

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

NATALIA LEOCADIO ROSSIGNOLO

REVISÃO DA SEÇÃO *SETACEA* DO GÊNERO
BATRACHOSPERMUM (RHODOPHYTA,
BATRACHOSPERMALES)

São José do Rio Preto
2014

NATALIA LEOCADIO ROSSIGNOLO

**REVISÃO DA SEÇÃO *SETACEA* DO GÊNERO
BATRACHOSPERMUM (RHODOPHYTA,
BATRACHOSPERMALES)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biologia e Sistemática de Microrganismos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Necchi Junior

São José do Rio Preto
2014

Rossignolo, Natalia Leocadio.
Revisão da seção Setacea do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales) / Natalia Leocadio Rossignolo. --
São José do Rio Preto, 2014
87 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Orlando Necchi Junior
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas

1. Botânica. 2. Filogenia. 3. Alga vermelha - Classificação.
4. Código de Barras de DNA Taxonômico. 5. Batrachospermales.
6. *Batrachospermum*. I. Necchi Junior, Orlando. II. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

NATALIA LEOCADIO ROSSIGNOLO

**REVISÃO DA SEÇÃO *SETACEA* DO GÊNERO
BATRACHOSPERMUM (RHODOPHYTA,
BATRACHOSPERMALES)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biologia e Sistemática de Microrganismos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca examinadora

Prof. Dr. Orlando Necchi Junior
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Valéria Cassano
USP – São Paulo

São José do Rio Preto
2014

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao meu orientador, Orlando Necchi Junior, pela confiança que depositou em mim, pelos ensinamentos e suporte dado desde o início.

À Coordenação do PPG Microbiologia e aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, pelo encaminhamento dos expedientes nas várias etapas do Mestrado.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Zoologia e Botânica, principalmente à Maria Helena Carabolante, pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos herbários do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Instituto de Botânica de São Paulo pelo empréstimo de amostras. Aos Taiju Kitayama (Herbário Nacional do Japão), Iara Chapuis, Mônica Paiano, Douglas Agostinho e Auro Garcia Filho pelas coletas realizadas para que este trabalho pudesse se concretizar.

Aos colegas de trabalho do Laboratório BETA pela ajuda e momentos de descontração.

Aos meus queridos pais Antônio e Marina, por sempre me apoiarem e me incentivarem.

Ao meu namorado André Luiz pelo seu apoio, compreensão, amor e incentivo para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos e familiares por todo incentivo e carinho.

À FAPESP (Processos 2012/20134-9, 2013/03031-4) pelas bolsas e auxílio financeiro (Processo 2012/12016-6) e à CAPES pela bolsa.

Muito Obrigado!

Resumo

A seção *Setacea* foi reconhecida como grupo monofilético na revisão recente da ordem Batrachospermales. Porém, seu status taxonômico não pode ser determinado, porque posicionou-se dentro do grupo denominado *Australasica*, composto por táxons da Austrália e Nova Zelândia. Estudos anteriores combinando dados moleculares e morfológicos enfocaram apenas as relações filogenéticas entre os grupos maiores (gêneros ou seções) e abordagens visando avaliar o número de espécies só foram iniciadas muito recentemente e são ainda escassas e baseadas em poucas amostras. Dessa maneira, as seguintes hipóteses foram testadas neste estudo: 1) a seção *Setacea* do gênero *Batrachospermum* constitui grupo monofilético dentro da ordem Batrachospermales; o reconhecimento desse grupo associado ao fato de *Batrachospermum* ser parafilético poderá resultar na elevação desta seção para um nível superior (possivelmente um gênero); 2) as espécies atualmente reconhecidas na seção com base em caracteres morfológicos serão confirmadas pelos dados moleculares; além dessas espécies, outras (particularmente espécies crípticas) deverão ser encontradas e reconhecidas dentro da seção. Este estudo teve como objetivos: 1) inferir as relações filogenéticas da seção *Setacea* com os outros grupos (gêneros e seções) da ordem Batrachospermales, bem como os limites de variação inter e intra-específica das espécies dentro da seção, com base na análise das sequências do gene *rbcL* e da região de “barcode” do gene *cox1*; 2) elaborar estudo de revisão para a seção *Setacea* por meio da reavaliação dos caracteres taxonômicos diagnósticos para espécies deste grupo, à luz dos novos dados moleculares. Foram analisadas 15 amostras, sendo 13 provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil, uma do Japão e outra da Espanha. Os espécimes foram coletados em águas com temperaturas baixas a moderadas, ligeiramente ácidas a neutras, agitadas, e média a elevada oxigenação (condições oligotróficas e oligossapróbicas) sugerindo serem bons bioindicadores de rios/riachos de boa qualidade. Os dados morfológicos observados para as amostras analisadas situaram-se em sua maioria dentro dos limites reportados na literatura relevante. No entanto, algumas características morfológicas (internó, fascículos primários e carposporófitos)

situaram-se próximas ou acima dos limites máximos anteriormente reportados na literatura. Neste trabalho foi gerado um total de 27 novas sequências para os dois marcadores moleculares utilizados. Os seguintes dados moleculares foram gerados: *rbcL* – 14 sequências novas; *cox1* – 13 sequências novas, incluindo uma de “minibarcodes”. Análises baseadas nas sequências de *rbcL* e *cox1* foram essencialmente congruentes e revelaram a seção *Setacea* como monofilética com alto suporte. As análises das sequências de *rbcL* evidenciaram, ainda, distinta separação entre as espécies *B. puiggarianum* (Brasil) e *B. atrum* (Europa e Ásia) com divergência interespecífica de 45-76 pb (3,5-5,9%). Os níveis de divergência intraespecífica foram de: 1-34 pb (0,1-2,6%) para *B. puiggarianum* e 6-22 pb (0,5-1,7%) para *B. atrum*. As sequências das amostras brasileiras identificadas como *B. atrum* apresentou variação intraespecífica de 4pb (0,3%) e divergência interespecífica com relação às demais da espécie: 35-47 pb (2,7-3,7%). Para as análises de *cox1* as sequências de *B. puiggarianum* apresentaram variação intraespecífica de 0-17 pb (0-2,5%), enquanto que as de *Batrachospermum sp.* do Brasil de 4pb (0,6%). A análise de “barcode gap” por ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) revelou que *B. puiggarianum* representa uma mesma entidade taxonômica e *Batrachospermum sp.* pode ser reconhecida como uma nova espécie (críptica). Análises baseadas nas sequências de *rbcL* e *cox1* revelaram níveis de divergência suficientes para distinguir espécies dentro da seção e demonstraram que ambos representam bons marcadores para realizar comparações intra e interespecíficas e inferir filogenia neste grupo de *Batrachospermales*. As análises morfológicas revelaram uma sobreposição relativamente alta para as características morfométricas entre as duas espécies. Por outro lado, foi possível distingui-las com base em caracteres vegetativos. A principal característica diagnóstica descrita em trabalhos anteriores foi confirmada neste estudo. Os fascículos primários são aderidos uns aos outros e às células dos filamentos rizoidais, resultando em verticilos compactos em *B. puiggarianum*. Em contraste, os fascículos primários não são aderidos uns aos outros ou às células dos filamentos rizoidais, resultante em verticilos não compactos em *B. atrum*. Dessa forma, pôde-se concluir com base nos dados moleculares e morfológicos que: 1) a seção *Setacea* corresponde a um grupo monofilético dentro do gênero *Batrachospermum*; 2)

as duas espécies mostraram-se nitidamente separadas por caracteres morfológicos e evidências moleculares; 3) as amostras de *B. puiggarianum* do Brasil apresentaram níveis de divergência altos, mas uma variação contínua e sem grupos internos bem delimitados, o que permite tratá-las como uma única espécie; 4) os níveis de divergência das amostras do Brasil identificadas como *B. atrum* para ambos marcadores, assim como sua posição nas árvores, permitem concluir que representam uma espécie geneticamente distinta, provavelmente endêmica do Brasil; entretanto, não foi detectado qualquer caráter morfológico diagnóstico para separar *B. atrum* de *Batrachospermum sp.* e a distinção entre as duas foi baseada na distribuição geográfica disjunta (Europa-Ásia x América do Sul - Brasil) e na existência de “barcode gap” entre as sequências de *cox1*, que foi confirmada pelas análises das sequências de *rbcL*. Em síntese, ambas as hipóteses foram corroboradas.

Palavras-chave: “barcode”, Batrachospermales, *Batrachospermum*, *cox1*, filogenia, *rbcL*, Rhodophyta, *Setacea*.

ABSTRACT

Section *Setacea* of the genus *Batrachospermum* was recognized as a monophyletic group in a recent revision of the order Batrachospermales. However, its taxonomic status was not clearly determined because it was positioned within a group named *Australasica* composed by taxa from Australia and New Zealand. Previous studies combining molecular and morphological data focused only on the phylogenetic relationships among the major groups (genera or sections), whereas approaches aiming to evaluate the number of species were initiated just recently and are still scarce and poorly sampled. Based on this background, the following hypotheses were tested in this study: 1) the section *Setacea* represents a monophyletic group within the order Batrachospermales; the recognition of the group associated to the fact that the genus *Batrachospermum* is paraphyletic could result in the raising of the section to a higher taxonomic level (possibly genus); 2) the species presently recognized in the section based on morphological characters will be confirmed by molecular evidence; in addition, other species (particularly cryptic species) are expected to be found and recognized within the section. This study aimed to: 1) infer the phylogenetic relationships of section *Setacea* with other groups (genera and sections) of the Batrachospermales, as well as the inter and intra-specific limits of variation for the species within the section based on sequence analysis for the *rbcL* and *cox1* barcode region; 2) elaborate a revisionary study by reevaluating the diagnostic taxonomic characters for the species of the section in the light of the new molecular data. Fifteen samples were analyzed, thirteen from southern and southeastern Brazil and two from other continents (Asia – Japan; Europe – Spain). The specimens were collected in waters with low to moderate temperatures, slightly acidic, turbulent and mean to moderate oxygen concentrations (oligotrophic and oligosaprobic conditions). Morphological data for the samples analysed were mostly within the ranges reported in relevant studies. However, some morphometric characters (internode, primary fascicles and carposporophytes) were near or above the upper previously reported limits. Twenty-seven new sequences were generated for the two molecular markers: 14 for *rbcL* and 13 for *cox1* (including one of minibarcode). Analyses based on both markers were essentially congruent and

revealed the section *Setacea* as a highly supported monophyletic group. Analyses for *rbcL* have also evidenced a distinct separation among two species *B. puiggarianum* (from Brazil) and *B. atrum* (Asia and Europe) with an inter-specific divergence of 45-76 bp (3.5-5.9%). The intra-specific divergences within each species were of: 1-34 bp (0.1-2.6%) for *B. puiggarianum* and 6-22 pb (0.5-1.7%) for *B. atrum*. The sequences of two Brazilian samples identified as *B. atrum* had inter- and intra-specific divergences of 35-47 bp (2.7-3.7%) and 4 bp (0.3%), respectively. Analyses for *cox1* revealed *B. puiggarianum* with an intra-specific divergence of 0-17 pb (0-2.5%), whereas the samples of *Batrachospermum sp.* differed by 4 bp (0.6%). Barcode gap analysis by ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) revealed that *B. puiggarianum* represents only one taxonomic entity, whereas *Batrachospermum sp.* can be recognized as a distinct (cryptic) species. Analyses based on *rbcL* e *cox1* sequences revealed divergence levels to distinguish species within the section and showed that both are good markers for, respectively, infer phylogeny and analyze intra and inter-specific variation. Morphological analyses revealed a relatively high overlap for morphometric characters among the two species. On the other hand, vegetative characters allowed to distinguish them. The main diagnostic character described in previous studies was confirmed in this investigation: primary fascicles are attached to one another and to the cells of the rhizoidal filaments, resulting in compact whorls in *B. puiggarianum*. In contrast, primary fascicles are not attached to one another, resulting in non-compact whorls in *B. atrum*. Thus, the following conclusions were reached from molecular and morphological data: 1) the section *Setacea* is a monophyletic group within the genus *Batrachospermum*; 2) the two species were clearly separated from based on morphological and molecular evidences; 3) the sequences of *B. puiggarianum* from Brazil had high divergence levels, but with a continuous variation and no clear internal groups, allowing to treat all samples as a single species; 4) the divergence levels of the sequences for two samples from Brazil identified as *B. atrum* for both markers, as well as their positioning in the trees, allowed to conclude that they represent a genetically distinct species, probably endemic from Brazil (named *Batrachospermum sp.*); however, no morphological characters were detected to distinguish it from *B. atrum* and the distinction was based on the disjunct geographic distribution (Europe-Asia x South America –

Brazil) and the existence of a barcode gap among the *cox1* sequences, which was confirmed by *rbcL* sequence analyses. In summary, both hypotheses were corroborated.

Key words: barcode, Batrachospermales, *Batrachospermum*, *cox1*, phylogeny, *rbcL*, Rhodophyta, *Setacea*.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Gênero <i>Batrachospermum</i>	5
1.2. Seção <i>Setacea</i>	6
1.3. Sistema de identificação microgenômica: DNA “barcoding”	9
1.4. Hipóteses	11
1.5. Objetivos	11
2. Materiais e métodos.....	12
2.1. Características ambientais.....	15
2.2. Preservação	15
2.3. Análises morfológicas	16
2.4. Análises Moleculares	18
2.4.1. Extração de DNA	18
2.4.2. Amplificação de DNA.....	18
2.4.3. Eletroforese em gel de agarose.....	20
2.4.4. Purificação e quantificação dos produtos de PCR.....	21
2.4.5. Sequenciamento e alinhamento	21
2.5. Análises Filogenéticas	23
3. Resultados	27
3.1. Variáveis ambientais	27
3.2. Análises moleculares	29
3.2.1. Análise das sequências de <i>rbcl</i>	29
3.2.2. Análise das sequências de <i>cox1</i> e de “minibarcodes”.....	34
3.3. Análises Morfológicas	44
4. Discussão.....	57
5. Conclusões.....	64
6. Referências Bibliográficas.....	65

1. Introdução

As algas vermelhas, filo Rhodophyta, representam um grupo antigo de algas e podem ser encontradas na maioria das regiões do planeta. É considerado um grupo irmão das algas verdes (Chlorophyta) e também das glaucófitas (LOPEZ-BAUTISTA, 2010). As rodófitas são, em sua maioria, macroscópicas, fotossintetizantes e habitantes de ambientes marinhos (98%), mas muitos táxons são de habitats de água doce e nascentes de água quente e ácida e também foram relatadas em florestas tropicais como membros de comunidades subaéreas (YOON et al., 2004; GURGEL & LOPEZ-BAUTISTA, 2007). Em regiões tropicais e subtropicais dos ecossistemas marinhos costeiros, Rhodophyta representa mais de 60% das macroalgas (NORTON et al., 1996). No Brasil, 642 espécies de macroalgas marinhas são conhecidas ao longo da costa do país, sendo que as rodófitas somam 388 espécies, correspondendo a cerca de 60% da diversidade de macroalgas (HORTA et al., 2001). As rodófitas continentais ocorrem geralmente em águas correntes e estão amplamente distribuídas em bacias de drenagem de regiões árticas a tropicais (NECCHI et al., 1999). No Brasil foram registradas aproximadamente 50 espécies de rodófitas continentais (NECCHI, 1989; 1990b; NECCHI et al. 1999; 2010; dados não publicados).

