui C18:2n6t na sua composição e *Pterocladella capillacea* (família Pterocladaceae) é a única espécie que possui C20:2c. Numa situação algo similar de diferenciação entre perfis lipídicos, dentro do filo Heterokontophyta o composto C18:3n3 é exclusivamente identificado nas espécies *Cystoseira humilis*, *Fucus spiralis*, *Fucus vesiculosus* e *Sargassum vulgare*, todas elas pertencentes à ordem Fucales. Embora esta seja uma observação importante, não existe qualquer outro factor que delimite este grupo de outros ou que una as espécies que o representam entre si, sendo possível que esta observação seja simplesmente coincidente.

Na análise de resultados entre indivíduos pertencentes ao mesmo género, foi possível verificar que a topologia dos gráficos e identificação dos respectivos picos são similares nas espécies do género *Asparagopsis*, embora estes perfis apenas apresentem a estrutura lipídica base de quase todas as macroalgas deste estudo, o que invalida qualquer espécie de delimitação deste género perante outros. Para além disso, o facto de os indivíduos pertencentes aos géneros *Fucus* e *Halopteris* possuírem um grande número de diferenças interespecíficas congénicas anula a possibilidade de concluir qualquer associação plausível entre composição lipídica e identificação molecular entre espécies ou géneros.

Apesar de todas estas observações revelarem traços e analogias de interesse para futuros estudos, existem inúmeros aspectos que não foram possíveis de integrar no âmbito deste estudo de forma a confirmar relações intra e interespecíficas associando a identificação morfológica e molecular com o estudo fitoquímico de espécies de macroalgas vermelhas e castanhas, entre os quais a necessidade de maior variabilidade e número de espécies/géneros/famílias em estudo, a repetição na análise das amostras, o recurso a mais métodos de análise fitoquímica para assegurar perfis mais detalhados e, por último, a quantificação dos compostos identificados em cada perfil, sendo um requisito obrigatório no âmbito de um estudo baseado em descrições e relações taxonómicas para identificações discriminatórias e delimitativas (Teixeira e Kelecom 1988; Teixeira *et al.* 1990; De-Paula *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2001; Cavalcanti *et al.* 2006; De-Paula *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2007).

6. Conclusão

Através da análise das árvores de DNA *barcodes* foi possível confirmar o poder discriminatório dos DNA *barcodes* de COI quanto à delimitação da classificação das espécies entre os vários níveis taxonómicos, tanto em relação ao filo Rhodophyta como ao filo Heterokontophyta. Esta afirmação parte da observação da topologia das árvores de DNA *barcodes*, na qual se verifica uma clara divisão entre diferentes géneros e famílias e a formação de grupos monofiléticos evidentes, conseguidas graças à baixa variabilidade intraespecífica e a larga diferença entre o valor máximo de divergência intraespecífica e o valor mínimo de divergência interespecífica congénica. Apesar da capacidade de discernimento do COI não ser universal, as suas raras lacunas permitem inferir conclusões importantes, como por exemplo a sugestão de ocorrência de uma separação incompleta de linhagens a partir de um ancestral comum recente ou de hibridização introgressiva no caso entre *Fucus vesiculosus* e *Fucus spiralis*. Contudo, as fronteiras na utilização do DNA *barcoding* em macroalgas constituem ainda um tópico em aberto devido à falta de valores de referência robustos a considerar, não só na análise de divergências de espécies crípticas dentro de um determinado grupo, como também na análise de divergências intraespecíficas em grupos de espécies com origens geográficas distintas. Apesar de uma amostragem geográfica limitada não invalidar necessariamente a metodologia do DNA *barcoding* (Moritz e Cicero 2004; Dasmahapatra e Mallet 2006; Ward *et al.* 2008), essa restrição pode em alguns casos, como os de *Gelidium crinale*, conduzir a conclusões erradas (tais como assumir a presença de espécies crípticas, novas espécies ou simples equívoco na identificação morfológica), atendendo às divergências evolutivas observadas.

Dentro do âmbito da pesquisa de sequências homólogas em bases de dados *online* foi possível confirmar a incipência na investigação de DNA *barcodes* em inúmeros grupos de macroalgas, reflectida por exemplo nos 10% de sequências de COI publicadas de espécies de macroalgas vermelhas e castanhas reportadas para Portugal, estando todas elas incluídas na biblioteca de referência deste estudo.

Foi também possível verificar durante este estudo que a plasticidade morfológica e a escassez de caracteres diagnosticantes típicos de grande parte das macroalgas são barreiras difíceis de superar quando se pretende descrever e caracterizar diferentes espécimes apenas com recurso à identificação morfológica, justificando assim os reduzidos números de descrição de novas espécies que se verificaram nas últimas décadas (Hornig e Schnetter 1988; De Clerck 2003). A utilização de DNA *barcoding* neste estudo provou a sua extrema importância na ultrapassagem desses obstáculos por permitir avaliar e confirmar as identificações atribuídas a alguns dos espécimes recolhidos no início deste estudo, pelo menos até ao nível do género (*Gelidium microdon*, *Callithamnion granulatum* e *Petalonia binghamiae*), após obtenção de dados moleculares, análise de divergências e similaridades moleculares e cruzamento desses mesmos dados com as observações da identificação morfológica, permitindo assim criar uma biblioteca de referência robusta e fiável.

O interesse nos organismos marinhos como fonte promissora de produtos com virtualidades farmacêuticas, alimentares e biotecnológicas tem aumentado ao longo dos anos (Lindequist e Schweder 2001; Newman *et al.* 2003; Mayer e Hamann 2005; Blunt *et al.* 2008; Jiao *et al.* 2011). A possibilidade de tirar partido da existência de metabolitos secundários específicos em espécies de macroalgas para efeitos de diferenciação taxonómica é uma realidade (Teixeira e Kelecom 1988; Teixeira *et al.* 1990; De-Paula *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2001; Cavalcanti *et al.* 2006; De-Paula *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2007), embora ainda se encontre num estado de desenvolvimento incipiente, devido à necessidade de cruzamento de dados relativos à identificação morfológica e molecular de um número representativo de populações de macroalgas provenientes de diversas regiões geográficas distintas. Apesar de o volume de resultados obtidos neste estudo ser necessariamente pequeno, é importante referir a obtenção de perfis lipídicos base e a observação de uma larga variedade de ácidos gordos em algumas espécies deste estudo como indicador da potencialidade destes organismos. Neste sentido, os estudos futuros deverão envolver um maior número de espécimes e variedade de espécies, a quantificação dos compostos identificados em cada perfil e o recurso a um maior número de métodos de análise fitoquímica,

evidentemente suportados por uma biblioteca de referência de DNA *barcodes* mais abrangente e actualizada.

Em conclusão, tendo em conta a elevada plasticidade morfológica e escassez de caracteres diagnosticantes nas macroalgas vermelhas e castanhas, aliada à potencial variabilidade genética e diversidade dos perfis fitoquímicos consoante a origem geográfica dos espécimes, é imperativo reforçar a compilação de DNA *barcodes* de macroalgas provenientes da costa Portuguesa. Tal permitirá aferir a biblioteca de referência de DNA *barcodes* e os perfis fitoquímicos obtidos para cada espécie de forma mais apurada e robusta. Adicionalmente, com base em divergências padronizadas e linhagens evolutivas bem representadas, seria possível não só reconhecer com maior segurança a ocorrência de espécies crípticas ou de novas espécies para a Ciência, como também assegurar que entre as espécies de macroalgas presentes na costa Portuguesa algumas se possam tornar uma fonte tecnicamente viável e economicamente acessível de compostos bioactivos de interesse biotecnológico e farmacêutico, podendo levar a uma maior dinamização na exploração da riqueza de recursos marinhos Portugueses até hoje pouco aproveitados.

7. Referências bibliográficas

Abreu, M. H., Pereira, R., Sousa-Pinto, I. & Yarish, C. (2011). Ecophysiological studies of the non-indigenous species *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta) and its abundance patterns in Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *European Journal of Phycology* 46(4): 453-464.

Adler, F. & Karban, R. (1994). Defended fortresses or moving targets—another model of inducible defenses inspired by military metaphors. *The American Naturalist* 144:813–32.

Agapow, P. M., Bininda-Emonds, O. R. P., Crandall, K. A., Gittleman, J. L., Mace, G. M., Marshall, J. C. & Purvis, A. (2004). The impact of species concept on biodiversity studies. *Quarterly Review of Biology* 79:161–79.

Agrawal, A. (1998). Induced response to herbivory and increased plant performance. *Science* 279:1201–2.

Agrawal, A. & Karban, R. (1999). Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In Tollrian, R. & Harvell, C. [Eds.] *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 45–61.

Alvarado, A. & Gerwick, W. (1985). Dictyol H, a new tricyclic diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota dentata* Lamouroux. *Journal of Natural Products* 48:132–134.

Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S. & Mayol, L. (1980). Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. *Tetrahedron Letters* 36:1409–1414.

Appel, H., Govenor, H., D'Ascenzo, M., Siska, E. & Schultz, J. (2001). Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of Chemical Ecology* 27:761–778.

Appeltans, W. *et al.* (eds) (2010). World register of marine species. <http://www.marinespecies.org>. Visitado a 03 Fevereiro 2012.

Araújo, R., Bárbara, I., Santos, G., Rangel, M. & Sousa Pinto, I. (2003). *Fragmenta Chorologica Occidentalia, Algae*, 8572-8640. In: (Eds) Vol.60, pp. 405-409.

Araújo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Diaz-Tapia, P., Pereira, R., Santos, R. & Sousa-Pinto, I. (2009). Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52:24-46.

André, F. (1970). Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. I. La flore. *Portugaliae Acta Biologica, Série B, Sistemática, Ecologia, Biogeografia e Paleontologia* 10:137-555.

Arnold, T. & Targett, N. (2000). Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *Journal of Chemical Ecology* 26:1393–1410.

Audiffred, P. & Weisscher, F. (1984). Marine algae of Selvagem Grande (Salvage Islands, Macaronesia). *Boletim do Museu Municipal do Funchal* 36:5-37.

Baldwin, I. (1998). Jasmonate induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:8113–8.

Barbosa, J., Teixeira, V. & Pereira, R. (2004). A dolabellane diterpene from the brown alga *Dictyota pfaffii* as chemical defense against herbivores. *Botanica Marina* 47:147–151.

Barbosa, J., Fleury, B., da Gama, B., Teixeira, V. & Pereira, R. (2007). Natural products as antifoulants in a brazilian brown alga *Dictyota pfaffii* (Phaeophyta, Dictyotales). *Biochemical Systematics and Ecology* 35:549–553.

Barrett, R. D. H. & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83:481–491.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York. pp 1-20.

Beech, I. & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* 15:181–186.

Billard, E., Serrão, E.A., Pearson, G.A., Engel, C.R., Destombe, C. & Valero, M. (2006). Analysis of sexual phenotype and prezygotic fertility in natural populations of *Fucus spiralis*, *F. vesiculosus* (Fucaceae, Phaeophyceae) and their putative hybrids. *European Journal of Phycology* 40(4):397-407.

Bittner, L., Payri, C.E., Couloux, A., Cruaud, C., Reviers B. & de Rousseau, F. (2008). Molecular phylogeny of the Dictyotales and their position within the Phaeophyceae, based on nuclear, plastid and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(1):211-226.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. (2008). Marine natural products. *Natural Products Reports* 25:35-94.

Braune, W. & Guiry, M. D. (2011). Seaweeds: A colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans. *A.R.G. Gantner Verlag K.G.*, Ruggell, pp 16-29.

Cabanes, J., Chazarra, S. & García-Carmona, F. (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46:982–985.

Cairrao, E., Pereira, M. J., Morgado, F., Nogueira, A. J. A., Guilhermino, L. & Soares, A. M. V. M. (2009). Phenotypic variation of *Fucus ceranoides*, *F. spiralis* and *F. vesiculosus* in a temperate coast (NW Portugal). *Botanical Studies* 50:205-215.

Canovas, F., Mota, C., Ferreira-Costa, J., Serrão, E., Coyer, J. Olsen, J. & Pearson, G (2011). Development and characterization of 35 single nucleotide polymorphism markers for the brown alga *Fucus vesiculosus*. *European Journal of Phycology* 46(4):342-351.

Carvalho, G. R. (1998). Molecular ecology: origins and approach. In: Carvalho GR (ed) *Advances in molecular ecology*. *IOS Press*, Amsterdam.

Cavalcanti, D., Rezende, C., Pinto, A. & Teixeira, V. (2006). Diterpenoid constituents from the brown alga *Dictyota menstrualis* (Dictyotaceae, Phaeophyta). *Natural Products Communication* 1:609-611.

Ceh, J., Molis, M., Dzeha, T. & Wahl, M. (2005). Induction and reduction of anti-herbivore defenses in brown and red macroalgae of the Kenyan coast. *Journal of Phycology* 41:726–731.

Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G. & Bilaloglu, R. (2009). Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocyte in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 47:796–801.

Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world. Report for the Australian biological resources study. Department of the Environment, Water, Heritage and Arts of the Australian Government, Canberra.

Chester, C. & Stott, J. (1956). The production of antibiotic substances by seaweeds. *International Seaweed Symposium*, pp 49-53.

Clare, E. L., Lim, B. K., Engstrom, M. D., Eger, J. L. & Hebert, P. D. N. (2007). DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7:184–190.

Clarkston, B. E. & Saunders, G. W. (2012). An examination of the red algal genus *Pugetia* (Kallymeniaceae, Gigartinales), with descriptions of *Salishia firma* gen. & comb. nov., *Pugetia cryptica* sp. nov. and *Beringia wynnei* sp. nov. *Phycologia* 54(1):33-61.

Clausen, T., Provenza, F., Burritt, E., Reichardt, P. & Bryant, J. (1990). Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *Journal of Chemical Ecology* 16:2381–2392.

Clayden, S. L. & Saunders, G. W. (2010). Recognition of *Rubrointrusa membranacea* gen. et comb. nov., *Rhodonematella subimmersa* gen. et comb. nov. (with a reinterpretation of the life history) and the Meiodiscaceae fam. nov. within the Palmariales (Rhodophyta). *Phycologia* 49(3):283-300.

Conover, J. & Sieburth, J. (1964). Effect of *Sargassum* distribution on its epibiota and antibacterial activity. *Botanica Marina* 6:147-157.

Costa, E. S., Plastino, E. M., Petti, R., Oliveira, E. C. & Oliveira, M. C. (2012). The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of Sao Paulo, Brazil - a DNA barcoding approach. *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, 6:1643-1653.

Costa, F. O. & Carvalho, G. R. (2007). The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. *Genomics, Society and Policy* 3:29-40.

Costa, F. O., deWaard, J. R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Hajibabaei, M. & Hebert, P. D. N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64:272–295.

Costa, F. O., Henzler, C. M., Lunt, D. H., Whiteley, N. M. & Rock, J. (2009). Probing marine *Gammarus* (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity* 7(4):365-379.

Costa, F. O. & Carvalho, G. R. (2010). New insights into molecular evolution: prospects from the Barcode of Life Initiative (BOLI). *Theory in Biosciences* 129:149-157.

Costa, F. O. & Antunes, P. M. (2012). The contribution of the Barcode of Life initiative to the discovery and monitoring of Biodiversity. In: Mendonca A, Cunha A, Chakrabarti R (eds) *Natural Resources, Sustainability and Humanity - A Comprehensive View*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp 37-68.

Cremades, J., Bárbara, I., Veiga, A. J. & López Rodríguez, M. C. (2002). Fragmenta Chorologica Occidentalia, Algae, 7776-7812. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 59(2):292-297.

Cremades, J., Barreiro, R., Maneiro, I. & Saunders, G. W. (2011). A new taxonomic interpretation of the typus of *Plocamium cartilagineum* (Plocamiales, Florideophyceae) and its consequences. *European Journal of Phycology*, 46(2):125-142.

Cronin, G. (2001). Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. In McClintock, J. & Baker, B. [Eds.] *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 325-53.

Dasmahapatra, K. K. & Mallet, J. (2006). DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97:254-255.

De Clerck, O. & Coppejans, E. (1999). Two new species of *Dicyota* (Dictyotales, Phaeophyta) from the Indo-Malayan region. *Phycologia* 38:184–94.

De Clerck, O. (2003). The Genus *Dicyota* in the Indian Ocean. National Botanic Garden, Belgium, Meise, 205 pp.

De Clerck, O., Gavio, B., Fredericq, S., Bárbara, I. & Coppejans, E. (2005). Systematics of *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *rbcl* sequence analyses and morphological evidence, including the reinstatement of *G. minima* and the description of *G. capensis* sp. nov. *Journal of Phycology* 41:391-410.

De Mesquita Rodrigues, J. (1963). Contribuição para o conhecimento das Phaeophyceae da Costa Portuguesa. *Memórias da Sociedade Broteriana* 16:5-124.

Deal, M., Hay, M., Wilson, D. & Fenical, W. (2003). Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 136:107-114.

De-Paula, J., Pedrini, A., Pinheiro, M., Pereira, R. & Teixeira, V. (2001). Chemical similarity between the brown algae *Dicyota cervicornis* and *D. pardalis* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology* 29:425-427.

De-Paula, J., Bueno, L., Frugulhetti, I., Yoneshigue-Valentin, Y. & Teixeira, V. (2007). *Dicyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Botanica Marina* 50:288-293.

DeSalle, R. (2006). Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. *Conservation Biology* 20(5):1545-1547.

Duran, R., Zubia, E., Ortega, M. & Salva, J. (1997). New diterpenoids from the alga *Dicyota dichotoma*. *Tetrahedron* 53:8675–8688.

Einav, R. (2004). Seaweeds of the Eastern Mediterranean Coast. Bar Ilan University Press, Israel. pp 10-35.

Emerson, G. & Taft, C. (1945). Pharmacologically active agents from the sea. *Texas Reports on Biology and Medicine* 3:302-338.

Engelen, A. H., Espirito-Santo, C., Simões, T., Monteiro, C., Serrão E. A., Pearson, G. A. & Santos, R. O. P. (2008). Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *European Journal of Phycology* 43(3):275-282.

Enoki, N., Tsuzuki, K., Omura, S., Ishida, R. & Matsumoto, T. (1983). New antimicrobial diterpenes, dictyol F and epidictyol F, from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Chemistry Letters* 12:1627-1630.

FAO (2010). World Review of Fisheries and Aquaculture – The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. pp 19-25.

Fayaz, M., Namitha, K., Chidambara Murthy, K., Mahadeva Swamy, M., Sarada, R. & Salma, K. (2005). Chemical composition, iron bioavailability, and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezzi* (Doty). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:792–797.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Finer, J., Clardy, J., Fenical, W., Minale, L., Riccio, R., Battaile, J., Kirkup, M. & Moore, R. E. (1979). Structures of dictyodial and dictyolactone, unusual marine diterpenoids. *Journal of Organic Chemistry* 44:2044–2047.

Freitas, O., Oliveira, A., De-Paula, J., Pereira, R., Cavalcanti, D. & Teixeira, V. (2007). Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota mertensii* (Dictyotaceae, Phaeophyta). *Natural Products Communications* 2:13-15.

Freshwater, D., Tudor, K., O’Shaughnessy, K. & Wysor, B. (2010). DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: comparison of COI with *rbcL* and verification of the “barcoding gap”. *Cryptogamie, Algologie* 31(4):435-449.

Gabrielson, P. W., Widdowson, T. B. & Lindstrom, S. C. (2006). Keys to the seaweeds and seagrasses of southeast Alaska, British Columbia, Washington and Oregon. *Phycological Contribution* 7. Department of Botany, University of British Columbia. iv + 209 pp.

Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spano, A., Morabito, M. & Maugeri, T.L. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine Environmental Research* 73:1-6.

Gil-Rodríguez, M. & Afonso-Carrillo, J. (1980). Adiciones al la flora y catálogo ficológico para la isla de Lanzarote. *Vieraea* 10:59-70.