Além de sua importância evolutiva e ecológica, as Rhodophyta apresentam grande importância econômica, movimentando mais de dois bilhões de dólares por ano, principalmente como alimento humano ou para a extração de substâncias químicas de natureza diversa, como os ficocoloides (ARMISEN, 1995). Estes organismos são fontes exclusivas de certos hidrocoloides como o ágar-ágar e as carragenanas, que são imprescindíveis à vida no mundo moderno (CRICHLEY & OHNO, 1998). Estes compostos são utilizados em indústrias farmacêuticas e alimentícias, além do grande uso em laboratórios biológicos (SMIT, 2004; GRAHAM et al., 2009).

Rodófitas ou algas vermelhas representam um distinto grupo de organismos eucarióticos que possuem apenas clorofila a, contêm ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) responsáveis pela coloração geralmente avermelhada destas algas, que ocorrem na forma de

ficobilissomos em tilacoides não empilhados. Os membros desse grupo não apresentam flagelos e centríolos em nenhum estágio de vida (GRAHAM et al., 2009). O cloroplasto é envolto por duas membranas e produz amido das florídeas (material de reserva), que é armazenado no citoplasma. Atualmente é amplamente aceito que o cloroplasto das algas vermelhas originou-se através da endossimbiose primária de uma cianobactéria, sendo que essa organela compartilha um ancestral comum com algas verdes e glaucófitas (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1995; CAVALIER-SMITH, 1998; MCFADDEN, 1999; BHATTACHARYA et al., 2004; RODRIGUEZ-EZPELETA et al., 2005).

As algas vermelhas formam uma das principais linhagens monofiléticas dentro dos eucariotos sendo tradicionalmente classificadas no filo Rhodophyta, na qual é dividido em duas classes ou subclasses, Florideophyceae (Florideophycidae) e Bangiophyceae (Bangiophycidae), baseadas nas características morfológicas e histórico de vida (GABRIELSON et al., 1985). Entretanto, estudos concluíram que a classe Florideophyceae forma um grupo monofilético com a ordem Bangiales, que pertence a classe Bangiophyceae (OLIVEIRA & BHATTACHARYA, 2000; MULLER et al., 2001; YOON et al., 2002; SAUNDERS & HOMMERSAND, 2004). No passado, Bangiophyceae foi dividida em seis ordens (Bangiales, Cyanidiales, Compsopogonales, Erythropeltiales, Porphyridiales, e Rhodochaetales), que atualmente é formada por uma série de radiações que definem as linhagens ancestrais das algas vermelhas (FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994). A subclasse Florideophycidae é monofilética, apresenta uma maior complexidade morfológica e de histórico de vida e inclui 99% dos gêneros de algas vermelhas (RAGAN et al., 1994; FRESHWATER et al., 1994). Bangiophyceae é composta pelo grupo ancestral que deu origem às Florideophyceae e ao cloroplasto das algas cromófitas através de endossimbiose secundária (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1995; OLIVEIRA & BHATTACHARYA, 2000) e constitui um grupo parafilético (FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994; MÜLLER et al., 2001).

Muller et al. (2001) compararam sequências do gene nuclear que codifica a subunidade ribossômica pequena (SSU rDNA) para vinte membros de Bangiophycidae e de dois membros de Florideophycidae para obter informações sobre a evolução do grupo. Com base em suas análises eles

mostraram que o filo Rhodophyta é formado por duas classes, Florideophyceae e Bangiophyceae, sendo este último composto por oito ordens: Bangiales, Porphyridiales (1, 2 e 3), Compsopogonales, Erythropeltoidales, Rhodochaetales e Cyanidiales (Figura 1). Saunders & Hommersand (2004) utilizaram informações sobre filogenia molecular (marcadores SSU e gene plastidial que codifica a subunidade grande da RuBisCO – *rbcL*), diversidade e registro fóssil das algas vermelhas para revisar a taxonomia do grupo, propondo a criação do sub-reino Rhodoplantae com dois filis, Cyanidiophyta e Rhodophyta, sendo o último subdividido nos subfilos Rhodellophytina (classe Rhodellophyceae), Metarhodophytina (classe Compsopogonophyceae) e Eurhodophytina (classes Bangiophyceae e Florideophyceae) (Figura 1). No entanto, Yoon et al. (2006) propuseram, com base em evidências de resultados de múltiplos marcadores moleculares, sete linhagens de Rhodophyta reconhecidas como classes. Foi proposta a criação dos subfilos Cyanidiophytina (classe Cyanidiophyceae), que foi o primeiro grupo a divergir na evolução das rodófitas, e Rhodophytina. Este último agrupa todas as demais classes de algas vermelhas e está subdividido em: Florideophyceae, Bangiophyceae, Rhodellophyceae, Porphyridiophyceae, Stylonematophyceae e Compsopogonophyceae; as classes Bangiophyceae e Florideophyceae formam um grupo monofilético (YOON et al., 2006) (Figura1).

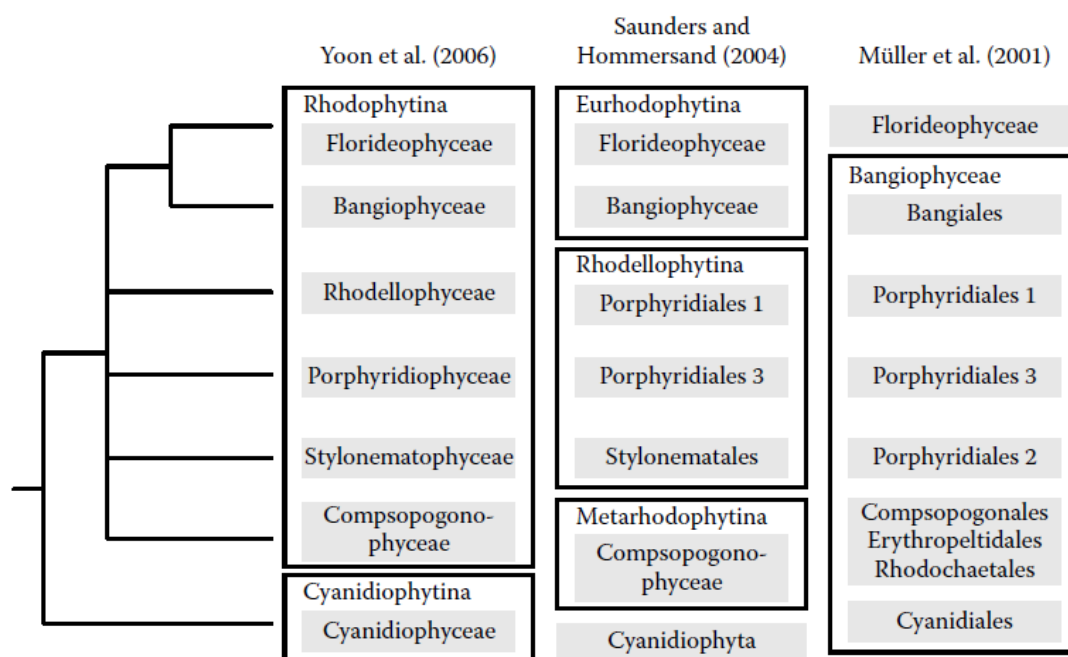


Figura 1: Filogenia das algas vermelhas segundo autores recentes (YOON et al, 2006). Três esquemas da classificação das algas vermelhas para subfilos (caixas) e classes/ordens (sombra) são representados.

A classe Florideophyceae apresenta a maioria das espécies conhecidas de algas vermelhas, que totalizam aproximadamente 6.000 espécies (GRAHAM et al., 2009). O número de ordens reconhecidas varia de 16 (YOON et al., 2006) a 23 (LE GALL & SAUNDERS, 2007) e tende a crescer com a realização de estudos de grupos específicos baseados em dados moleculares. Tradicionalmente, as ordens e famílias de Florideophyceae foram classificadas, em grande parte, com base no tipo de histórico de vida e o modo de reprodução sexuada (FRESHWATER et al., 1994; GRAHAM et al., 2009). Membros desta classe têm crescimento apical, ou seja, crescem por meio de células apicais. Consistem inteiramente de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas através de “pit-connections” (conexões intercelulares entre células adjacentes), que em nível estrutural formam os “pit-plugs” (GRAHAM et al., 2009). Características ultraestruturais dos “pit-plugs”, como número e arranjo das camadas, são importantes para a delimitação das ordens (FRESHWATER et al., 1994). Vários tipos de “pit-plugs” foram identificados por diferirem no número de caplayers (zero, um ou dois) e pela presença ou ausência de uma capmembrane. Nove ordens (Hildenbrandiales, Corallinales, Acrochaetiales, Palmariales, Batrachospermales, Ahnfeltiales, Bonnemaisoniales, Gracilariales e Rhodogorgonales) foram estabelecidas principalmente pelas características ultraestruturais dos “pit-plugs” (FRESHWATER et al., 1994).

Dentro de Florideophyceae, a ordem Batrachospermales é distinta das demais por apresentar um histórico de vida heteromórfico (presença da fase alternante denominada estágio “Chantransia”), ausência de tetrasporângio e ocorrência de meiose somática, “pit-plug” com duas camadas e por ser estritamente de água continental (SHEATH, 1984). Batrachospermales é composta por três famílias: Batrachospermaceae, Lemaneaceae e Psilosiphonaceae (SAUNDERS & HOMMERSAND, 2004). Entwisle et al. (2009) adotaram apenas uma família (Batrachospermaceae) com circunscrição expandida (incluindo Lemaneaceae e Psilosiphonaceae).

Necchi & Entwisle (1990) propuseram uma revisão na classificação dessa ordem ao questionarem se a classificação de vários táxons era

informativa, consistente e filogeneticamente coerente. Assim, quando Vis et al. (1998) publicaram a primeira árvore filogenética baseada em dados moleculares, ficou claro que uma nova reestruturação, com base nos dados morfológicos e citológicos, deveria ser proposta à luz dos novos dados moleculares. A proposta de Entwisle et al. (2009) representa o esquema taxonômico mais recente e atualizado para a ordem. A principal novidade, além do reconhecimento de uma única família (*Batrachospermaceae* com nove gêneros), foi o reconhecimento do gênero *Kumanoa*, resultado da elevação das antigas seções *Contorta* e *Hybrida* do gênero *Batrachospermum*. A elevação de grupos monofiléticos menores (geralmente reconhecidos como seções de *Batrachospermum*) para o nível gênero será a tendência na taxonomia do grupo nos próximos anos e o exemplo mais recente foi a proposição do gênero *Sheathia* (antiga seção *Helminthoidea*, SALOMAKI et al., 2014).

1.1 Gênero *Batrachospermum*

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, o gênero *Batrachospermum* Roth (família *Batrachospermaceae*) é o mais especioso, com 112 espécies reconhecidas mundialmente (KUMANO, 2002), bem como bastante diverso morfológicamente. *Batrachospermum* difere dos outros gêneros da ordem com base nas seguintes características: talo geralmente flácido, mais ou menos mucilaginoso, e composto por distintos filamentos axiais com verticilos regulares e de ramos laterais de crescimento definido; carposporófitos (ausentes em *B. brasiliense* Necchi) esféricos ou semiesféricos, resultantes do carpogônio fecundado; ramo carpogonial mais ou menos reto e radialmente simétrico (não torcido espiralmente ou fortemente curvado) (KUMANO, 2002; ENTWISLE et al., 2009). No histórico de vida de *Batrachospermum*, o gametófito é dominante e suas características são utilizadas na discriminação taxonômica em nível específico. Além disso, este gênero apresenta reprodução oogâmica, na qual o espermácio que não possui flagelo fecunda o carpogônio. *Batrachospermum* e outros gêneros relacionados não apresentam tetrásporo, mas possuem dois estágios esporofíticos,

carposporófito e estágio “Chantransia”, e um gametófito (KUMANO, 2002; SHEATH, 2003).

Do ponto de vista sistemático, este gênero tem sido demonstrado como parafilético em todos os estudos filogenéticos moleculares já realizados (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2005). ENTWISLE et al. (2009) realizaram uma revisão da ordem Batrachospermales, combinando dados morfológicos e moleculares (dois marcadores: *rbcL* e *SSU*), que resultou em novas informações importantes sobre o gênero *Batrachospermum*: reconhecimento provisório do gênero, visto que tem sido demonstrado como parafilético; elevação das seções *Contorta* e *Hybrida* ao nível genérico (*Kumanoa*); e reconhecimento de oito seções no gênero – *Acarposporophytum* (rebaixado do nível sub-gênero para seção), *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora* (separada de *Aristata*), *Setacea*, *Turfosa* e *Virescentia*. A maioria das seções, especialmente aquelas com pequeno número de espécies (*Acarposporophytum*, *Aristata*, *Macrospora* e *Setacea*), carecem de análises moleculares mais representativas incluindo maior número de espécies e de populações de cada espécie.

1.2 Seção *Setacea*

Dentre as seções do gênero *Batrachospermum*, a seção *Setacea* (DE TONI, 1897) corresponde a espécies que apresentam: verticilos reduzidos e pequenos; ramos carpogoniais curtos (com poucas células), bem diferenciados dos fascículos primários e originados das células pericentraes; carpogônios com tricogínios claviformes ou elípticos; e carposporófitos assemelhando-se a protuberâncias sobre o eixo central (KUMANO, 2002).