Gómez Garreta, A., Ribera, M.A., Barceló, M.C. & Rull Lluch, J. (2002). Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XVI. *Dictyopteris polypodioides* (DC.) Lamour. y *Spatoglossum solieri* (Chauv. ex Mont.) Kütz. (Dictyotales, Fucophyceae). *Botanica Complutensis* 26:153-160.

Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. pp. 640.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.

Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2012). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 25 September 2012.

Gulbransen, D. J., McGlathery, K. J., Marklund, M., Norris, J. N. & Gurgel, C. F. D. (2012). *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: COX1 analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *Journal of Phycology* 48:1278–1283.

Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W. & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103:968–971.

Hardt, I., Fenical, W., Cronin, G. & Hay, M. (1996). Acutilols, potent herbivore feeding deterrents from the tropical brown alga, *Dictyota acutiloba*. *Phytochemistry* 43:71-73.

Haroun, R. J., Cruz-Reyes, A., Herrera-López, G., Parente, M. I. & Gil-Rodríguez, M. C. (2002). Flora marina de la isla de Madeira: resultados de la expedición "Macaronesia 2000". *Revista de la Academia Canaria de Ciencias* 14:37-52.

Harvell, C. & Tollrian, R. (1999). Why inducible defenses? In Tollrian, R. & Harvell, C. D. [Eds.] *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Chichester, UK, pp. 3–9.

Hay, M. (1996). Marine chemical ecology: what is known and what is next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200:103–134.

Hay, M. & Fenical, W. (1988). Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 19:111–145.

Hay, M. & Fenical, W. (1996). Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography* 9:10–20.

Hebert, P. D. N., Cysinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003a). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:313–21.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:596–599.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004a). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:14812–14817.

Herbert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004b). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2:312.

Honkanen, T., Jormalainen, V., Hemmi, A., Mäkinen, A. & Heikkilä, N. (2002). Feeding and growth of the isopod *Idotea baltica* on the brown alga *Fucus vesiculosus*: Roles of inter-population and within-plant variation in plant quality. *Ecoscience* 9:332–338.

Hornig, I. & Schnetter, R. (1988). Notes on *Dictyota dichotoma*, *Dictyota menstrualis*, *Dictyota indica* and *Dictyota pulchella* spec. nova (*Phaeophyta*). *Phyton (Austria)* 28:277–91.

Hornsey, I. & Hide, D. (1976). The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics. *British Phycological Journal* 11:63-67.

Hornsey, I. & Hide, D. (1985). The production of antimicrobial compounds by British marine algae. IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation. *British Phycological Journal* 20:21-25.

<http://www.marinebarcoding.org/> © Biodiversity Institute of Ontario, 2012. Website managed by Bethany Deshpande; searched on 14 March 2012.

Hunt, J. W. (1978). Algal biochemical tricks and classification. *The American Biology Teacher* 40:528–31.

Ishitsuka, M., Kusumi, T. & Kakisawa, H. (1988). Antitumor xenicane and norxenicane lactones from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *The Journal of Organic Chemistry* 53:5010–5013.

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs* 9:196-223.

John, D. M., Prud'homme van Reine, W. F., Lawson, G. W., Kostermans, T. B. & Price, J. H. (2004). A taxonomic and geographical catalogue of the seaweeds of the western coast of Africa and adjacent islands. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 127:1-339, 1 fig.

Jongaramruong, J. & Kongkam, N. (2007). Novel diterpenes with cytotoxic, anti-malarial and anti-tuberculosis activities from a brown alga *Dictyota* sp. *Journal of Asian Natural Products Research* 9:743–751.

Karban, R. (1993). Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology* 74:9–19.

Karban, R., Agrawal, A., Thaler, J. & Adler, L. (1999). Induced plant responses and information content about risk of herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14:443–447.

Kim, D., Kim, S., Chung, J., Kim, K., Eun, H. & Park, K. (2002). Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal* 14:779-785.

Kim, J. Y., Alamsjah, M. A., Hamada, A., Fujita, Y. & Ishibashi, F. (2006). Algicidal diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70:2571–2574.

Kim, K. M. & Boo, S. M. (2012). Phylogenetic relationships and distribution of *Gelidium crinale* and *G. pusillum* (Gelidiales, Rhodophyta) using *cox1* and *rbcL* sequences. *Algae* 27(2):83-94.

Kim, S. J., Woo, S., Yun, H., Yum, S., Choi, E., Do, J. R., Jo, J. H., Kim, D., Lee, S. & Lee, T. K. (2005). Total phenolic contents and biological activities of Korean seaweed extracts. *Food Science and Biotechnology* 14:798–802.

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

Knowlton, N. & Weigt, L. A. (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:2257-2263.

Kucera, H. K. & Saunders, G. W. (2008). Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany* 86:1065-1079.

Kucera, H. K. & Saunders, G. W. A floristic survey of Canadian *Porphyra* and *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) species based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity (In review).

Lane, C. E., Lindstrom, S. C. & Saunders, G. W. (2007). A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(2):634-648.

Le Gall, L. & Saunders, G. W. (2010). DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *Journal of Phycology* 46:374-389.

Le Gall, L. & Saunders, G. W. Establishment of a DNA-barcode library for the Nemaliales (Rhodophyta) from Canada and France uncovers overlooked diversity in the species *Nemalion helminthoides* (Velley) Batters. *Cryptogamie, Algologie* (In review).

Levring, T. (1974). The marine algae of the Archipelago of Madeira. *Boletim Museu Municipal do Funchal* 28:5-111.

Lindequist, U. & Schweder, T. (2001). Marine biotechnology. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 441-484.

Lindstrom, S. C. (2008). Cryptic diversity and phylogenetic relationships within the *Mastocarpus papillatus* species complex (Rhodophyta, Phyllophoraceae). *Journal of Phycology* 44:1300-1308.

Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P. B., Valentao, P., Ferreres, F. & Mouga, T. (2011). Sterol profiles in 18 macroalgae of the Portuguese coast. *Journal of Phycology* 47(5):1210-1218.

Lynch, M. D. J., Lindstrom, S. C., Muller, K. M. Biology (2010). Submissão directa de sequência para NCBI.

Mabeu, S. & Kloareg, B. (1987). Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*. *Journal of Experimental Botany* 38:1573–1580.

Maeda, H., Tsukui, T., Sashima, T., Hosokawa, M. & Miyashita, K. (2008). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17:19-69.

Mamoozadeh, N. R., Freshwater, D. W. & Tudor, K. (2010). Morphological and molecular assessment of *Polysiphonia* sensu lato species (Ceramiales, Florideophyceae) in Panama. Submissão directa de sequência para NCBI.

Matlock, D., Ginsburg, D. & Paul, V. (1999). Spatial variability in secondary metabolite production by the tropical red alga *Portieria hornemannii*. *Hydrobiologia* 399:267-273.

Matzen da Silva, J., Creer, S., dos Santos, A., Costa, A. C., Cunha, M. R., Costa, F. O. & Carvalho, G. R. (2011). Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *PLoS ONE* 6(5):e19449.

Mayer, A. M. S. & Hamann, M. T. (2005). Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140:265-286.

Mayer, A., Rodríguez, A., Berlinck, R. & Hamann, M. (2009). Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790:283–308.

McConnell, O. & Fenical, W. (1977). Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry* 16:367–374.

McDevit, D. & Saunders, G.W. (2009). On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (*Phaeophyceae*) including a novel extraction protocol. *Phycological Research* 57(2):131-141.

Milstein, D. & Saunders, G.W. (2012). DNA barcoding of Canadian Ahnfeltiales (Rhodophyta) reveals a new species - *Ahnfeltia borealis* sp. nov. *Phycologia* 51(3):247-259.

Moo-Puc, R., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. (2008). Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 120:92-97.

Moreau, J., Pesando, D. & Caram, B. (1984). Antifungal and antibacterial screening of Dictyotales from the French Mediterranean coast. *Hydrobiologia* 116(117):521-524.

Moritz, C. & Cicero, C. (2004). DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology* 2(10):e354.

Morrison, W. & Smith, L. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of Lipid Research* 5:600-608.

Neto, A.I. (1994). Checklist of the benthic marine macroalgae of the Azores. *Arquipélago. Ciências Biológicas e Marinhas* 12A:15-34.

Neto, A.I., Cravo, D.C. & Haroun, R.T. (2001). Checklist of the benthic marine plants of the Madeira Archipelago. *Botanica Marina* 44(4):391-414.

Neto, A., Tittley, I. & Raposeiro, P. (2005). Flora Marinha do Litoral dos Açores [Rocky Shore Marine Flora of the Azores]. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar. Horta, Portugal. pp 156.

Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1022-1037.

Nizamuddin, M. (1981). Contribution to the marine algae of Libya Dictyotales. *Bibliotheca Phycologica* 54:1-122, pls I-XXXIX, 1 map.

Ochi, M., Asao, K., Kotsuki, H., Miura, I. & Shibata, K. (1986). Amijitrienol and 14-deoxyisoamijiol, two new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota linearis*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 59:661-662.

Padmakumar, K. & Ayyakkannu, K. (1997). Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from southern coasts of India. *Botanica Marina* 40:507-515.

Palminha, F. (1971). Exploração e utilização de algas marinhas na plataforma portuguesa e nas ilhas do arquipélago dos Açores. *Junta Nacional do Fomento das Pescas* 7:25-36.

Parente, M.I., Gil-Rodríguez, M.C., Haroun, R.J., Neto, A.I., de Smedt, G., Hernández-González, C.L. & Berecibar Zugasti, E. (2000). Flora marina de las Ilhas Selvagens: resultados preliminares de la expedición "Macronesia 2000". *Revista de la Academia Canaria de Ciencias* 12(3-4):9-20.

- Parente, M.I., Neto, A.I. & Fletcher, R.L. (2003). Morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from the Azores. *Journal of Phycology* 39:353-359.
- Paul, V. & Fenical, W. (1986). Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Marine Ecology Progress Series* 34:157-169.
- Paul, V. & Fenical, W. (1987). Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the Phylum Chlorophyta. In: Scheuer, P. J. (Ed.). *Bioorganic marine chemistry*. v. I. Berlin: I. Springer-Verlag, pp 1-37.
- Paul, V., Littler, M., Littler & D., Fenical, W. (1987). Evidence for chemical defense in the tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpales: Chlorophyta): isolation of new bioactive sesquiterpenoids. *Journal of Chemical Ecology* 13:1171-1185.
- Paul, V. & Van Alstyne, K. (1988a). Antiherbivore defenses in *Halimeda*. In: International Coral Reef Symposium, 6, v. 3, 133-138.
- Paul, V. & Van Alstyne, K. (1988b). Chemical defense and chemical variation in some tropical Pacific species of *Halimeda* (Chlorophyta, Halimedaceae). *Coral Reefs* 6:263-270.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. & Aberg, P. (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 157:139-146.
- Pavia, H. & Toth, G. (2000a). Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology* 81:3212-3225.
- Pavia, H. & Toth, G. (2000b). Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia* 440:299-305.
- Peckol, P., Krane, J. & Yates, J. (1996). Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannins in the North Atlantic brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 138:209-217.

Pereira, H., Leão-Ferreira, L., Moussatché, N., Teixeira, V., Cavalcanti, D., Costa, L., Diaz, R. & Frugulhetti, I. (2004). Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *AntiViral Research* 64:69–76.

Pereira, L. & Mesquita, J.F. (2003). Carrageenophytes of occidental Portuguese coast: 1-spectroscopic analysis in eight carrageenophytes from Buarcos bay. *Biomolecular engineering* 2003:217-222.

Pereira, R., Cavalcanti, D. & Teixeira, V. (2000). Effects of secondary metabolites from the tropical Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*. *Marine Ecology Progress Series* 205:95–100.

Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I. (2008). Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. *European Journal of Phycology* 43(1):107-118.

Perrin, C., Daguin, C., Van de Vliet, M., Engel, C. R., Pearson, G. A. & Serrão, E. A. (2007). Implications of mating system for genetic diversity of sister algal species: *Fucus spiralis* and *Fucus vesiculosus* (Heterokontophyta, Phaeophyceae). *European Journal of Phycology* 42:219-230.

Plouguerné, E., Hellio, C., Cesconetto, C., Thabard, M., Mason, K., Veron, B., Pereira, R. & Da Gama, B. (2010). Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro (Brazil). *Journal of Applied Phycology* 22(6):717-724.

Price, J., John, D. & Lawson, G. (1986). Seaweeds of the western coast of tropical Africa and adjacent islands: a critical assessment. IV. Rhodophyta (Florideae). 1. Genera A-F. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany* 15:1-122, 1 fig.

Puglisi, M. & Paul, V. (1997). Intraspecific variation in secondary metabolite production in the red alga *Portieria hornemannii*: monoterpene concentrations are not influenced by nitrogen and phosphorus enrichment. *Marine Biology* 128:161–170.

Ragan, M. & Glombitza, K. (1986). Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycology Research* 4:129–241.

Rath, J. & Adhikary, S. (2007). Bioprospecting of marine Algae. In: Gupta, R.K., Pandey, V.D. (Eds.), *Advances in Applied Phycology*. Daya Publishing House, New Delhi, p. 300.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7(3):355-364.

Ribeiro, B., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M. & Andrade, P. B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology* 45:1805–1813.

Ribera, M. A., Gómez Garreta, A., Barceló, M. A. & Rull LLuch, J. (1996). Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. VIII. *Cystoseira* C. Agardh y *Sargassum* C. Agardh. *Botanica Complutensis* 20:89-103.

Robba, L., Russell, S. J., Barker, G. L. & Brodie, J. (2006). Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93:1101-1108.

Rodman, J. E. & Cody, J. H. (2003). The taxonomic impediment overcome: NSF's partnerships for enhancing expertise in taxonomy (PEET) as a model. *Systematic Biology* 52:428–435.

Rodriguez-Prieto, C. & Hommersand, M. H. (2009). Behaviour of the nuclei in pre- and postfertilization stages in *Kallymenia* (Kallymeniaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 48(3): 138-155, 90 figs, 1 table.

Rueness, J. (2005). Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia* 44: 120-128.

Rueness, J. (2010). DNA barcoding of select freshwater and marine red algae (Rhodophyta). *Cryptogamie, Algologie* 31(4):377-386.

Rull Lluch, J., Ribera, M. A., Barceló, M. C. & Gómez Garreta, A. (2005). Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XVIII. *Dictyota dichotoma*, *D. linearis* y *D. mediterranea* (Dictyotales, Fucophyceae). *Botanica Complutensis* 29:63-70.

Saha, M., Rempt, M., Grosser, K., Pohnert, G. & Weinberger, F. (2011). Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling* 27(4):423-433.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Saunders, G.W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1879-88.

Saunders, G. W. (2009). Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla*. *British Columbia Molecular Ecology Resources* 9 (SUPPL S1), 140-150.

Saunders, G. W. & McDonald, B. (2010). DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. nov. *Botany* 88:639-667.

Savage, J. M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience* 45:673-679.

Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M., Yumoto, I., Ezura, Y. & Christen, R. (1998). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:769–774.

Schmitt, T., Lindquist, N. & Hay, M. (1998). Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae. *Chemoecology* 8:125–131.

Schneider, C. W., Lane, C. E. & Saunders, G. W. (2010). Notes on the marine algae of the Bermudas. 11. More additions to the benthic flora and a phylogenetic assessment of *Halymenia pseudofloresii* (Halymeniales, Rhodophyta) from its type locality. *Phycologia* 49:154-168.

Schneider, C., Mcdevit, D., Saunders, G. W. & Lane, C. (2011). Notes on the marine algae of the Bermudas. 12. A phylogenetic assessment of *Nemastoma gelatinosum* M.

Howe (Rhodophyta, Nemastomatales) from its type locality. *Cryptogamie, Algologie*, 32(4): 313-325.

Sears, J. R. (ed) (2002). NEAS keys to benthic marine algae of the northeastern coast of North America from Long Island Sound to the Strait of Belle Isle. Second Edition. The Northeast Algal Society xvii + 161 pp.

Sherwood, A. R. (2008). Phylogeography of *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the Hawaiian Islands: two mtDNA markers support three separate introductions. *Phycologia* 47(1):79-88.

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

Shiino, M., Watanabe, Y. & Umezawa, K. (2001). Synthesis of N-substituted N-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorganic and Medical Chemistry* 9:1233–1240.

Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K., Lee, S. & Sato, H. (1998). The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. *Planta Medica* 64:408–412.

Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference, *Molecular Biology and Evolution* 16:1114-1116.

Shimogaki, H., Tanaka, Y., Tamai, H. & Masuda, M. (2000). *In vitro* and *in vivo* evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *International Journal of Cosmetic Science* 22:291–303.

Siamopoulou, P., Bimplakis, A., Iliopoulou, D., Vagias, C., Cos, P., Vanden Berghe, D. & Roussis, V. (2004). Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. *Phytochemistry* 65:2025–2030.

Sieburth, J. & Conover, J. (1965). *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature* 208:52–53.

Silberfeld, T., Leigh, J. W., Verbruggen, H., Cruaud, C., de Reviers, B. & Rousseau, F. (2010). A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta,

Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the “brown algal crown radiation”. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:659–674.

Sites, J. W. & Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35:199–227.

Smith, M. A., Fisher, B. L. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B* 360:1825–1834.

Sreenivasa Rao, P. & Parekh, K. (1981). Antimicrobial activity of Indian seaweed extracts. *Botanica Marina* 24:577–582.

Steinberg, P. (1988). The effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 120:221–382.

Steinberg, P. & van Altena, I. (1992). Tolerance of marine invertebrate herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia. *Ecological Monographs* 62:189–222.

Swanson, A. & Druehl, L. (2002). Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany* 73:241–253.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.

Tanaka, I. & Higa, T. (1984). Hydroxydictyodial, a new antifeedant diterpene from the brown alga *Dictyota spinulosa*. *Chemistry Letters* 2:231–232.

Targett, N., Coen, L., Boettcher, A. & Tanner, C. (1992). Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics: Evidence against a latitudinal trend. *Oecologia* 89:464–470.

Targett, N. & Arnold, T. (1998). Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *Journal of Phycology* 34:195–205.

Teasdale, B. W., West, A., Klein, A. S. & Mathieson, A. C. (2009). Distribution and evolution of variable group-I introns in the small ribosomal subunit of North Atlantic *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 44(2):171-182, 3 figs, 5 tables.

Teixeira, V. & Kelecom, A. (1988). A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Science of the Total Environment* 75:271-283.

Teixeira, V., Almeida, S. & Kelecom, A. (1990). Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma*. *Biochemical Systematics and Ecology* 18:87-92.

Teixeira, V., Cavalcanti, D. & Pereira, R. (2001). Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:313-316.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Tittley, I. & Neto, A. I. (1994). "Expedition Azores 1989": Benthic marine algae (seaweeds) recorded from Faial and Pico. Vol. 12A pp. 1-13.

Tittley, I. & Neto, A. I. (2005). The marine algal (seaweed) flora of the Azores: additions and amendments. *Botanica Marina* 48:248-255.

Tittley, I., Neto, A. I. & Parente, M. I. (2009). The marine algal (seaweed) flora of the Azores: additions and amendments 3. *Botanica Marina* 52:7-14.

Toste, M. F., Parente, M. I., Neto, A. I. & Fletcher, R. L. (2003). Life history of *Colpomenia sinuosa* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) in the Azores. *Journal of Phycology* 39:1268-1274.

Tringali, C., Piattelli, M., Nicolosi, G. & Hostettmann, K. (1986). Molluscicidal and antifungal activity of diterpenoids from brown algae of the family Dictyotaceae. *Planta Medica* 1986:404-406.

Tronholm, A., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., Verbruggen, H. & De Clerck, O. (2010). Niche partitioning and the coexistence of two cryptic *Dictyota* (Dictyotales, Phaeophyceae) species from the Canary Islands. *Journal of Phycology* 46(6):1075–1087.

Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., de Pinho, P. G., Mouga, T. & Andrade, P. B. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidante potential. *Food Chemistry* 119:1359-1368.