Mori (1975) descreveu *B. atrum* para o Japão com base na análise morfológica de 33 espécimes coletados em diferentes localidades do Japão. Necchi (1990b) delineou as características morfológicas de *B. atrum* e *B. puiggarianum*, através da análise morfológica de amostras coletadas no Brasil. Entwisle (1992) realizou uma reavaliação dos dados morfológicos de *B. atrum* e *B. puiggarianum* incluindo a descrição de uma nova espécie, *B. diatyches* da Tasmânia, Austrália. A partir da análise de seis populações norte-americanas da seção *Setacea* e oito espécies tipo, Sheath et al. (1993) reconheceram

quatro espécies para esta seção: *B. androinvolucrum*, *B. diatyches*, *B. atrum* e *B. puiggarianum*. Entwisle & Ford (1998) estabeleceram uma nova espécie, *B. latericum*, da Tasmânia (Austrália). Atualmente são reconhecidas cinco espécies para a seção *Setacea* (KUMANO, 2002), das quais duas espécies são de ocorrência mais ampla: *B. atrum* (Hudson) Harvey (Europa, América do Sul, África, Ásia e Austrália) (KUMANO, 1982; ENTWISLE, 1992; SHEATH et al., 1993; KUMANO, 2002; ENTWISLE & FOARD, 2007) e *B. puiggarianum* Grunow (América do Sul e África) (NECCHI, 1990a). As demais espécies são de ocorrência restrita: *B. androinvolucrum* (SHEATH et al., 1993), Columbia Britânica, Canadá, estados de Washington e Alabama, E.U.A.), *B. diatyches* (ENTWISLE, 1992) e *B. latericum* (ENTWISLE & FOARD, 1998), ambas endêmicas da Tasmânia (Austrália).

Batrachospermum androinvolucrum apresenta como caracteres diagnósticos espermatângios formados nos filamentos involucrais do ramo carpogonial (SHEATH et al., 1993). *Batrachospermum latericum* apresenta espermatângios terminais somente nos fascículos primários ou secundários, que são constituídos de 2-4 células (ENTWISLE & FOARD, 1998). *Batrachospermum diatyches* apresenta as mesmas características que *B. latericum*, no entanto os fascículos primários são constituídos por 4-6 células (ENTWISLE, 1992). Estas duas últimas espécies apresentam filamentos rizoidais compostos por células muito grandes, bem maiores do que as das outras espécies da seção. A distinção entre *B. atrum* e *B. puiggarianum* refere-se principalmente às características dos verticilos: em *B. atrum* os verticilos não são compactos, com fascículos primários separados, enquanto *B. puiggarianum* apresenta verticilos muito compactos, em que os fascículos são aderidos aos filamentos rizoidais e não podem ser distinguidos individualmente (NECCHI, 1990a; ENTWISLE, 1992).

Esta seção foi originalmente separada da seção *Virescentia* por apresentar verticilos reduzidos encontrados em duas espécies constituintes da seção (Sirodot, 1884). No entanto, para Necchi & Entwisle (1990) a inclusão de todas as espécies que apresentavam verticilos reduzidos (<400 µm de diâmetro) na seção *Setacea* era inconsistente com as outras seções, na qual se distinguem basicamente pela sua morfologia reprodutiva. Dessa forma, a seção *Setacea* foi incluída na seção *Virescentia* por Necchi & Entwisle (1990) por apresentar

características (morfológicas reprodutivas) semelhantes com outras espécies da seção. Entretanto, Vis et al. (1998), utilizando dados moleculares, destacaram que o grupo apresentou suporte na árvore filogenética justificando seu reconhecimento como seção separada. Esta seção foi aceita provisoriamente por Entwisle et al. (2009), porém seu “status” taxonômico não pode ser determinado, porque nas análises posicionou-se dentro ou vizinho do grupo denominado Australasica, composto de táxons da Austrália e Nova Zelândia.

A seção *Setacea* foi reconhecida provisoriamente como grupo monofilético na revisão recente da ordem Batrachospermales (ENTWISLE et al., 2009). Estudos já publicados combinando dados moleculares e morfológicos enfocaram apenas as relações filogenéticas entre os grupos maiores (gêneros ou seções) e abordagens visando avaliar o número de espécies só foram iniciadas muito recentemente e são ainda escassas. Nesse aspecto, só foi publicado, até o presente, o tratamento monográfico do gênero *Kumanoa* (NECCHI & VIS 2012; VIS et al., 2012).

Os resultados encontrados para *Kumanoa*, bem como dados preliminares para outros grupos em fase inicial de estudo (gêneros *Sirodotia*, LAM et al., 2012; e seções *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Macrospora*, *Turfosa* e *Virescentia* de *Batrachospermum*, NECCHI, VIS e colaboradores, em andamento e SALOMAKI et. al., 2014) tem evidenciado tendências muito interessantes e surpreendentes. A diversidade genética no nível específico tem sido muito maior do que a inicialmente prevista, isto é, número consideravelmente maior de espécies tem sido encontrado em relação aos estudos anteriores, bem como têm sido verificada a ocorrência de espécies crípticas. Essas últimas têm sido detectadas com alto nível de divergência genética, porém sem a correspondente distinção morfológica, mas em alguns casos, apenas geográfica (p.ex. ocorrência de linhagens distintas geneticamente, mas não morfolologicamente, entre continentes). Exemplo disso é o gênero *Sirodotia* que foi tratado em estudo bem recente (LAM et al., 2012) com inclusão de número expressivo de sequências de regiões do globo ainda não exploradas (especialmente Europa e África) em que foi encontrada provável espécie nova para amostra da África do Sul. Essa tendência certamente levará à proposição futura de espécies com base exclusivamente

em dados genéticos e/ou geográficos. Outra tendência que parece inevitável é a separação do gênero *Batrachospermum* em vários gêneros distintos. A posição taxonômica da seção *Setacea* dentro do gênero *Batrachospermum* carece ainda de avaliação mais criteriosa e representativa e este trabalho propõe fornecer subsídios para revisão do grupo, tanto das espécies reconhecidas dentro da seção, como das relações filogenéticas com outras seções do gênero.

1.3. Sistema de identificação microgenômica: DNA “barcoding”

As algas vermelhas, por serem um grupo extremamente variado de organismos, são difíceis de serem identificados usando apenas a morfologia. Apresentam características morfológicas e anatomia relativamente simples e às vezes convergente, grande plasticidade fenotípica e alternância de gerações heteromórficas no ciclo de vida (SAUNDERS, 2005; ROBBA et al., 2006). Dessa forma, a limitação no sistema de identificação baseada na morfologia sinaliza a necessidade de uma nova abordagem para a identificação de táxons. E assim, muitos pesquisadores têm utilizado cada vez mais ferramentas moleculares para auxílio na taxonomia e biogeografia de algas (SAUNDERS, 2005).

Esse sistema de identificação de espécies, DNA “barcoding”, consiste na análise de pequenos segmentos de DNA (HEBERT et al., 2003). Em termos reais, essas sequências de DNA utilizadas para identificar organismos podem ser vistas como um “código de barras” que está contido em todas as células. Esta técnica de identificação de espécies é baseada na amplificação de um segmento de DNA relativamente curto (~400-700 pares de bases) por meio da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e que podem ser inteiramente sequenciados com a utilização de dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) (MADIGAN et al., 2010). O sistema de “barcoding” é prático e uniforme para a identificação de espécies, além do que os dados gerados possuem ampla aplicação, com grande utilidade em levantamentos de biodiversidade e em conservação (COSTION et al., 2011; PAZ & CRAWFORD, 2012). O método de

“barcoding” pode ser aplicado mesmo quando as técnicas tradicionais não são viáveis, como por exemplo, em organismos que apresentam estado juvenil ou que foram obtidos em conteúdo estomacal (NEIGEL et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009; EATON et al., 2010). No caso das algas vermelhas, a presença de estruturas reprodutivas é muitas vezes necessária para a identificação morfológica, e na ausência dessas, a determinação da espécie e até mesmo do gênero fica impossibilitada (SAUNDERS, 2005). O DNA “barcoding” permite ainda a detecção de espécies crípticas (linhagens geneticamente distintas com alta similaridade morfológica) e fornece dados que ajudam a entender a diversidade e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação (SMITH et al., 2006; SMITH et al., 2007, SHERWOOD et al., 2008).

A ideia de se utilizar um gene mitocondrial (que codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase – *cox1*) baseou-se nas características apresentadas pelo genoma mitocondrial tais como: ser amplamente distribuído entre os animais, é de herança haploide, tem a capacidade de projetar “primers” universais em porções restrita do gene, apresenta poucas inserções e deleções e costuma apresentar uma variabilidade suficiente para distinguir espécies (apresenta uma taxa relativamente elevada de divergência) (HEBERT et al., 2003; SAUNDERS, 2005).

De acordo com os estudos feitos por Saunders (2005) e Robba et al. (2006), a região de “barcode” do gene *cox1* funciona para delimitar espécies de algas vermelhas, mas também pode identificar espécies crípticas ou eventos de especiação. Dessa forma, essa região do gene *cox1* tem sido muito utilizada como um marcador clássico para estudos desse tipo, com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores (‘primers’) e termociclos específicos para diferentes grupos (SAUNDERS, 2005; SAUNDERS & MCDEVITT, 2012). Este marcador tem demonstrado níveis de variação suficientes e apropriados para avaliação de variabilidade genética específica em representantes de Batrachospermales (SHERWOOD et al., 2008). Assim, a região de “barcode” do gene *cox1* tem sido muito empregada em diversos estudos para o reconhecimento de espécies.

1.4. Hipóteses

Com base nas informações atualmente disponíveis (morfológicas e moleculares) em âmbito mundial sobre representantes da ordem Batrachospermales e da seção *Setacea*, em particular, as seguintes hipóteses foram testadas: 1) A seção *Setacea* do gênero *Batrachospermum* constituirá grupo monofilético dentro da ordem Batrachospermales; o reconhecimento desse grupo associado ao fato de *Batrachospermum* ser parafilético resultará na elevação desta seção para o nível gênero; 2) As espécies atualmente reconhecidas na seção com base em caracteres morfológicos serão corroboradas pelos dados moleculares; além dessas espécies, outras (particularmente espécies crípticas) deverão ser encontradas e reconhecidas como espécies distintas dentro da seção.

1.5. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos: 1) Inferir as relações filogenéticas da seção *Setacea* com os outros grupos (gêneros e seções) da ordem Batrachospermales, bem como os limites de variação inter e intra-específica das espécies dentro da seção, com base na análise das sequências do gene *rbcL* e da região de “barcode” do gene *cox1*; 2) Elaborar estudo de revisão para a seção *Setacea* por meio da reavaliação dos caracteres taxonômicos diagnósticos para espécies deste grupo, à luz dos novos dados moleculares.

2. Materiais e métodos

Foram analisadas 15 amostras envolvendo duas espécies da seção *Setacea* de *Batrachospermum*: *B. atrum* e *B. puiggarianum* (Tabela 1). Dentre estas amostras, uma foi proveniente da Espanha e outra do Japão, enquanto que as demais foram coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil (Figura 2). Com relação às outras espécies da seção, estudos moleculares recentes em andamento por Vis e colaboradores (dados não publicados) revelaram que a espécie australiana *B. diatyches* situou-se fora da seção *Setacea*, próxima de *B. theaquum* (grupo *Australasica*) nas árvores filogenéticas. E espera-se situação semelhante para *B. latericium*, apesar de não disporem ainda de dados moleculares para essa espécie. *Batrachospermum androinvolucrum* pode presumivelmente situar-se também fora desta seção. Com base nesses dados recentes decidimos incluir apenas espécies com dados moleculares que evidenciem inequivocamente sua posição taxonômica dentro da seção *Setacea* e as espécies acima referidas não foram, portanto, consideradas neste trabalho.

As amostras destinadas às análises morfológicas foram incorporadas ao Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica (SJRP, THIERS, 2014) e as utilizadas para análises moleculares armazenadas na coleção do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas, UNESP, São José do Rio Preto.

Tabela 1: Relação das amostras de *Batrachospermum*, seção *Setacea* utilizadas neste estudo.

Espécies	Código	Local, coletor, data de coleta e n.º. herbário
1– <i>Batrachospermum atrum</i>	PEVV	PR: Parque Estadual de Vila Velha; 25°14'42"S, 50°00'55" W, altitude 803m; D. C. Agostinho, 19.xi.2013 (SJRP 31460).
2– <i>Batrachospermum atrum</i>	CJ1	SP: Pindamonhangaba, 9 km da entrada Parque Estadual de Campos do Jordão; estrada para "Mirante"; 22°43'21"S, 45°27'13"W, altitude 1865 m; O. Necchi Jr., 22.v.2008 (SJRP 31461).
3– <i>Batrachospermum atrum</i>	ESP	Espanha: Málaga, Cañetela Real, La Atalaya, Manantial de Los Chopos; 36°59'169"N, 4°32'38"W, altitude 584m; I. S. Chapuis & G. Muñoz (6433), 18.iv.2012 (SJRP 31462).
4– <i>Batrachospermum atrum</i>	JAP	Japão: Tóquio, Shimo-dokanbori, the Imperial Palace; 35°41'05" N, 139°45'05" E; T. Kitayama, 30.v.2011 (SJRP 31463).
5– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	RPD	PR: Guarapuava, Rio das Pedras, 25°23'55"S, 51°24'28"W; O. Necchi Jr. & C.C.Z. Branco, 22.vii.2006 (SJRP 31465).
6– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	RSB	PR: Guaraqueçaba, Res. Ecológica Rio Sebuí, foz do Rio Sebuí; 25°17'26"S, 42°13'45"W; E.C. Oliveira Fo., 21.ix.2008 (SJRP 31466).
7– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	PAS 2	RS: Cambará do Sul, Parque Nacional de Aparados da Serra, rio Camisas; 29°10'44"S, 50°08'13"W, altitude 939 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009 (SJRP 31467).
8– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	PAS 3	RS: Cambará do Sul, Parque Nacional de Aparados da Serra, rio Preá; 29°09'48"S, 50°05'49"W, altitude 927 m; C.C.Z. Branco, 31.v.2008 (SJRP31468).
9– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	PAS 5	RS: Cambará do Sul, Parque Nacional de Aparados da Serra, rio Camarinhas, em frente ao hotel; 29°06'24"S, 50°07'31"W, altitude 953 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009 (SJRP31469).
10– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	CAMB	RS: Cambará do Sul, Arroio Baio Branco, cruzamento com a Rod. RS-020; 29°12'36"S, 50°14'22"W, altitude 923 m; O. Necchi Jr., 11.vi.2009 (SJRP 31470).
11– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	BRT	SP: Brotas, Parque dos Saltos. 22°17'30" S, 48°07'51" W; N. L. Rossignolo et.al. 09.x.2012 (SJRP 31471).
12– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	CJ4	SP: Campos do Jordão, Cachoeira Cassununga; 22°47'10"S, 45°42'44"W, altitude 965 m; O. Necchi Jr., 22.v.2008 (SJRP 31472).
13– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	SP187337	SP: Itapeçerica da Serra, Rod. Itapeçerica da Serra, km 52; A. B. Joly 169, 28.IV.1954 (SP187337) (SJRP 31473).
14– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	BPJ3	SP: Jumorim, afluente do Rio Sorocaba; 23°05'13"S, 47°48'56"W, altitude 479 m; O. Necchi Jr., 13.vi.2008 (SJRP 31474).
15– <i>Batrachospermum puiggarianum</i>	BOR	SP: Salesópolis, Estação Biológica de Boracéia, afluente do Rio Claro; 23°38'1"S, 45°49'57"W. O. Necchi Jr., 31.x.2005 (SJRP 31475).