Van Alstyne, K., Mccarthy III, J., Hustead, C. & Kearns, L. (1999). Phlorotannin allocation among tissues of northeastern pacific kelps and rockweeds. *Journal of Phycology* 35:482–492.

Van den Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H. (1995). *Algae - An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Varela-Alvarez, E., Andreakis, N., Lago-Leston, A., Pearson, G. A., Serrão, E. A., Procaccini, G., Duarte, C. M. & Marba, N. (2006). Genomic DNA isolation from green and brown algae (Caulerpales and Fucales) for microsatellite library construction (Note). *Journal of Phycology* 42:741-745.

Verbruggen, H., Maggs, C. A., Saunders, G. W., Le Gall, L., Yoon, H. S. & De Clerck, O. (2010). Data mining approach identifies research priorities and data requirements for resolving the red algal tree of life. *BMC Evolutionary Biology* 10:16.

Vidyavathi, N. & Sridhar, K. (1991). Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore coast of India. *Botanica Marina* 34:279-284.

Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. 1. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58:175–189.

Wahl, M. (2008). Ecological lever and interface ecology: epibiosis modulates the interactions between host and environment. *Biofouling* 24:427–438.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005). Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B* 360:1847–1857.

Ward, R. D., Holmes, B. H., White, W. T., & Last, P. R. (2008). DNA barcoding Australasian chondrichthyans results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59:57–71.

Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29:188-197.

Weidner, K., Lages, B., da Gama, B., Molis, M., Wahl, M. & Pereira, R. (2004). Effects of mesograzers and nutrient levels on the induction of defenses in several Brazilian macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 283:113–25.

Wheeler, Q. D., Raven, P. H. & Wilson, E. O. (2004). Taxonomy: impediment or expedient? *Science* 303:285.

Wiens, J. J. (1999). Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 30:327–362.

Wikström, S. & Pavia, H. (2004). Chemical settlement inhibition versus postsettlement mortality as an explanation for differential fouling of two congeneric seaweeds. *Oecologia* 138:223–230.

Wilson, E. O. (2003). The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution* 18:77–80.

Wilson, E.O. (2004). Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 359(1444):739.

Woolard, F. X., Moore, R. E. & Roller, P. P. (1979). Halogenated acetic and acrylic acids from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. *Phytochemistry* 18:617–620.

Wright, S. J. & Muller-Landau, H. C. (2006). The future of tropical forest species. *Biotropica* 38(3):287-301.

Xu, Y., Stokes, A., Freeman, W., Kumer, S., Vogt, B. & Vrana, K. (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human *substantia nigra*. *Brain Research. Molecular Brain Research* 45:159–162.

Yang, E. C., Peters, A. F., Kawai, H., Stern, R., Hanyuda, T., Barbara, I., Mueller, D. G., Strittmatter, M., Van Peine, W. F. P., Kuepper & F. C. Ligulate. *Desmarestia* (Desmarestiales, Phaeophyceae) revisited: *D. japonica* sp. nov. and *D. dudresnayi* differ from *D. ligulata* (in review).

Yates, J. & Peckol, P. (1993). Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology* 74:1757–1766.

Zubia, M., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Península, México. *Journal of Applied Phycology*, 19:449–458.

Zuccarello, G. C., Schidlo, A., McIvor, L. & Guiry, M. D. (2006). A molecular re-examination of speciation in the intertidal red alga *Mastocarpus stellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) in Europe. *European Journal of Phycology* 40:337-344, 3 figs, 7 tables.

8. Anexos

Sample ID	Collectors	Collection Date	Collection Info								
			Continent/Ocean	Country	State/Province	Region	Sector	Exact Site	Latitude	Longitude	Elevation/Depth
MD0002234	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002235	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002236	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002237	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002238	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002239	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002240	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002241	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002242	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002243	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002244	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, S. Vicente			37,833333	-25,666667	0m
MD0002245	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002246	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002247	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002248	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002249	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002250	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002251	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002252	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					0m
MD0002253	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002254	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002255	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002256	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002257	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002258	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002259	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002260	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Caloura					-5/-9m
MD0002261	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					-15/-19m
MD0002262	Manuela I. Parente/ R. Sousa	2-Dez-11		Portugal		Azores/ S. Miguel, Calhetas					-15/-19m

Anexo/Imagem I1 - Parte da informação relativa aos detalhes da colheita e processamento de cada espécime destinado a análises morfológicas e moleculares; código identificativo da amostra; identidade dos colectores; data da colheita; país e região da colheita; coordenadas GPS do local de colheita; profundidade a que a colheita foi efectuada

Anexo/Tabela T1 - Lista das espécies constituintes da biblioteca de referência de DNA *barcodes* deste estudo, os locais geográficos onde as espécies subsistem em território nacional, os respectivos códigos de acesso à sequência de DNA *barcode* no GenBank, os locais de origem dos espécimes correspondentes às respectivas sequências e os autores responsáveis pela sequenciação e publicação das mesmas

Espécie	Localização em Portugal	Acesso GenBank	Origem	Fonte
<i>Ahnfeltia plicata</i> (Hudson) E.M.Fries	Portugal Continental (André 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994)	HM915067.1	Massachusetts, Estados Unidos da América	Milstein e Saunders (2012)
		HM915131.1	East Point Beach, Groton, Connecticut, Estados Unidos da América	
		JN113222.1	Kouchibouguac, New Brunswick, Canadá	
		HM918037.1	Lucas Point, Tasmania, Austrália	
		JN113197.1	Goury, Basse-Normandie, França	
		JN113200.1	Front of Point Merry, Churchill, Manitoba, Canadá	
<i>Antithamnion decipiens</i> (J.Agardh) <i>Athansiadis</i>	Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994)	HQ423063.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Ascophyllum nodosum</i> (Linnaeus) Le Jolis	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; André 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994; Tittley <i>et al.</i> 2009), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	EU579862.1	Roscoff, Brittany, France	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevisan de Saint-Léon	Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Gil-Rodríguez e Afonso-Carrillo 1980; Audiffred e Weisscher 1984; Price <i>et al.</i> 1986; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	JN642177.1	Messina, Itália	Genovese <i>et al.</i> (2012)
		EU146168.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood (2008)
		EU146160.1		
		EU146156.1		
<i>Atractophora hypnoides</i> P.L.	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	GQ497303.1	Reino Unido	Verbruggen <i>et al.</i> (2010)

Crouan e H.M.				
Crouan				
<i>Bachelotia</i>				
<i>antillarum</i> (Grunow)	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	EU579863.1	Leigh, Nova Zelândia	Bittner <i>et al.</i> (2008)
Gerloff				
<i>Bangia</i>				
<i>atropurpurea</i> (Mertens ex Roth)	Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994; Tittley e Neto 2005), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	HQ699255.1	Estados Unidos da América	Lynch <i>et al.</i> (2010) – Não publicado
C.Agardh				
<i>Bangia</i>				
<i>fuscopurpurea</i> (Dillwyn) Lyngbye	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	JN028459.1	Nova Iorque, Estados Unidos da América	Kucera e Saunders (in review) Sherwood <i>et al.</i> (2010)
		JN028460.1	Newport, Rhode Island, Estados Unidos da América	
		HQ423034.1	Hawaii, Estados Unidos da América	
<i>Callophyllis laciniata</i> (Hudson) Kützing	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	JF903294.1	Strangford, Lough, Irlanda do Norte	Clarkston e Saunders (2012)
<i>Champia parvula</i> (C.Agardh) Harvey	Portugal Continental (Ardré 1970; Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Price <i>et al.</i> 1986; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HQ422864.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
		HQ422819.1		
		HQ422822.1		
		HQ422763.1		
<i>Chondrus crispus</i> Stackhouse	Portugal Continental (Ardré 1970; Pereira e Mesquita 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994)	AY970567.1	Nova Scotia, Canadá	Saunders (2005)
<i>Cladostephus spongiosus</i> (Hudson) C.Agardh	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009; Lopes <i>et al.</i> 2011), Açores (Neto 1994, Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (John <i>et al.</i> 2004)	EU579864.1	Ile verte, Roscoff, Brittany, France	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens ex Roth)	Portugal Continental Continental (Ardré 1970), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994; Toste <i>et al.</i> 2003; Tittley <i>et al.</i> 2009), Madeira (Levring 1974; Neto	-	São Vicente, São Miguel, Açores, Portugal	Dados não publicados
		-	Mosteiros, São Miguel, Açores, Portugal	

Derbès & Solier	<i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	- - - -	Reis Magos, Madeira, Portugal	
<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus	Selvagens (Price <i>et al.</i> 1986; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ919250.1	Nova Scotia, Canadá	iBOL (2011)
		HQ544275.1	Bamfield, British Columbia, Canadá	
		HQ544668.1	Koga Islet, Gwaii Haanas, British Columbia, Canadá	
		HQ544953.1	Hot Spring Island, Gwaii Haanas, British Columbia, Canadá	iBOL (2010)
		HM915251.1	Black Rock, Bay of Fundy, Nova Scotia, Canadá	
		HM918978.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	
<i>Dasya corymbifera</i> J.Agardh	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Neto 1994)	HQ422919.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Desmarestia aculeata</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	EU579865.1	St. Quay-Portrieux, Brittany, France	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Desmarestia herbacea</i> (Turner) J.V.Lamouroux	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970)	HE866767.1	-	Yang <i>et al.</i> (in review)
<i>Dictyopteris polypodioides</i> (A.P.De Candolle) J.V.Lamouroux	Madeira (John <i>et al.</i> 2004; Neto <i>et al.</i> 2001), Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Portugal Continental (Nizamuddin 1981; Garreta <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2009)	EU579866.1	St. Michel de Plouguerneau, Brittany, France	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V.Lamouroux	Portugal Continental Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970; Rull Lluch <i>et al.</i> 2005; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Price <i>et al.</i> 1978; Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	-		
		-		
		-	Praia da Parede, Cascais, Portugal Continental	Dados não publicados
		-		
		-	Nordeste, São Miguel, Açores, Portugal	