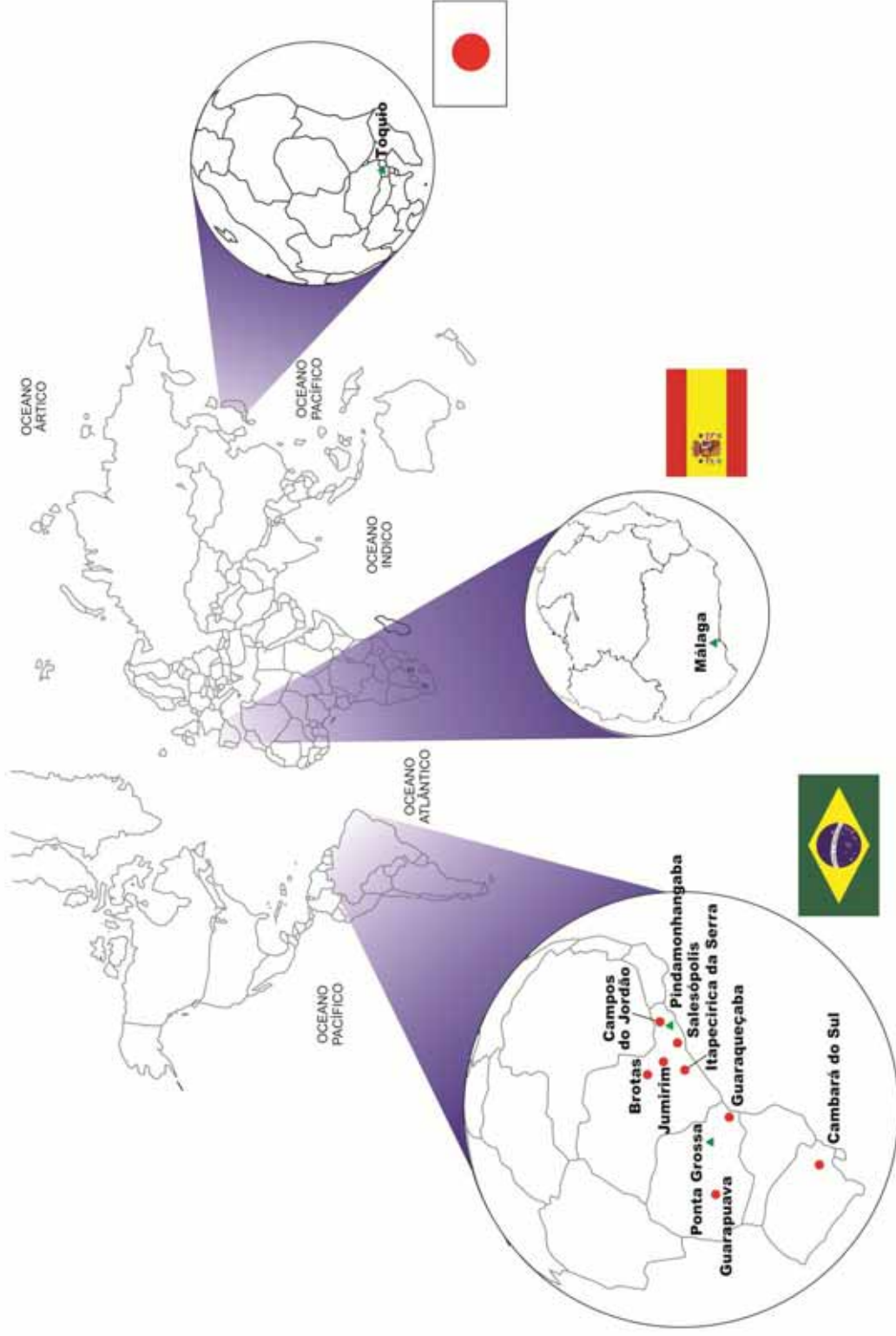


Figura 2: Mapa do Mundo indicando as localidades onde foram amostradas populações de *B. puiggarrianum* (●) e *B. atrum* (▲), conforme descritas na Tabela 1.

2.1. Características ambientais

Informações sobre os limites de ocorrência em relação a variáveis ambientais dos pontos de coleta podem fornecer subsídios para auxiliar no reconhecimento de padrões de distribuição das espécies (SHEATH et al., 1994a; 1994b; 1994c; NECCHI et al., 1999; ELORANTA & KWANDRANS, 2007). Nesse contexto, durante as coletas de espécimes da seção *Setacea*, as seguintes variáveis ambientais foram analisadas em cada segmento de rio/riacho amostrado: temperatura, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido e velocidade da correnteza. Foram utilizados os seguintes equipamentos: medidor digital de qualidade da água “Yellow Springs Instruments, YSI556HPS” para medição de temperatura, condutividade, pH e oxigênio dissolvido; e fluxômetro mecânico “General Oceanics 2030R” (velocidade da correnteza). As medições em campo seguiram os procedimentos descritos em NECCHI et al. (1999). Para detectar eventuais diferenças entre os valores dos parâmetros ambientais entre as espécies foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA, uma via) ao nível de confiança de 95% juntamente com o teste de comparação múltipla “*a posteriori*” de Tukey. Ambos os testes foram realizados com uso do pacote estatístico Minitab, versão 16 (Minitab Inc., E.U.A.) (RYAN et al., 1985).

2.2. Preservação

As amostras destinadas às análises moleculares foram inicialmente secas com papel toalha para redução da umidade, em seguida cobertas com sílica-gel, com troca por sílica seca após 24 horas. Em casos de pouco materiais, as amostras foram preservadas em etanol 100%. Após o acondicionamento em frascos devidamente identificados, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C. Amostras para estudos morfológicos foram fixadas em solução de formaldeído a 4% (NECCHI, 1990b).

2.3. Análises morfológicas

As observações, medições e fotomicrografias foram realizadas com o uso de microscópio estereoscópico binocular “Olympus SZH10” (Olympus America, Center Valley, PA, EUA) e microscópio óptico binocular Leica DM 1000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipado com sistema de captura e análise de imagem Leica composto de: câmera de vídeo digital “Leica DFC 320” e software analisador de imagem Leica LAS (“Leica Application Suite”) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Adotou-se o critério proposto por Necchi (1990a) para análise dos caracteres quantitativos, sendo feitas, em regra, 20 medições ou contagens para cada estrutura morfológica em cada uma das amostras.

Foram analisados todos os caracteres considerados como diagnósticos para o gênero *Batrachospermum* e a seção *Setacea* de acordo com a literatura relevante (NECCHI, 1990b; ENTWISLE, 1992; SHEATH et al., 1993; ENTWISLE & FOARD 1998; KUMANO, 2002). Os seguintes caracteres foram analisados em cada população (Figura 3): forma dos verticilos; abundância de fascículos secundários; arranjo, disposição e número de células dos fascículos primários; origem, dimensões e número de células do ramo carpogonial; dimensões do carpogônio e forma do tricogínio; dimensões dos carposporófitos e carposporângios; número de células dos filamentos gonimoblásticos. Para melhor caracterização e comparação das espécies da seção outros caracteres foram analisados: comprimento dos internós, forma do ápice dos ramos, dimensões dos verticilos e espermatângios, dimensões das células dos filamentos rizoidais (Figura 3).

Foi feita a análise morfológica de apenas um espécime-tipo da seção *Setacea*, *B. puiggarianum* (isótipo), através da análise de lâminas semipermanentes preparadas com solução de glicose de milho (diluída a 75%) e glutaraldeído, a fim de se determinar a afinidade do espécime brasileiro com as espécies descritas para a seção. As lâminas foram montadas a partir de exsicata proveniente do Herbário SP (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil). As lâminas semipermanentes foram etiquetadas e acondicionadas na exsicata junto ao seu respectivo espécime-tipo após análise morfológica.

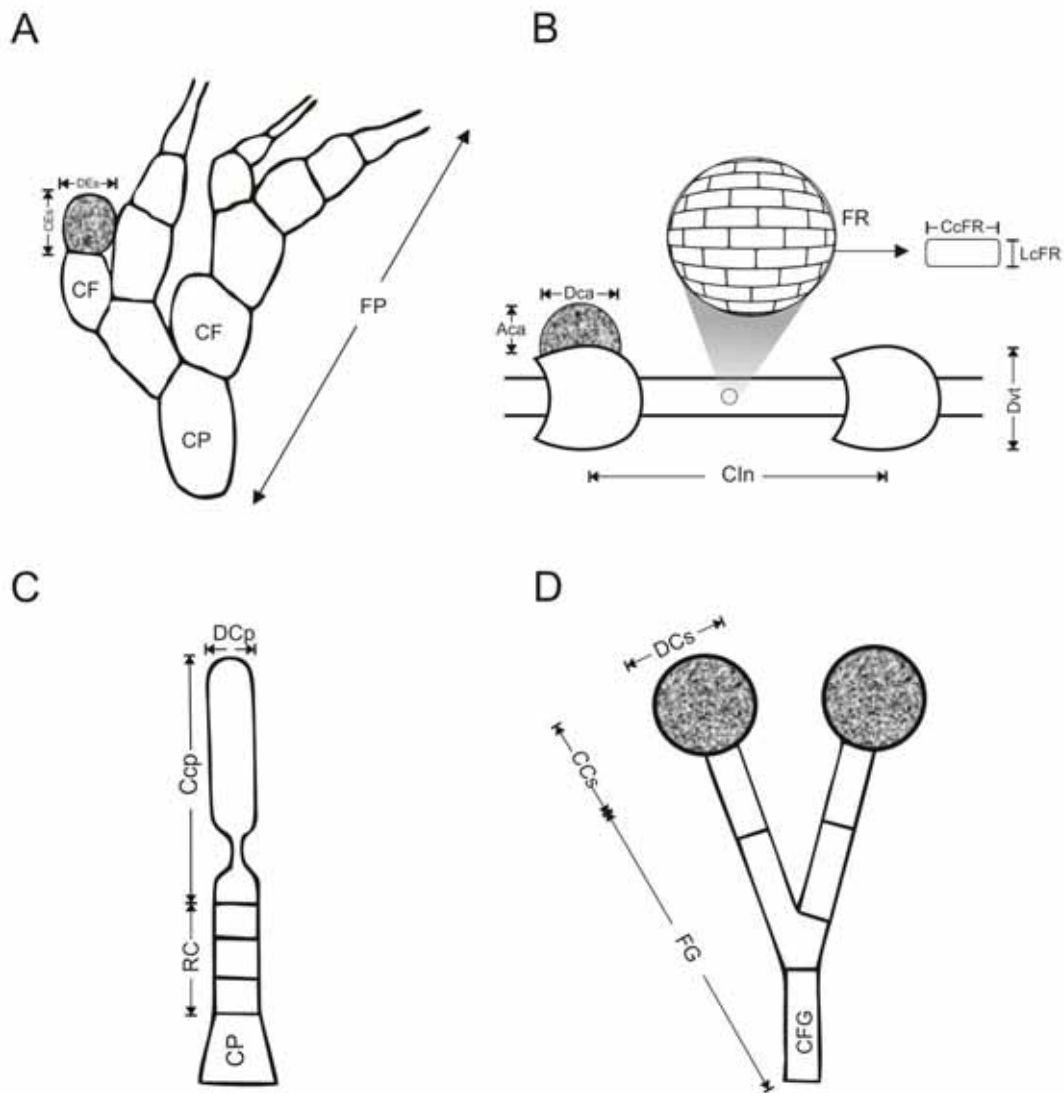


Figura 3: Representação esquemática dos caracteres morfológicos numéricos de *Batrachospermum*. Adaptada de NECCHI (1990a). **A)** Fascículo primário e Espermatângio: CF – célula fascicular; CP – célula pericentral; FP – fascículo primário; R – ramificação; CEs – comprimento do espermatângio; CF – célula fascicular; DEs – diâmetro do espermatângio. **B)** Verticilo e Filamentos rizoidais (FR): Aca – altura do carposporófito; Dca – diâmetro do carposporófito; DVt – diâmetro do verticilo; Cln – comprimento do internó; CcFr – comprimento da célula do filamento rizoidal; LcFr – largura da célula do filamento rizoidal. **C)** Carpogônio: CCp – comprimento do carpogônio; CP – célula pericentral; DCp – diâmetro do carpogônio; RC – ramo carpogonial. **D)** Carposporângio: CCs – comprimento do carposporângio; CFG – célula do filamento gonimoblástico; DCs – diâmetro do carposporângio; FG – filamento gonimoblástico.

2.4. Análises Moleculares

2.4.1. Extração de DNA

O DNA total (genômico) de cada amostra foi macerado com o uso de homogeneizador de tecidos marca Bertin (Bertin Technologies, Bordeaux, França), mod. Precellys®24 com duas microesferas de aço por tubo. As homogeneizações foram conduzidas em dois ciclos a 5.000 rpm durante 20s cada e intervalo entre os ciclos de 20s. O material obtido foi submetido à extração com uso dos kits de extração de DNA “DNeasy plant mini kit®” (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), “Nucleo Spin plant II mini kit” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), “Extract-N-AMP® Plant”, “Relia Prep®g DNA Tissue” (Promega, Madison, EUA) e “MO BIO” (Carlsbad, California), conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. Após uso para as aplicações previstas, as amostras de DNA foram armazenadas em ultra-freezer “Sanyo” (Sanyo North American Corporation, San Diego, E.U.A.), VIP® SERIES (-86°C), modelo MDF-U33V.