<i>Dictyota fasciola</i> (Roth) J.V.Lamouroux	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Price <i>et al.</i> 1978; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	-	São Miguel, Açores, Portugal	Dados não publicados
		-	Ponta São Lourenço, Madeira, Portugal	
		-	Reis Magos, Madeira, Portugal	
<i>Dilsea carnosa</i> (Schmidel) Kuntze	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994)	AY970635.1	Pointe du Grouin, França	Saunders (2005)
<i>Dumontia contorta</i> (S.G.Gmelin) Ruprecht	Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	AY971154.1	Nova Scotia, Canadá	Saunders (2005)
		AY970583.1	Mullaghmore Head, Leitrim, Connacht, Irlanda	
		AY971157.1	Plymouth, Grã-Bretanha, Reino Unido	
		AY971147.1	Plymouth, Grã-Bretanha, Reino Unido	
		AY971150.1	Portaferry, Irlanda do Norte, Reino Unido	
		AY971152.1	Portaferry, Irlanda do Norte, Reino Unido	
<i>Ectocarpus fasciculatus</i> Harvey	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994; Tittley e Neto 2005)	Cluster BOLD:AAO5 305	Niebla, Chile	Fonte não publicada
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 2005), Madeira (John <i>et al.</i> 2004; Neto <i>et al.</i> 2001), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; John <i>et al.</i> 2004)	Cluster BOLD:AAO5 305	Crystal Beach, Tampa Bay, Florida, Estados Unidos da América	Fonte não publicada
<i>Erythrodermis traillii</i> (Holmes ex Batters) Guiry e Garbary	Açores (Neto 1994)	GQ380104.1	New Foundland and Labrador, Canadá	Le Gall e Saunders (2010)
<i>Fucus serratus</i> Linnaeus	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	EU646716.1	Cabo Breton, Nova Scotia, Canadá	Kucera e Saunders (2008)
		EU646717.1	Pomquet Harbour, Antigonish, Nova Scotia, Canadá	
		EU646710.1	White Point, Nova Scotia, Canadá	
		EU646715.1	Farol Covehead Harbour, Prince Edward Island, Canadá	
		EU646714.1	Farol Covehead Harbour, Prince Edward Island, Canadá	
		EU646713.1	Sydney, Nova Scotia, Canadá	

<i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; André 1970; Billard <i>et al.</i> 2006; Perrin <i>et al.</i> 2007; Araújo <i>et al.</i> 2009; Cairrão <i>et al.</i> 2009; Lopes <i>et al.</i> 2011), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994)	EU646738.1	Cabo St. Marys, Nova Scotia, Canadá	Kucera e Saunders (2008)
		-	São Pedro do Estoril, Lisboa, Portugal Continental	Dados não publicados
		-	Foz, Porto, Portugal Continental	
		-	Caloura, São Miguel, Açores, Portugal	
		-		
<i>Fucus vesiculosus</i> Linnaeus	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; André 1970; Billard <i>et al.</i> 2006; Araújo <i>et al.</i> 2009; Cairrão <i>et al.</i> 2009; Canovas <i>et al.</i> 2011), Açores (Neto 1994), Madeira (John <i>et al.</i> 2004)	EU646746.1	New Brunswick, Canadá	
		EU646756.1	Calais, Maine, Estados Unidos da América	
		EU646739.1	Peggys Cove, Nova Scotia, Canadá	Kucera e Saunders (2008)
		EU646741.1	Digby, New Brunswick, Canadá	
		EU646743.1	Cutts Island Beach, Maine, Estados Unidos da América	
		EU646747.1	The Point, Ingonish, Nova Scotia, Canadá	
<i>Galaxaura rugosa</i> (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (John <i>et al.</i> 2004)	HQ422638.1		
		HQ422639.1		
		HQ422631.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
		HQ423122.1		
		HQ422799.1		
		HQ422787.1		
<i>Ganonema farinosum</i> (J.V.Lamouroux) K.C.Fan e Yung C.Wang	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004)	HQ422850.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Gelidiella acerosa</i> (Forsskål) Feldmann e G.Hamel	Açores (Neto 1994)	HQ422655.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Gelidium crinale</i>	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et</i>	HQ412466.1	Old Gulch, Ilha Lord Howe, Austrália	Freshwater

(Hare ex Turner) Gaillon	<i>al.</i> 2004), Portugal Continental (Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ412462.1	Stump Sound, North Carolina, Estados Unidos da América	<i>et al.</i> (2010)
		HQ412458.1	Beaufort Inlet, North Carolina, Estados Unidos da América	
		HQ412464.1	Green Island, Rottnest Island, Austrália	
		HQ412461.1	Fort Fisher, North Carolina, Estados Unidos da América	
		HQ412463.1	Praia Esperanza, Manati, Porto Rico	
<i>Gelidium pusillum</i> (Stackhouse) Le Jolis	Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Ardre 1970; Cremades <i>et al.</i> , 2002; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ412447.1	Masonboro Inlet, Carolina do Norte, Estados Unidos da América	Freshwater <i>et al.</i> (2010)
<i>Gelidium spinosum</i> (S.G.Gmelin) P.C.Silva	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ412450.1	Hordaland, Bergen, Noruega	Freshwater <i>et al.</i> (2010)
<i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) M.Steentoft, L.M.Irvine e W.F.Farnham	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009), Madeira (John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (John <i>et al.</i> 2004), Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	FJ499509.1	Praia do Mindelo, Porto, Portugal Continental	Saunders (2009)
		JQ843333.1	Noruega	Costa <i>et al.</i> (2012)
		JQ843331.1	Liideritz, Namíbia	
		JQ843332.1	Alagoas, Brasil	
<i>Gracilaria vermiculophylla</i> (Ohmi) Papenfuss	Portugal Continental (Rueness 2005; Abreu <i>et al.</i> 2011)	JQ794758.1	Virginia, Estados Unidos da América	Gulbransen <i>et al.</i> (2012)
		FJ499583.1	Knowles Way, Point Judith Pond, Rhode Island, Estados Unidos da América	
		FJ499557.1		Saunders (2009)
		FJ499565.1	Ria de Aveiro, Aveiro, Portugal Continental	
		FJ499564.1		
		FJ499622.1	Courtney Estuary, British Columbia, Canadá	
<i>Gracilariopsis</i>	Portugal Continental (Rueness 2005)	FJ499660.1	Ria de Aveiro, Aveiro, Portugal Continental	Saunders

<i>longissima</i> (S.G.Gmelin) M.Steentoft, L.M.Irvine e W.F.Farnham				(2009)
<i>Grateloupia filicina</i> (J.V.Lamouroux) C.Agardh	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; De Clerck <i>et al.</i> 2005; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ422590.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Gymnogongrus crenulatus</i> (Turner) J.Agardh	Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Portugal Continental (Pereira e Mesquita 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009), Madeira (Haroun <i>et al.</i> 2002)	GQ380114.1 GQ380118.1 GQ380117.1 GQ380116.1 GQ380121.1 GQ380115.1	Neddick Cape, Maine, Estados Unidos da América Lepreau, Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá Point Holmes, Comox, British Columbia, Canadá Comox Marina, British Columbia, Canadá Seabreeze, Hornby Island, British Columbia, Canadá	Le Gall e Saunders (2010)
<i>Gymnothamnion elegans</i> (Schousboe ex C.Agardh) J.Agardh	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Ardre 1970)	HQ423092.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Halopteris filicina</i> (Grateloup) Kützing	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009; Lopes <i>et al.</i> 2011), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Price <i>et al.</i> 1978; Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	EU579868.1 - - - -	Banyuls, France Lajes, Flores, Açores, Portugal Ribeirinha, São Miguel, Açores, Portugal Santa Cruz, Flores, Açores, Portugal São Pedro do Estoril, Lisboa, Portugal Continental	Bittner <i>et al.</i> (2008) Dados não publicados
<i>Halymenia floresii</i> (Clemente) C.Agardh	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Portugal Continental (Ardre 1970; Schneider <i>et al.</i> 2010)	GQ862071.1	Armação de Pêra, Algarve, Portugal Continental	Schneider, Lane e Saunders (2010)

<i>Helminthocladia calvadosii</i> (J.V.Lamouroux ex DUBY) Setchell	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	HQ603218.1	Beniguet, Brittany, França	Le Gall e Saunders (In review)
<i>Helminthora divaricata</i> (C.Agardh) J.Agardh	Madeira (Levring 1974)	HQ603220.1	Beniguet, Brittany, França	Le Gall e Saunders (In review)
<i>Heterosiphonia crispella</i> (C.Agardh) M.J.Wynne	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Neto 1994)	HQ423127.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hildenbrandia rubra</i> (Sommerfelt) Meneghini	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994, Neto 1994), Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	GQ497309.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	Verbruggen <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V.Lamouroux	Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Ardré 1970; Cremades <i>et al.</i> , 2002; Araújo <i>et al.</i> , 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ422630.1 HQ422612.1 HQ422876.1 HQ422683.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea spinella</i> (C.Agardh) Kützing	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004)	HQ422681.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea valentiae</i> (Turner) Montagne	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004; Parente <i>et al.</i> 2000)	HQ422901.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Kallymenia reniformis</i> (Turner) J.Agardh	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009; Rodriguez-Prieto e Hommersand 2009)	JF903297.1	Strangford, Irlanda do Norte, Reino Unido	Clarkston e Saunders (2012)
<i>Laminaria hyperborea</i> (Gunnerus) Foslie	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	FJ409155.1	Doaghbeg, Co. Donegal, Irlanda	McDevit e Saunders (2009)

<i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) A.H.S.Lucas	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	HQ422633.1 HQ422758.1 HQ422746.1 HQ422643.1 HQ422617.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Laurencia nidifica</i> J.Agardh	Madeira (John <i>et al.</i> 2004)	HQ422753.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Leathesia marina</i> (Lyngbye) Decaisne	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	FJ409170.1	Pachena Beach, Bamfield, British Columbia, Canadá	McDevit e Saunders (2009)
<i>Liagora distenta</i> (Mertens ex Roth) J.V.Lamouroux	Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994)	HQ603225.1 HQ603224.1 HQ603223.1 HQ603222.1	Pointe de Gueretion, Port-Cros, Riviera Francesa, França La Gabiniere, Port-Cros, Riviera Francesa, França	Le Gall e Saunders (In review)
<i>Liagora divaricata</i> C.K.Tseng	Açores (Neto 1994)	HQ423117.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Liagora viscida</i> (Forsskål) C.Agardh	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Ardré 1970)	HQ603228.1	Port-Cros, Riviera Francesa, França	Le Gall e Saunders (In review)
<i>Lomentaria orcadensis</i> (Harvey) F.S.Collins	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	GQ497311.1	Neddick Cape, Maine, Estados Unidos da América	Verbruggen <i>et al.</i> (2010)
<i>Mastocarpus stellatus</i> (Stackhouse) Guiry	Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Pereira e Mesquita 2003; Zuccarello <i>et al.</i> 2006; Araújo <i>et al.</i> 2009)	GQ380333.1 GQ380338.1	Neddick Cape, Maine, Estados Unidos da América Hazard Avenue, Narragansett, Rhode Island, Estados Unidos da América	Le Gall e Saunders (2010)

		GQ380332.1		
		GQ380339.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	
		GQ380334.1	Grand M, New Brunswick, Canadá	
		GQ380336.1	Cape St. Marys, Nova Scotia, Canadá	
<i>Naccaria wiggii</i> (Turner) Endlicher	Selvagens (John <i>et al.</i> 2004)	GQ497312.1	Abercastle, Pembrokeshire, País de Gales, Reino Unido	Verbruggen <i>et al.</i> (2010)
<i>Nemalion helminthoides</i> (Velley) Batters	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994; Haroun <i>et al.</i> 2002), Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ603229.1	Praia Lastres, Astúrias, Espanha	Le Gall e Saunders (In review)
<i>Nemastoma gelatinosum</i> M.A.Howe	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	JN659918.1	St. George, Tobacco Bay, Bermuda	Schneider <i>et al.</i> (2011)
<i>Neosiphonia sertularioides</i> (Grateloup) K.W.Nam e P.J.Kang	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HM573519.1	Crawl Day, Bocas del Toro, Panamá	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010) – Não publicado
<i>Neosiphonia sphaerocarpa</i> (Børgesen) M. S.Kim e I.K.Lee	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HM573527.1	Long Key, Florida, Estados Unidos da América	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010) - Não publicado
<i>Padina gymnospora</i> (Kützing) Sonder	Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	EU579871.1	Ricaudy reef, Noumea, New Caledonia	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Palmaria palmata</i> (Linnaeus) Weber e Mohr	Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2009)	GU224113.1	Cape Elizabeth, Maine, Estados Unidos da América	Clayden e Saunders (2010)
		GU224114.1	Point Lance, Newfoundland and Labrador, Canadá	
		GU224115.1	Cape St. Mary, Nova Scotia, Canadá	
		GQ497313.1	Peggys Cove, Nova Scotia, Canadá	
		HQ603247.1	Saint Lunaire, Ille-et-Vilaine, Brittany, França	

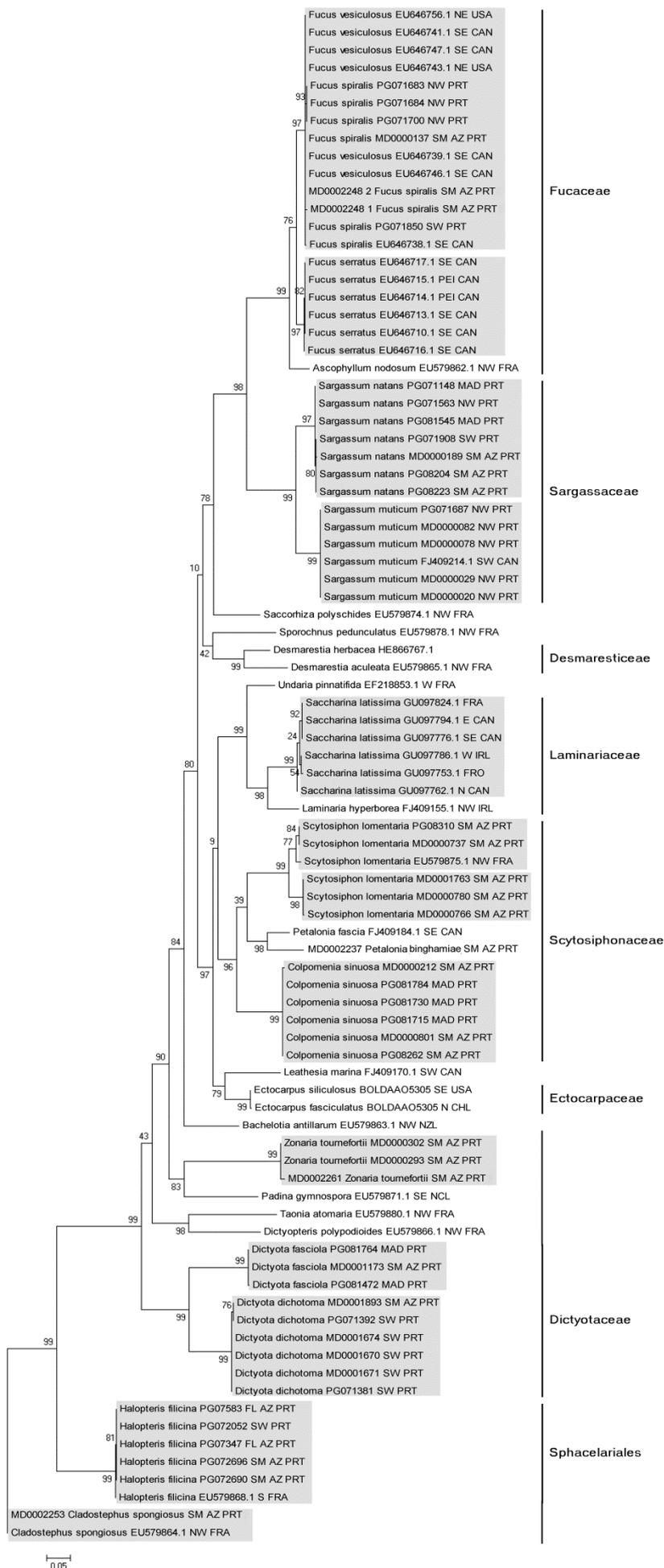
<i>Petalonia fascia</i> (O.F.Müller) Kuntze	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994)	FJ409184.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	McDevit e Saunders (2009)
<i>Peyssonnelia rubra</i> (Greville) J.Agardh	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	HQ422737.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Plocamium cartilagineum</i> (Linnaeus) P.S.Dixon	Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; John <i>et al.</i> 2004), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Lopes <i>et al.</i> 2011)	JF271575.1 JF271583.1 JF271580.1 JF271578.1 JF271576.1 JF271573.1	Doaghbeg, Donegal, Irlanda Lieiro, Lugo, Galiza, Espanha Ilha das Palomas, Tarifa, Cadiz, Andaluzia, Espanha Pointe du Grouin, St. Malo, França Spiddal, Galway, Connacht, Irlanda	Cremades <i>et al.</i> (2011)
<i>Plocamium raphelisianum</i> P.J.L.Dangeard	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009)	JF271614.1	Cambre, Malpica, Corunha, Galiza, Espanha	Cremades <i>et al.</i> (2011)
<i>Plumaria plumosa</i> (Hudson) Kuntze	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ412551.1	Roscoff, Brittany, França	Rueness (2010)
<i>Polysiphonia atlantica</i> Kapraun & J.N.Norris	Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004), Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	HM573539.1	Onslow Bay, Carolina do Norte, Estados Unidos da América	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010) - Não publicado
<i>Polysiphonia fucooides</i> (Hudson) Greville	Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (John <i>et al.</i> 2004), Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HM573496.1	South Masonboro, New Hanover Co., Carolina do Norte, Estados Unidos da América	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010) - Não publicado
<i>Polysiphonia havanensis</i> Montagne	Açores (Neto 1994), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984, John <i>et al.</i> 2004)	HM573522.1	Cayos Zapatillas, Bocas del Toro, Panamá	Mamoozadeh <i>et al.</i> (2010) - Não publicado
<i>Polysiphonia</i>	Portugal Continental (Ardré 1970), Madeira (Levring 1974), Selvagens	HM573538.1	Punta Gorda, Colon, Panamá	Mamoozadeh

<i>macrocarpa</i> (C.Agardh) Sprengel	(Audiffred e Weisscher 1984)			h <i>et al.</i> (2010) - Não publicado
<i>Porphyra purpurea</i> (Roth) C.Agardh	Portugal Continental (Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	JN028550.1	English Harbour East, Newfoundland and Labrador, Canadá	Kucera e Saunders (2011)
		JN028536.1		
		JN028515.1	Blomidon Beach, Bay of Fundy, Nova Scotia, Canadá	
		JN028512.1	Grand M, New Brunswick, Canadá	
		JN028510.1		
		JN028543.1	Riviere du Loup, Quebec, Canadá	
<i>Porphyra umbilicalis</i> Kützing	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009; Teasdale <i>et al.</i> 2009), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	JN028584.1	Harrington Cove, New Brunswick, Canadá	Kucera e Saunders (2011)
		JN028581.1	Long Island, Nova Scotia, Canadá	
		JN028558.1	Cape Neddick, Maine, Estados Unidos da América	
		JN028582.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	
		N028559.1	Hazard Avenue, Narragansett, Rhode Island, Estados Unidos da América	
		JN028575.1	St. Brides, Newfoundland and Labrador, Canadá	
<i>Pyropia leucosticta</i> (Thuret) Neefus e J.Brodie	Portugal Continental (Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	JN028676.1	Cape Elizabeth, Maine, Estados Unidos da América	Kucera e Saunders (2011)
		JN028656.1	Digby, Nova Scotia, Canadá	
		JN028658.1	Starboard, Maine, Estados Unidos da América	
		JN028682.1	Point Prim Lighthouse, Nova Scotia, Canadá	
		JN028680.1	Brier Island, Nova Scotia, Canadá	
		JN028677.1	Beaver Harbour, Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	
<i>Rhodomela confervoides</i> (Hudson) P.C.Silva	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	GQ497317.1	Bay of Fundy, New Brunswick, Canadá	Verbruggen <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhodymenia holmesii</i> Ardissonne	Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Portugal Continental (Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HM033087.1	Ste. Nonorine-des-Pertes, Calvados, Normandia, França	Saunders e McDonald (2010)