2.4.2. Amplificação de DNA

As amplificações de segmentos específicos de DNA foram realizadas através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). As reações de PCR para os marcadores moleculares *rbcL* e *cox1* foram conduzidas utilizando kits de PCR, todos para volume total de 25 µl e concentração de 40 ng/µL: “puReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE HealthCare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), “TopTaq™ Master Mix” (Qiagen, Hilden, Alemanha), “GoTaq® Colorless Master Mix” (Promega, Madison, EUA), Platinum™ DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e “ThermoScientific” (Thermo Fisher Scientific, California, EUA). As misturas fornecidas nos kits contêm: dNTP (desoxinucleosídeos trifosfato), tampão de PCR e Taq polimerase. A essas misturas foram adicionados: água ultra-pura (bi-destilada e deionizada), oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) 5' e 3' e DNA molde. Em cada reação de PCR foram feitos controles positivo e negativo. Foram utilizados os produtos de PCR do kit que apresentou os melhores resultados, verificados pela intensidade e clareza das bandas. As reações foram feitas em

termocicladores “Techne Prime”, “Techgene TC-312” e “TC-512” (Techne, Burlington, Reino Unido).

Todos os kits de extração e de amplificação de DNA citados anteriormente foram testados para três amostras secas de herbário: *B. atrum* (amostra SP28857: São Paulo, Santo Amaro, 23°39' S, 46°42' W, A. Löfgren, 29. VII. 1894) e *B. puiggarianum* (amostras SP187337 e SP28853: Piracicaba, Rio Piracicamirim, 22°43', 47°38' W, A. Löfgren, 27. VI. 1894). Para as amostras de herbário foram utilizados também “primers” específicos para amplificar a região de “minibarcodes” do gene *cox1*. Porém, foram obtidos produtos de PCR satisfatórios apenas para a amostra SP187337.

Os oligonucleotídeos (iniciadores sintéticos) utilizados são descritos a seguir:

- **cox1** (SAUNDERS, 2005; SAUNDERS & MCDEVIT, 2012): GazF1 (5'-TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GG - 3') e GazR1 (5'-ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAY CA - 3'); M13LF2 (5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA AYC AYA ARG ATA THG GNA C - 3'), M13LF3 (5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACH AAY CAY AAR GAT ATH GG - 3'), M13F (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'), M13Ri (3' - CAG GAA ACA GCT ATG ACG GRT GIC CRA ARA AYC ARA A - 5'), M13Rx (3' - CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CTG GRT GIC CRA ARA AYC A - 5') e M13R (3' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 5'), todos para amplificar fragmentos de 664 pb;

- **cox1 “minibarcodes”** (SAUNDERS & MCDEVIT, 2012): COIm174 (5'-GAG CTA ACA CAA CCA GGT AAC - 3') e RhoR (5' - AGG AAA AGC CAT ATC WGG AC - 3') para amplificar fragmentos de 174pb; COIm264 (5' - CAA AYC AYA ARG ATA TYG GTA C - 3') e RhoR, para amplificar fragmentos de 264pb.

- **rbcL** (conforme VIS et al., 1998): F160 (5'-CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC-3') e R897 (5'-CGA GAA TAA GTT GAG TTA CCT GC-3'); F650 (5'-ATT AAC TCT CAA CCA TTT ATG CG-3') e *rbcL* R (5'-ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC-3') para amplificar fragmentos de 1.282 pb.

Os programas de temperatura utilizados para os ciclos de PCR foram os seguintes:

- **cox1** (conforme SAUNDERS, 2005) – 94°C por 1 min (desnaturação inicial); 5 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min e 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 1 min e 30 s (extensão); 35 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min e 30 s (anelamento dos “primers”);

72°C por 1 min (extensão); 72°C por 5 min (extensão final) e 4°C (armazenamento); M13LF2/M13LF3 (SAUNDERS & MCDEVIT, 2012) – 94°C por 2 min (desnaturação inicial); 5 ciclos: 94°C por 30s (desnaturação); 45°C por 30s (anelamento dos “*primers*”); 72°C por 1 min (extensão); 35 ciclos a 94°C por 30s (desnaturação); 72°C por 1 min (extensão); 72°C por 7 min (extensão final) e 4°C (armazenamento);

- **cox1 “minibarcodes”** (conforme SAUNDERS & MCDEVIT, 2012) – 94°C por 4 min (desnaturação inicial); 38 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 45°C por 30 s (anelamento dos “*primers*”); 72°C por 1 min (extensão); 72°C por 7 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

- **rbcL** (conforme VIS et al.,1998) – 95°C por 1min (desnaturação inicial); 35 ciclos: 93°C por 30 s (desnaturação); 50°C por 30 s (anelamento dos “*primers*”); 72°C por 1min (extensão); 72°C por 10min (extensão final); 4°C (armazenamento).

2.4.3. Eletroforese em gel de agarose

Para a quantificação visual por eletroforese, os géis (0,7%) foram preparados com a diluição de 70 mg de agarose em 100 mL da solução-tampão TBE (tris-borato-EDTA): tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os géis foram carregados com o produto amplificado e tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, EDTA 50 M, glicerol 30% e água destilada) na proporção de 4:1.

As eletroforeses foram conduzidas sob 60V, com tempo de 60 minutos para *rbcL* e 45 minutos para *cox1* e *cox1* “minibarcodes”. Utilizou-se marcador de tamanho “1 Kb DNA ladder” (Invitrogen, Gaithersburg, E.U.A.) e “2 Kb DNA ladder” (Promega, Madison, EUA). Os géis foram corados com “GelRed™” (Biotium, Hayward, E.U.A.) e observados sob transiluminador e fotodocumentador “Mini Bis Pro” e software “Gel Capture™” (Micro Photonics, Allentown, E.U.A.). A qualidade e quantidade do DNA amplificado por PCR foi feita por estimativas visuais com base na intensidade e homogeneidade das bandas e por comparação com o marcador.

2.4.4. Purificação e quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com uso dos kits de purificação: “QIAquick™ PCR” (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e “NucleoSpin™ Geland PCR Clean-up” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), conforme os protocolos dos fabricantes. Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados no fluorômetro “Qubit®” com o uso do kit “Quant-it® ds DNA BR” (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.) e/ou em espectrofotômetro “Libra Biochrom S60 Double Beam” (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), com acessório de medidas microvolumétricas “BioDrop™500” (Biochrom, Reino Unido).

2.4.5. Sequenciamento e alinhamento

As reações de sequenciamento foram feitas usando-se o kit “Cycle Sequencing, Big-Dye Terminator” (Applied Biosystems, Foster City, E.U.A.) e os mesmos “primers” de PCR. As reações de sequenciamento foram feitas no Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas e as amostras precipitadas foram enviadas para sequenciamento na empresa “Genomic Engenharia Molecular”. O sequenciamento dos marcadores moleculares, a partir de produto de PCR purificado e quantificado, foi realizado em sequenciador automático “ABI PRISM 3130xl” (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), utilizando o kit “Big Dye Terminator”, versão 3.0 (Applied Biosystems). Os marcadores moleculares utilizados neste estudo (*rbcL*, *cox1* e “*minibarcodes*”) foram sequenciados em ambas as direções 3’ e 5’.

As sequências obtidas foram carregadas diretamente no software “Geneious Pro”, versão 6.1.7 (DRUMMOND et al., 2012). A qualidade das sequências foi verificada através da checagem dos cromatogramas utilizando os recursos do próprio software. Em casos de sequências de baixa qualidade, foram feitas novas reações de sequenciamento para as amostras. Quando a baixa qualidade persistia, o sequenciamento foi feito com novos produtos de PCR. As sequências obtidas nas direções direta e reversa de cada amostra para cada marcador foram alinhadas individualmente para se obter a sequência completa (consenso), usando o programa “Geneious Pro”.

A estimativa da homologia entre as sequências consenso geradas com aquelas já identificadas e armazenadas no “GenBank” foram obtidas com uso da ferramenta “search” (utilizando os critérios de busca do BLAST) do programa “Geneious” aplicando-se o critério arbitrário de 97,5% de identidade. Essa comparação permite o reconhecimento da sequência, a confirmação da sua autenticidade e o reconhecimento de possíveis contaminações. Os alinhamentos globais – sequências completas (consenso) de todas as amostras – foram construídos incluindo as sequências geradas e aquelas da seção disponíveis no “GenBank”. Finalmente as sequências consenso de todas as amostras foram agrupadas em uma única matriz. Na construção das matrizes foram removidas as regiões correspondentes aos “primers” e de alinhamento ambíguo. A partir dessa matriz foram obtidos os níveis de identidade e divergência entre as sequências, com uso das ferramentas disponíveis no próprio programa “Geneious”.

Além disso, utilizou-se uma nova técnica de delimitação de espécies para as sequências da região de “barcode” de *cox1*, o “Automatic Barcode Gap Discovery” (ABGD- <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>), que trabalha com dados baseados em um único marcador (LELIAERT et al., 2014). O objetivo desta técnica é encontrar descontinuidades (“barcode gaps”) na variação das sequências de marcadores de “barcode”, assumindo que a divergência interespecífica excede a variação intraespecífica (PUILLANDRE et al, 2012). É um método que encontra automaticamente a distância (utilizando o modelo de distância Jukes-Cantor) onde o “barcode gap” está localizado na faixa de variação entre as sequências.

2.5. Análises Filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) (SCHNEIDER, 2003) para as sequências de *rbcl*, e de distância (“neighbor-joining”, NJ) para as de *cox1* (completas e de “minibarcodes”). Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados como valores de suporte de “bootstrap” com 10.000 réplicas de buscas heurísticas, gerando árvores de consenso com o critério de >70% de semelhança nos ramos das árvores. A construção das árvores filogenéticas foi feita utilizando o programa jModeltest 2 (DARRIBA et al., 2012) para definição do modelo de evolução do DNA (substituição nucleotídica). As análises de distância (NJ) foram conduzidas utilizando o software “PAUP 4.0b8” (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2003) dentro do programa “Geneious Pro”. Foram aplicados valores de suporte de “bootstrap” com base em 1.000 réplicas de buscas heurísticas.

Como grupo externo foram utilizadas sequências de espécies do gênero *Batrachospermum* de várias seções e outros gêneros de Batrachospermales disponíveis no “GenBank” (Tabela 2). Para a análise das sequências de *cox1* (completas e de “minibarcodes”) também foram geradas matrizes de alinhamento com as sequências produzidas neste estudo. No entanto, não existem sequências para este marcador no “GenBank”. Assim, foram construídas árvores de distância (NJ) com uso do algoritmo Kimura-2 parâmetros (SCHNEIDER, 2003) utilizando *B. gelatinosum* como grupo externo.

Para análise de MV, as matrizes de dados foram exportadas para o formato PHYLIP e analisadas no software RAxML GUI (“graphical user interface”), versão 1.31 (STAMATAKIS, 2006; SILVESTRO & MICHALAK, 2012). A AB foi conduzida com uso do software MrBayes v3.1b4 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), dentro do programa “Geneious Pro”. Para estas análises foram definidos quatro cadeias de Markov e 10.000.000 de gerações, amostradas a cada 100 gerações, com probabilidades posteriores (PP) calculadas utilizando as 1.000 árvores finais. As primeiras 500 árvores foram

descartadas, conforme valor mínimo (“burn-in”) estimado com o programa Tracer v. 1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2007).

Com base nos dados de *rbcl*, as análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Bayesiana (AB) foram rodadas com o uso do modelo de distância GTR (“General Time Reversible”) com os seguintes parâmetros: distribuição gama = 1.2550; proporção de sítios invariáveis (I) = 0.5380; frequência de bases A = 0.3249, C = 0.1270, G = 0.2091, T = 0.3391; e matriz da taxa de substituição A-C = 3.7729, A-G = 5.6754, A-T = 2.7122, C-G = 2.5854, C-T = 21.7909, G-T = 1.0000.

Tabela 2: Sequências das espécies de *Batrachospermales* de *rbcl* obtidas no “GenBank” utilizadas nas análises (figuras 4 e 5).

Espécie	Acesso "GenBank"	Localidade	Referência
<i>B. anatinum</i>	HQ677185	China, Hedao Spring, Shuozhou, Shanxi	Li et al. (2010)
<i>B. antipodites</i>	AY423420	Austrália, Queensland, Parque Nacional de Lamington	Vis et al. (2006)
<i>B. antipodites</i>	AY423421	Austrália, Queensland, Parque Nacional de Lamington	Vis et al. (2006)
<i>B. antipodites</i>	DQ523252	Austrália: localidade não informada	Kapraun et al. (2007)
<i>B. antipodites</i>	FJ386456	Austrália, New South Wales, Byrangery Creek	Entwisle et al. (2009)
<i>B. arcuatum</i>	AY297054	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. arcuatum</i>	DQ393131	Bulgária, Shumem, Ovcharovo village fountain	Stewart & Vis (2007)
<i>B. arcuatum</i>	JN086521	China, Shanxi, Wulong Spring	Ji et al. (2011)
<i>B. atrum</i>	AF029139	Reino Unido, Blue Pool, Oeste de Bradfield	Vis et al. (1998)
<i>B. atrum</i>	AY297055	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. atrum</i>	AF209979	Austrália, Western Australia (WA), Dandalup do Norte	Vis & Entwisle (2000)
<i>B. gelatinosum</i>	DQ787560	Não informada	Yang & Boo (2006)
<i>B. gelatinosum</i>	EF375888	Reino Unido, Middleton, Teesdale	Stewart & Vis (2007)
<i>B. gelatinosum</i>	GU810834	E.U.A., Ohio, Sunfish Creek near Tennyson	House et al. (2010)
<i>B. heterocorticum</i>	DQ393136	E.U.A., Florida, Mormom Creek	Stewart & Vis (2007)
<i>B. involutum</i>	AF029143	E.U.A., Alabama, Little Shultz Creek	Vis et al. (1998)
<i>B. kraftii</i>	AF209984	Austrália, Victoria, Narbethong	Vis & Entwisle (2001)
<i>B. kraftii</i>	AY297057	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. kraftii</i>	FJ386461	Austrália, Tasmânia, Rio Arve no Parque Nacional Geeveston-Hartz Mountain	Entwisle et al. (2009)

Tabela 2: Continuação

Espécie	Acesso "GenBank"	Localidade	Referência
<i>B. pseudogelatinosum</i>	AF209983	Austrália, Victoria, Narbethong	Vis & Entwisle (2001)
<i>B. pseudogelatinosum</i>	AY297048	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. pseudogelatinosum</i>	AY297052	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. pseudogelatinosum</i>	AY297053	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. puiggarianum</i>	FJ386462	Brasil, SP, Rio Preto perto de Maringá	Entwisle et al. (2009)
<i>B. theaquum</i>	AY297050	Austrália: localidade não informada	Entwisle et al. (2004)
<i>B. turfosum</i>	DQ523254	Austrália: localidade não informada	Kapraun et al. (2007)
<i>Kumanoa ambigua</i>	AY423390	Guiana Francesa, Cayenne, Chutes de Fougassié	Vis et al. (2005)
<i>Lemanea</i> sp.	DQ523257	Austrália: localidade não informada	Kapraun et al. (2007)
<i>Paralemanea annulata</i>	DQ449029	E.U.A., Ohio, Cedar Falls	Stewart & Vis (2007)
<i>Sirodotia delicatula</i>	DQ646476	Brasil, SP, São José do Rio Preto, córrego Lagoa	Necchi et al. (2007)
<i>Tuomeya americana</i>	AF029159	E.U.A., Carolina do Norte, Lower Barton Creek	Vis et al. (1998)

3. Resultados

3.1. Variáveis ambientais

As variáveis ambientais foram obtidas para 9 dos 15 pontos de coleta (Tabela 3). As espécies da seção foram coletadas em rios/riachos com as seguintes condições:

B. atrum ESP – água alcalina (pH= 7,9), temperatura relativamente baixa (13°C) e alta concentração iônica (750 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Não foram obtidos dados das outras variáveis (oxigênio dissolvido e velocidade correnteza).