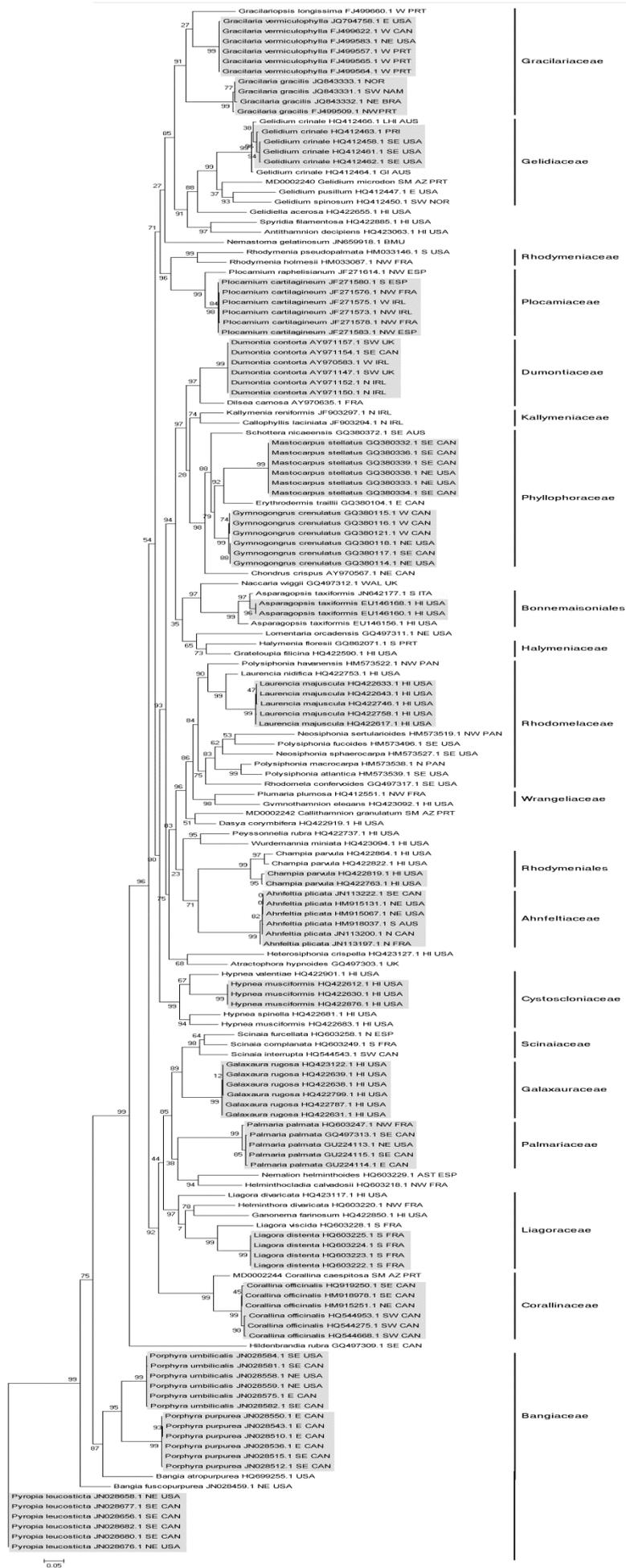
<i>Rhodymenia pseudopalmata</i> (J.V.Lamouroux) P.C.Silva	Portugal Continental (Ardre 1970; Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Tittley e Neto 1994; Neto 1994), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HM033146.1	Porto Arkansas, Texas, Estados Unidos da América	Saunders e McDonald (2010)
<i>Saccharina latissima</i> (Linnaeus) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl e G.W.Saunders	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	GU097776.1	Brier Island, Nova Scotia, Canadá	McDevit e Saunders (2009)
		GU097762.1	Churchill, Manitoba, Canadá	
		GU097753.1	Signabour, Streymoy, Faeroe Islands	
		GU097794.1	English Harbour, Newfoundland and Labrador, Canadá	
		GU097824.1	Grand Barrachois, França	
GU097786.1	Oranmore, Irlanda			
<i>Saccorhiza polyschides</i> (Lightfoot) Batters	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009; Lopes <i>et al.</i> 2011)	EU579874.1	Le Loup, Roscoff, Brittany, França	Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt	Portugal Continental (Rull Lluch <i>et al.</i> 1994; Ribera <i>et al.</i> 1996; Araújo <i>et al.</i> 2003; Valera-Alvarez <i>et al.</i> 2006; Engelen <i>et al.</i> 2008; Araújo <i>et al.</i> 2009)	FJ409214.1	Pachena Beach, Bamfield, British Columbia, Canadá	McDevit e Saunders (2009)
		-	Foz, Porto, Portugal Continental	Dados não publicados
		-	Aguda, Espinho, Aveiro, Portugal Continental	
		-	São Pedro do Estoril, Lisboa, Portugal Continental	
		-	Ponta São Lourenço, Madeira, Portugal	
<i>Sargassum natans</i> (Linnaeus) Gaillon	Portugal Continental Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardre 1970), Açores (Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984, John <i>et al.</i> 2004)	-	Mosteiros, São Miguel, Açores, Portugal	Dados não publicados
		-	Reis Magos, Madeira, Portugal	
		-	Espinho, Aveiro, Portugal Continental	
		-	São Vicente, São Miguel, Açores, Portugal	
		-	São Vicente, São Miguel, Açores, Portugal	
<i>Schottera nicaensis</i>	Açores (Neto 1994), Portugal Continental (Cremades <i>et al.</i> 2002; Araújo <i>et al.</i>	GQ380372.1	Porto Phillip Heads, Queensclif, Victoria, Austrália	Le Gall e

(J.V.Lamouroux ex Duby) Guiry e Hollenberg	2009)				Saunders (2010)
<i>Scinaia complanata</i> (F.S.Collins) A.D.Cotton	Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HQ603249.1	Port-Cros, La Gabiniera, Riviera Francesa, França		Le Gall e Saunders (In review)
<i>Scinaia furcellata</i> (Turner) J.Agardh	Açores (Neto 1994)	HQ603258.1	Gijon, Espanha		Le Gall e Saunders (In review)
<i>Scinaia interrupta</i> (A.P.de Candolle) M.J.Wynne	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009)	HQ544543.1	Bamfield, British Columbia, Canadá		Le Gall e Saunders (In review)
<i>Scytosiphon lomentaria</i> (Lyngbye) Link	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994; Parente, Neto e Fletcher 2003), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001), Selvagens (Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	EU579875.1	St. Michel de Plouguerneau, Brittany, France		Bittner <i>et al.</i> (2008)
		-	Mosteiros, São Miguel, Açores, Portugal		Dados não publicados
		-	Lagoa, São Miguel, Açores, Portugal		
<i>Sporochnus pedunculatus</i> (Hudson) C.Agardh	Portugal Continental (Ardré 1970), Açores (Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004)	EU579878.1	St. Quay-Portrieux, Brittany, France		Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Spyridia filamentosa</i> (Wulfen) Harvey	Açores (Neto 1994, Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HQ422885.1	Hawaii, Estados Unidos da América		Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Taonia atomaria</i> (Woodward) J.Agardh	Portugal Continental (De Mesquita Rodrigues 1963; Ardré 1970; Araújo <i>et al.</i> 2003; Araújo <i>et al.</i> 2009), Açores (Neto 1994, Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	EU579880.1	Ile verte, Roscoff, Brittany, France		Bittner <i>et al.</i> (2008)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Portugal Continental (Araújo <i>et al.</i> 2009)	EF218853.1	l'Etang de Thau, França		Lane <i>et al.</i>

(Harvey) Suringar				(2007)
<i>Wurdemanía</i> <i>miniata</i> (Sprengel) Feldmann e G.Hamel	Açores (Tittley e Neto 2005), Madeira (Neto <i>et al.</i> 2001; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Audiffred e Weisscher 1984; Parente <i>et al.</i> 2000; John <i>et al.</i> 2004)	HQ423094.1	Hawaii, Estados Unidos da América	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	Açores (Neto 1994; Tittley e Neto 1994), Madeira (Levring 1974; Neto <i>et al.</i> 2001; Haroun <i>et al.</i> 2002; John <i>et al.</i> 2004), Selvagens (Price <i>et al.</i> 1978; Audiffred e Weisscher 1984; John <i>et al.</i> 2004)	-	Porto da Ribeirinha, São Miguel, Açores, Portugal	Dados não publicados



Anexo/Imagem I2 - Árvore ML de sequências provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Heterokontophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução K2P e o teste de Minimum of SH-Like and Chi2 base support. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado



Anexo/Imagem I3 - Árvore ML de sequências provenientes de diversos locais geográficos que constitui a biblioteca de referência *barcode* de espécies de macroalgas do filo Rodophyta reportadas para Portugal. Foi utilizado o modelo de evolução K2P e o teste de Minimum of SH-Like and Chi2 base support. As linhas laterais mostram a localização das diferentes famílias e as áreas sombreadas representam grupos monofiléticos com <2% de divergência intraespecífica. As siglas exibidas à frente de cada espécie representam a origem geográfica do espécime sequenciado

Anexo/Tabela T2 – Actualização de nomes científicos actualmente considerados sinónimos associados à bibliografia sobre a flora marinha Portuguesa ou às sequências retiradas da base de dados GenBank

Nomenclatura sinónima	Nome científico actualmente aceite
<i>Caetophora marina</i> Lyngbye	<i>Leathesia marina</i> (Lyngbye) Decaisne
<i>Sphaerococcus miniatus</i> Sprengel	<i>Wurdemannia miniata</i> (Sprengel) Feldmann & G.Hamel
<i>Polysiphonia sertularioides</i> (Grateloup) J. Agardh	<i>Neosiphonia sertularioides</i> (Grateloup) K.W.Nam & P.J.Kang
<i>Scinaia forcillata</i> Bivona-Bernardi	<i>Scinaia furcellata</i> (Turner) J.Agardh