Batrachospermum sp. (PEVV e CJ1) – águas ligeiramente ácidas (pH= $6,7 \pm 0,3$, média \pm desvio padrão), temperaturas relativamente baixas ($14,8 \pm 5,7^\circ\text{C}$), baixa concentração iônica ($6,5 \pm 4,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), moderadas oxigenação (oxigênio dissolvido 6,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, saturação de 61%) e correnteza ($40,5 \pm 2,1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Esta espécie foi encontrada em Floresta Ombrófila Mista (50%) e Campos (50%) (Tabela 3).

B. puiggarianum – águas ligeiramente ácida a neutras (pH= $6,6 \pm 0,68$), temperaturas relativamente baixas ($15,0 \pm 4,8^\circ\text{C}$), baixa concentração iônica ($15,6 \pm 5,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) para a maioria das amostras e alta para a população BPJ3 ($685 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), moderada a elevada oxigenação ($6,9 \pm 1,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, saturação $67,4 \pm 19,4 \%$), e correnteza lenta a rápida (velocidade $57,5 \pm 29,1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Os espécimes foram coletados na mesma frequência em três biomas distintos no Brasil: floresta ombrófila mista (33,3%), cerrado (33,3%) e campos (33,3%) (Tabela 3).

Os resultados de ANOVA ($F=0,07-3,22$, $p<0,11$) e teste de comparação múltipla de Tukey não revelaram diferenças significativas para nenhuma das variáveis ambientais analisadas.

Tabela 3: Condições ambientais e biomas de cada ponto amostrado. Códigos das amostras conforme Tabela 1.

Amostras	pH	Temperatura (°C)	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} ; % saturação)	Velocidade correnteza (cm.s^{-1})*	Bioma**
<i>B. atrum</i> ESP	7,9	13	750	---	---	--
<i>Batrachospermum</i> sp. PEVV	6,5	18,8	3	---	39	CAM
<i>Batrachospermum</i> sp. CJ1	6,9	10,8	10	6,8 – 61,0	42	FOM
<i>B. puiggarrianum</i> PAS2	5,6	12,2	20	6,5 – 60,7	47	CAM
<i>B. puiggarrianum</i> PAS5	6,3	11,7	19	7,3 – 67,1	40	CAM
<i>B. puiggarrianum</i> CAMB	6,2	10,3	19	7,5 – 67,0	49	FOM
<i>B. puiggarrianum</i> BRT	6,8	22,4	14	8,1 – 92,2	31	CER
<i>B. puiggarrianum</i> CJ4	7,4	14	6	8,5 – 81,7	112	FOM
<i>B. puiggarrianum</i> BPJ3	7,2	19,3	685	3,3 – 35,4	66	CER

* Média (n=5)

** CAM= Campos, CER: Cerrado, FOM= Floresta Ombrófila Mista

3.2. Análises moleculares

Neste trabalho foi gerado um total de 27 novas sequências para os três marcadores moleculares utilizados. Para o gene *rbcl*, foram obtidas sequências parciais (1.282 pb) para 14 de todas as amostras estudadas, exceto a amostra "*B. puiggarianum* SP187337", a qual não foi incluída nas análises. A região de "barcode" do gene *cox1* (664pb) foi completamente sequenciada para 12 das 15 amostras analisadas, enquanto que para o "minibarcóde" de *cox1* (242 pb) foi obtida uma sequência nova (amostra SP187337). Não foi possível obter produtos de PCR do gene *cox1* para uma amostra de *B. puiggarianum* (PAS5) e de *B. atrum* (JAP).

3.2.1. Análise das sequências de *rbcl*

Nas análises das sequências de *rbcl* foi gerada uma árvore apresentada de duas maneiras (Figuras 4 e 5). As árvores são idênticas, apenas que numa delas (Figura 5) foi mostrada exclusivamente a seção *Setacea*, permitindo uma melhor visualização da topologia da árvore dentro do grupo. A árvore filogenética de consenso (MV) mostrou que a seção *Setacea* representa um grupo monofilético com alto suporte de bootstrap (BS > 95%) e de probabilidade posterior (PP > 0,95) (Figura 4). O clado da seção *Setacea* posicionou-se como grupo irmão de um clado maior denominado de grupo *Australasica*, formado por espécies da Austrália e Nova Zelândia e cujo "status" taxonômico ainda não está definido. No entanto, uma espécie do grupo *Australasica* (*B. antipodites*) ficou fora do grupo, indicando que se trata de um grupo parafilético (Figura 4). O grupo irmão da seção *Setacea* é representado por parte de *Australasica*.

A análise mostrou três clados com alto suporte dentro da seção *Setacea* (Figura 5), evidenciando distinta separação entre as espécies *B. puiggarianum* e *B. atrum* (Austrália, Espanha e Japão) com variação interespecífica de 45-76 pb (3,5-5,9%). Além disso, duas amostras do Brasil (PEVV, CJ1), identificadas como *B. atrum*, foram nitidamente diferentes das demais espécies, com divergência interespecífica de 50-72pb (3,7-5,6%) (Tabela 5).

As sequências dos espécimes identificados como *B. puiggarianum* apresentaram uma ampla variação intraespecífica (0-34pb; 0-2,6%) e posicionaram-se dispersos no clado, sem formarem grupos distintos pela ausência de suporte, exceto um grupo com duas sequências (CAMB e PAS5). (Tabela 5; Figura 4). Dessa maneira, dentro do clado de *B. puiggarianum* não houve divergência e suportes (PP e BS) suficientes que permitissem a separação entre as sequências das amostras e reconhecimento como grupos distintos. Notou-se apenas uma tendência de amostras coletadas em áreas muito próximas posicionarem-se juntas na árvore, como as sequências de PAS3, PAS5 e CAMB.

Dentre as sequências de *B. atrum* para este marcador (quatro geradas neste estudo e duas do “GenBank”) houve uma variação intraespecífica de 4-47pb (0,3-3,7%), a qual é muito ampla e sugere a existência de mais de uma espécie. As sequências das amostras de *B. atrum* (PEVV e CJ1) do Brasil apresentaram uma grande divergência em relação às demais sequências desta espécie: 35-47pb (2,7-3,7%). As sequências destas duas amostras do Brasil apresentaram uma variação de 4pb (0,3%) entre si e as amostras do “GenBank”, da Espanha e do Japão divergiram em 6-22pb (0,5-1,7%). A variação entre as amostras da Espanha e do Japão foi de apenas 6 pares de bases (0,5%) (Tabela 5).

A árvore de consenso (MV) indicou que as amostras do Brasil identificadas como *B. atrum* formaram um clado divergente inicial com alto suporte dentro de *Setacea*. Estes resultados sugerem que há duas espécies molecularmente distintas dentro de *B. atrum*. As populações brasileiras serão doravante denominadas *Batrachospermum* sp.

Tabela 5: Porcentagem de divergência (na porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as seqüências de *rbcL* de populações da seção *Setacea*. As seqüências geradas neste estudo estão em negrito (códigos conforme Tabela 1) e as obtidas do “GenBank” estão identificadas pelo código de acesso (Tabela 2).

Seqüências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>B. puiggarrianum</i> FJ386462	-	1	1	2	2	4	8	10	10	24	25	46	48	54	54	51	49
2. <i>B. puiggarrianum</i> RPD	0,1	-	0	1	1	3	9	9	11	24	25	45	47	53	53	50	48
3. <i>B. puiggarrianum</i> RSB	0,1	0,0	-	1	1	3	9	9	11	24	25	45	47	53	53	50	48
4. <i>B. puiggarrianum</i> PAS2	0,2	0,1	0,1	-	2	4	10	10	12	25	26	46	48	54	54	51	49
5. <i>B. puiggarrianum</i> BRT	0,2	0,1	0,1	0,2	-	2	10	10	12	25	26	46	48	54	54	50	48
6. <i>B. puiggarrianum</i> BPJ3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	-	12	12	14	26	26	48	50	56	56	52	50
7. <i>B. puiggarrianum</i> CJ4	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	-	18	16	29	31	53	55	61	61	58	56
8. <i>B. puiggarrianum</i> BOR	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,9	1,4	-	18	29	34	54	56	62	62	59	57
9. <i>B. puiggarrianum</i> PAS3	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	1,1	1,2	1,4	-	25	27	53	55	62	62	60	58
10. <i>B. puiggarrianum</i> CAMB	1,9	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0	2,3	2,2	2,0	-	20	65	68	73	73	72	70
11. <i>B. puiggarrianum</i> PAS5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,4	2,6	2,0	1,6	-	68	71	76	74	71	69
12. <i>B. atrum</i> AY297055	3,6	3,5	3,5	3,6	3,6	3,8	4,2	4,2	4,2	5,1	5,3	-	10	11	13	38	35
13. <i>B. atrum</i> AF209979	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,9	4,3	4,3	4,3	5,3	5,5	0,8	-	20	22	41	37
14. <i>B. atrum</i> JAP	4,2	4,1	4,1	4,2	4,2	4,4	4,8	4,8	4,8	5,7	5,9	0,9	1,6	-	6	47	45
15. <i>B. atrum</i> ESP	4,2	4,1	4,1	4,2	4,2	4,4	4,8	4,8	4,8	5,7	5,8	1,0	1,7	0,5	-	45	45
16. <i>Batrachospermum</i> sp. PEVV	4,0	3,9	3,9	4,0	3,9	4,1	4,5	4,6	4,7	5,6	5,5	3,0	3,2	3,7	3,5	-	4
17. <i>Batrachospermum</i> sp. CJ1	3,8	3,7	3,7	3,8	3,7	3,9	4,4	4,4	4,5	5,5	5,4	2,7	2,9	3,5	3,5	0,3	-

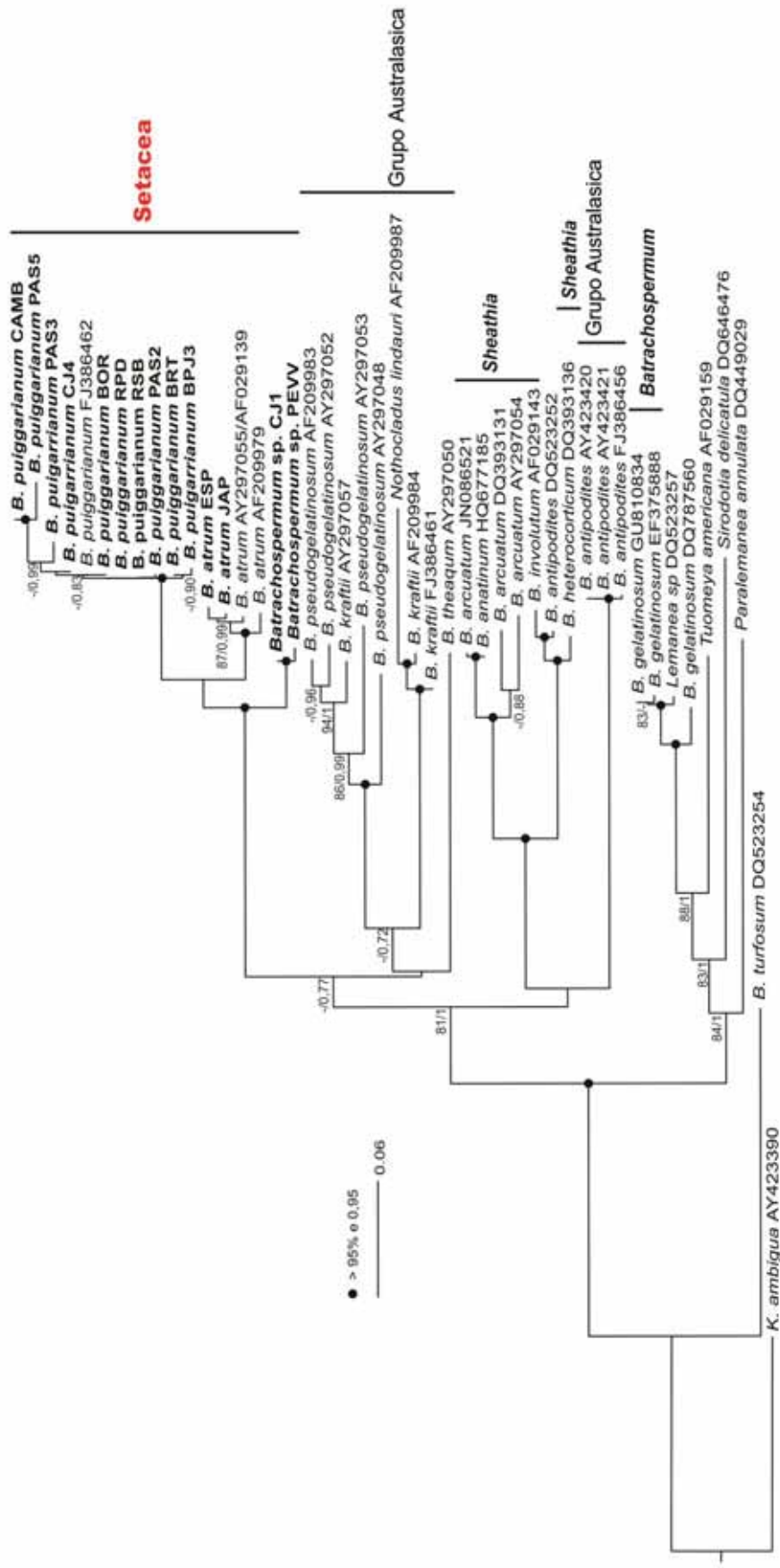


Figura 4: Árvore filogenética (máxima verossimilhança, -1nL = 8479.5522) gerada com base nas sequências do gene *rbcL*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam BS ≤ que 70% BS ou PP ≤ 0,70.

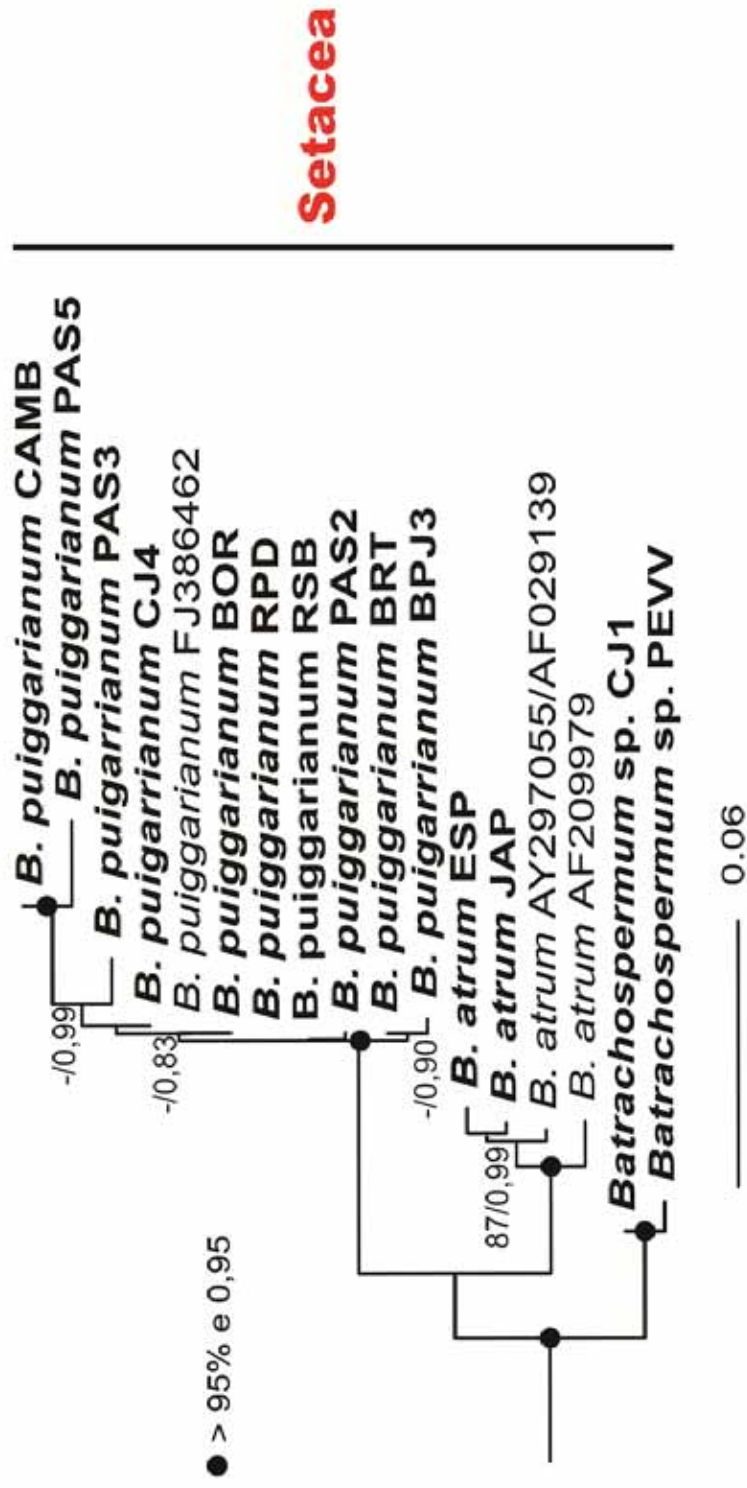


Figura 5: Árvore filogenética (máxima verossimilhança, $-lnL = 8891,5801$) (detalhe da seção Setacea na Figura 4) gerada com base nas sequências do gene *rbdL*, destacando a seção Setacea com dois clados principais contendo as espécies de *B. puiggarrianum* e *B. atrum*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 70$ ou $PP \leq 0,70$.

3.2.2. Análise das sequências de *cox1* e de “minibarcodes”.

A árvore de distância (NJ) evidenciou um grupo com alto suporte (BS > 95%) formado pelas sequências da seção *Setacea* (Figura 6). Os nós que representam as espécies (*Batrachospermum* sp.; *B. puiggarianum*) também apresentaram alto (*B. puiggarianum*) suporte, enquanto que o grupo que inclui *B. atrum* (Brasil e Espanha) apresentou médio suporte. Dentre as 12 sequências geradas para *cox1*, as amostras de *B. puiggarianum* apresentaram grande divergência variaram de 0-17 pb (0-2,5%) (Tabela 6). No grupo com as sequências de *B. puiggarianum* a sequência da amostra PAS2 ocupou uma posição divergente inicial em relação a todas as demais, a qual refletiu a divergência relativamente alta (6-13 pb, 0,9-2,0%, Tabela 6). As demais sequências posicionaram-se relativamente próximas num amplo grupo, no qual distinguiu-se um único clado com alto suporte, formado pelas sequências das amostras BOR, BPJ3, CJ4, PAS3 e RPD. As sequências de BPJ3, PAS3 e RPD foram idênticas entre si (Figura 6; Tabela 6). Não observou-se, portanto, qualquer disjunção nítida entre os valores de divergência entre todas as sequências (0-17pb, 0-2,5%), que permitisse separação entre as amostras e reconhecimento de táxons infra-específicos distintos.

A análise do ramo com as sequências de *B. atrum* mostrou dois grupos: um com médio suporte (BS=87%) representado pela amostra da Espanha e o outro com alto valor (BS>95%), constituído por duas amostras do Brasil (PEVV e CJ1). As amostras de *B. atrum* da Espanha e do Brasil apresentaram divergência de 37-41pb (5,6-6,2%), níveis altos o bastante para justificar sua separação como espécies distintas. Além disso, as amostras do Brasil identificadas como *B. atrum* apresentaram suporte >95% e divergência intraespecífica de apenas 4pb (0,6%), permitindo concluir tratar-se de uma mesma entidade taxonômica (*Batrachospermum* sp.).

Pode-se observar entre as sequências de *B. puiggarianum* e *B. atrum* uma divergência interespecífica de 61-64 pb (9,2-9,6%), e entre *B. puiggarianum* com relação a *Batrachospermum* sp. (PEVV e CJ1) de 46-52 pb (6,8-7,9%) (Tabela 6). Portanto, observou-se nítida disjunção dos limites de divergência inter e intraespecífica (*B. puiggarianum*– 0-17pb; 0-2,5% e *Batrachospermum* sp.– 4pb;0,6%) entre as sequências, que permitiu a

separação dos três grupos de espécies de *Batrachospermum* da seção *Setacea*. Esses dados são congruentes com os de *rbcL*.

Tabela 6: Porcentagem de divergência (na porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências de *cox1* de espécimes da seção *Setacea* (códigos conforme Tabela 1).

Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>B. atrum</i> ESP	-	37	41	64	63	61	62	63	63	64	61	64
2. <i>Batrachospermum</i> sp. PEVW	5,6	-	4	49	49	46	48	49	49	50	45	51
3. <i>Batrachospermum</i> sp. CJ1	6,2	0,6	-	51	51	48	50	51	51	52	45	53
4. <i>B. puiggarianum</i> BOR	9,6	7,4	7,7	-	6	9	5	6	6	13	13	17
5. <i>B. puiggarianum</i> BPJ3	9,5	7,4	7,7	0,9	-	7	1	0	0	9	11	15
6. <i>B. puiggarianum</i> CAMB	9,2	6,9	7,2	1,4	1,1	-	6	7	7	4	6	8
7. <i>B. puiggarianum</i> CJ4	9,3	7,2	7,5	0,8	0,2	0,9	-	1	1	8	10	14
8. <i>B. puiggarianum</i> PAS3	9,5	7,4	7,7	0,9	0	1,1	0,2	-	0	9	11	15
9. <i>B. puiggarianum</i> RPD	9,5	7,4	7,7	0,9	0	1,1	0,2	0	-	9	11	15
10. <i>B. puiggarianum</i> BRT	9,6	7,5	7,8	2,0	1,4	0,6	1,2	1,4	1,4	-	10	10
11. <i>B. puiggarianum</i> PAS2	9,2	6,8	6,8	2,0	1,7	0,9	1,5	1,7	1,7	1,5	-	14
12. <i>B. puiggarianum</i> RSB	9,6	7,6	7,9	2,5	2,2	1,1	2,0	2,2	2,2	1,4	2,0	-

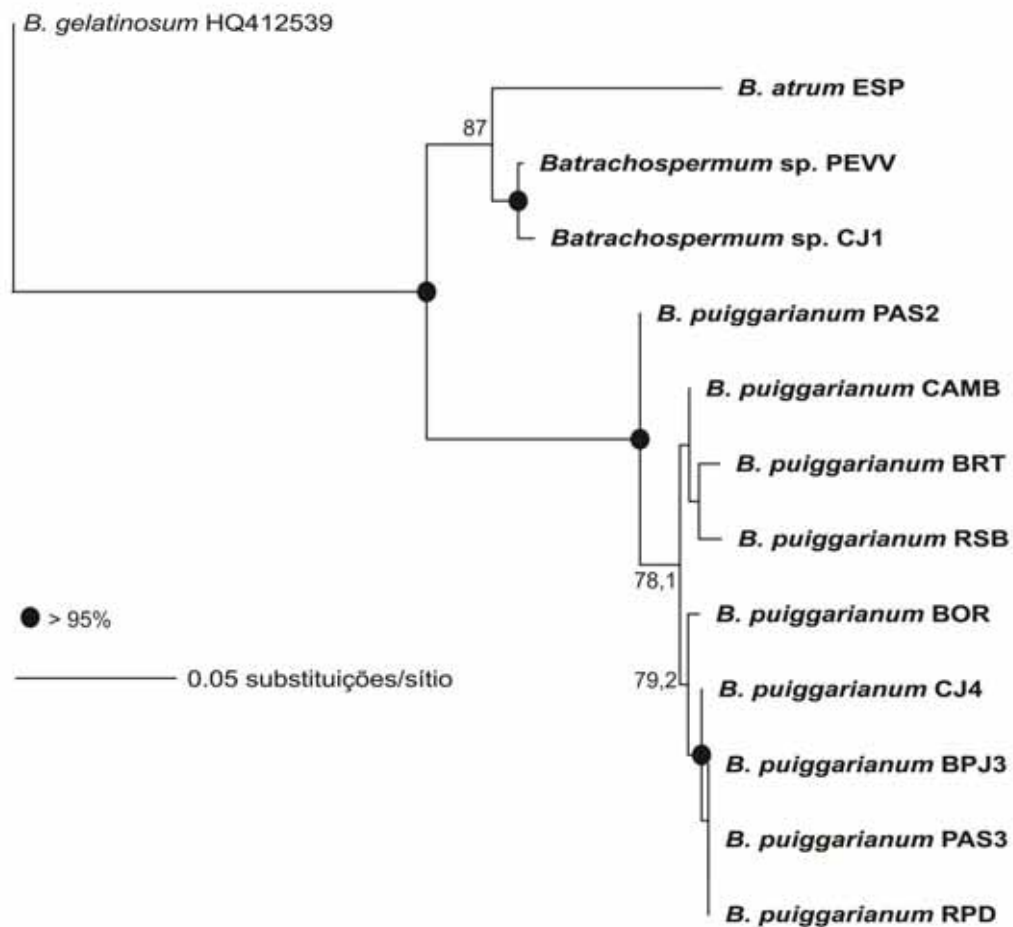


Figura 6: Árvore de distância (“neighborjoining”) gerada com base nas sequências da região de “barcode” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”, nós sem valores de “bootstrap” indicam suporte < 70%.

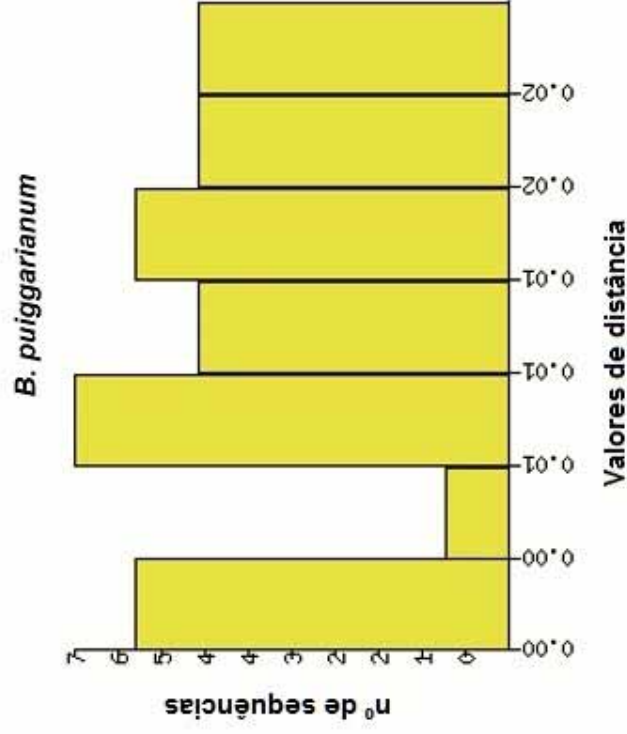
A distinção entre as espécies de *Batrachospermum* da seção *Setacea* ficou ainda mais clara com a detecção do “barcode gap” pela aplicação da técnica ABGD para as sequências de *cox1*. Utilizando a análise para as 12 sequências de *cox1*, indicou que as amostras de *B. puiggarianum*, *B. atrum* e *Batrachospermum* sp. (*B. atrum* do Brasil) correspondem a três espécies distintas dentro da seção *Setacea* (Tabela 7, Figura 7). Além disso, os resultados mostraram que as amostras de *B. puiggarianum* correspondem a uma única entidade taxonômica (Tabela 7, Figura 8).

Tabela 7: Divergências intra e interespecífica (% , linha inferior) para sequências de *cox1* e valores de distância (linha superior – resultados de ABGD) mostrando “barcode gaps” para as espécies de *Batrachospermum* da seção *Setacea*.

	<i>B. puiggarianum</i>	<i>Batrachospermum</i> sp.	<i>B. atrum</i>
<i>Batrachospermum puiggarianum</i> (n=9)	0,000 - 0,023 (0-2,5%)	0,071 - 0,083 (6,8-7,9%)	0,098 - 0,103 (9,2-9,6%)
<i>Batrachospermum</i> sp. (n=2)	0,071 - 0,083 (6,8-7,9%)	0,000 - 0,006 (0,6%)	0,058 - 0,065 (5,6-6,2%)
<i>B. atrum</i> (n=1)	0,098 - 0,103 (9,2-9,6%)	0,058 - 0,065 (5,6-6,2%)	0,000

n= número de sequências.

(a) Histograma de distância



(b) Valores ordenados de distância

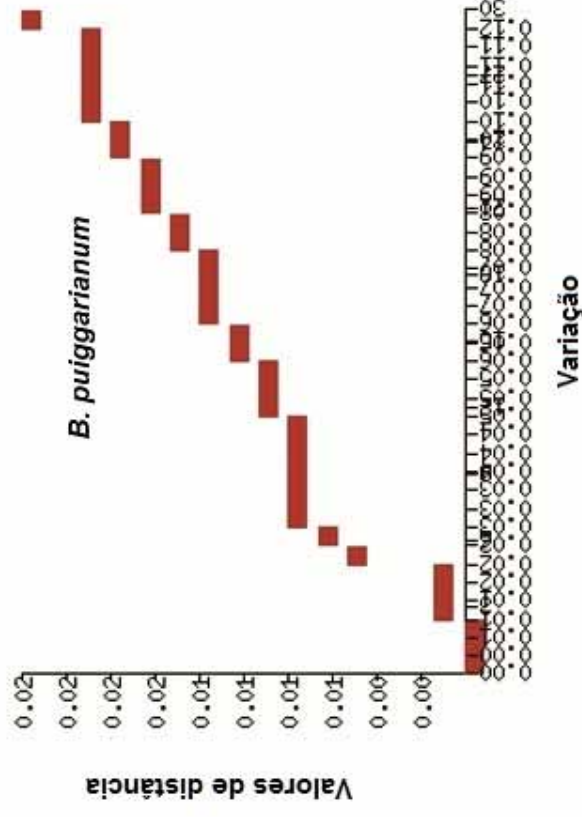


Figura 8. Representação gráfica dos resultados de Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), utilizando o método de distância Jukes-Cantor para *B. puiggarianum*. (a) Distribuição dos diferentes valores de distância entre as amostras de *B. puiggarianum*. (b) Os mesmos dados de distância representados como valores ordenados.

A árvore de distância (NJ) para as sequências de “minibarcodes” de *cox1* mostrou a seção *Setacea* como um grupo monofilético com alto suporte (BS >95%), com a formação de dois grupos com médios suportes: 1) *B. puiggarianum* (BS=74,9%) e 2) *B. atrum* (BS=78%) (Figura 9). O grupo formado pelas amostras de *B. puiggarianum* incluiu a amostra de herbário SP187337, a qual posicionou-se num ramo longo (variação de 10-14 pb e 4,1-5,8%) e relativamente divergente em relação à maioria das sequências da espécie (Tabela 8, Figura 9).

Observou-se entre as sequências de *B. puiggarianum* e *B. atrum* uma divergência interespecífica de 21-28 pb (8,7-11,6%), e entre *B. puiggarianum* com relação a *Batrachospermum* sp. (PEVV e CJ1) de 12-21 pb (5,0-8,7%) (Tabela 8). Portanto, observou-se nítida disjunção dos limites de divergência inter e intraespecífica (*B. puiggarianum*– 0-14 pb (0-5,0%) e *Batrachospermum* sp. do Brasil – 2 pb (0,8%) entre as sequências, que permitiu a separação dos três grupos de espécies de *Batrachospermum* da seção *Setacea*. Esses dados são congruentes com os de *rbcL* e da região de “barcode” completa de *cox1*. Esses dados validam a aplicação de sequências de “minibarcodes” de *cox1* para identificação de espécies da seção *Setacea*.

Tabela 8: Porcentagem de divergência (na porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências de “minibarcode” de cox1 de espécimes da seção *Setacea* (códigos conforme Tabela 1).

Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>B. gelatinosum</i> HQ412539	-	32	28	26	26	23	28	26	29	29	29	29	29	30
2. <i>B. atrum</i> ESP	13,2	-	13	15	21	22	22	23	23	23	23	23	22	28
3. <i>Batrachospermum</i> sp. PEVV	11,6	5,4	-	2	12	12	14	14	15	15	15	15	15	19
4. <i>Batrachospermum</i> sp. CJ1	10,7	6,2	0,8	-	12	12	14	14	15	15	15	15	15	21
5. <i>B. puiggarrarianum</i> CAMB	10,7	8,7	5,0	5,0	-	3	4	4	5	5	5	3	3	11
6. <i>B. puiggarrarianum</i> PAS2	9,5	9,1	5,0	5,0	1,2	-	5	5	6	6	6	6	6	10
7. <i>B. puiggarrarianum</i> CJ4	11,6	9,1	5,0	5,8	1,6	2,1	-	2	1	1	1	5	7	11
8. <i>B. puiggarrarianum</i> BOR	10,7	9,5	5,0	5,8	1,6	2,1	0,8	-	3	3	3	7	7	11
9. <i>B. puiggarrarianum</i> BPJ3	12,0	9,5	6,2	6,2	2,1	2,5	0,4	1,2	-	0	0	6	8	12
10. <i>B. puiggarrarianum</i> PAS3	12,0	9,5	6,2	6,2	2,1	2,5	0,4	1,2	0,0	-	0	6	8	12
11. <i>B. puiggarrarianum</i> RPD	12,0	9,5	6,2	6,2	2,1	2,5	0,4	1,2	0,0	0,0	-	6	8	12
12. <i>B. puiggarrarianum</i> BRT	12,0	9,5	6,2	6,2	1,2	2,5	2,1	2,9	2,5	2,5	2,5	-	6	14
13. <i>B. puiggarrarianum</i> RSB	12,0	9,1	6,2	6,2	1,2	2,5	2,9	2,9	3,3	3,3	3,3	2,5	-	12
14. <i>B. puiggarrarianum</i> SP187337	12,4	11,6	7,9	8,7	4,5	4,1	4,5	4,5	5,0	5,0	5,0	5,8	5,0	-

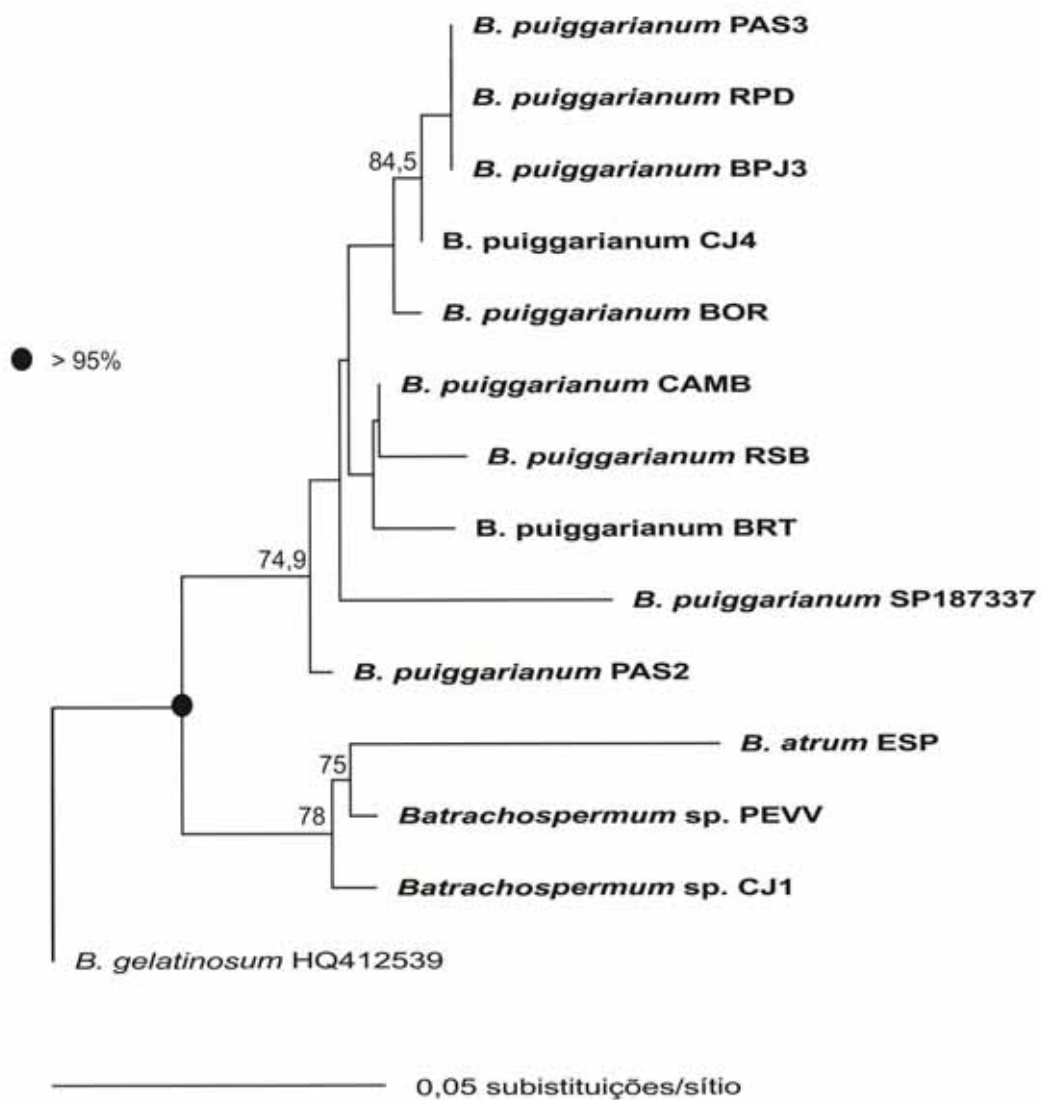


Figura 9: Árvore de distância (“neighborjoining”) gerada com base nas sequências da região de “minibarcodes” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”, nós sem valores de “bootstrap” indicam suporte < 70%.

3.3. Análises Morfológicas

Foram analisadas morfológicamente 15 amostras da seção investigada, consistindo de quatro *B. atrum* (duas do Brasil, uma da Espanha e outra do Japão) e 11 amostras de *B. puiggarianum*. Com relação aos espécimes-tipo da seção, foi analisado o espécime de *B. puiggarianum*, enquanto que para *B. atrum* utilizamos as informações descritas no trabalho de Sheath et al. (1993). Para algumas amostras não foi possível fazer 20 medições e contagens para algumas estruturas (Tabelas 9 e 10): dimensões e número de células dos fascículos primários, dimensões do carpogônio, dimensões dos carposporângios, número de células dos filamentos gonimoblásticos, dimensões dos espermatângios e dimensões das células dos filamentos rizoidais. Além disso, algumas amostras estavam estéreis (RSB, BRT e SP187337) ou ainda mal preservadas e só foi possível fazer observações de alguns caracteres vegetativos (Tabela 9).

Com base nas características diagnósticas aplicadas para diferenciação das espécies da seção *Setacea* foi possível distinguir claramente duas espécies dentro da seção estudada, com base em duas características vegetativas (Tabelas 9-10, Figuras 10-24): verticilos densos, não compactos; fascículos primários separados, não aderidos uns aos outros ou às células dos filamentos rizoidais (*B. atrum*); verticilos compactos; fascículos primários aderidos uns aos outros e às células dos filamentos rizoidais (*B. puiggarianum*).

Seção *Setacea* De Toni, Typis Seminarii. 1897.

Espécie-tipo: *B. atrum* (Hudson) Harvey, Man. Brit. Alg. 120.1841.

Diagnose da seção (MORI, 1975; NECCHI, 1990b; EMTWISLE, 1992; KUMANO, 2002; este estudo): verticilos reduzidos, compactos ou não; fascículos primários separados ou aderidos uns aos outros, curtos, 2–7 células cilíndricas, doliformes ou elípticas; fascículos secundários numerosos, próximos dos verticilos, cobrindo 2/3 ou todo internó; filamentos rizoidais bem desenvolvidos, formados por células cilíndricas alongadas; espermatângios esféricos ou obovoides; carpogônios simétricos, com tricogínios claviformes ou elípticos; ramos carpogoniais curtos, retos ou ligeiramente curvos, 1-5 células,

bem diferenciados dos fascículos primários e originados das células pericentraes; carposporófitos esféricos ou semi-esféricos, assemelhando-se a protuberâncias sobre os verticilos; carposporângios obovoides ou elípticos; com 2-7 células nos filamentos gonimoblásticos.

Chave de identificação para as espécies da seção *Setacea* reconhecidas neste trabalho

1. Verticilos compactos e aderidos ao eixo principal; fascículos primários aderidos uns aos outros.....*B. puiggarianum*.
1. Verticilos não compactos, não aderidos ao eixo principal; fascículos primários separados, não aderidos uns aos outros.....2.
2. Distribuição geográfica ampla (Europa e Ásia); nível de divergência de sequências de *cox1* < 37pb e 5,6%.....*B. atrum*
2. Distribuição geográfica restrita ao Brasil; nível de divergência de sequências de *cox1* ≥ 37pb e 5,6%.....*Batrachospermum* sp.

B. atrum (Hudson) Harvey, Man.Brit. Alg. 120.1841.(Figuras 11, 14, 17, 20 e 23)

Basiônimo: *Conferva atra* Hudson, Fl. angl. 597. 1798.

Sinônimo: *B. gallaei* Sirodot, *Batrachospermes* 256, pl. 22 figs. 1-7. 1884; *Batrachospermum tenuissimum* Bory, *Batrachospermes*. 227. 1823; *B. dillenii* Sirodot, *Batrachospermes*.254. 1884; *B. angolense* W. West & G.S. West, *J. Bot.* 35: 2.1987; *Sirodotia angolensis* (W.West & G.S.West) Skuja, *Bol. Soc. Brot.* 34: 53. 1960.

Tipo: Little well, Gors Bach, entre Llanfaethly e Trefadog, Wales. *Coll. S. Brewer s. n.* antes de 1741. BM Sloane Herbarium HS.229, 59, RH 118 (Lectótipo).

Plantas monoicas e dioicas, com verticilos reduzidos e inconspícuos, não aderidos ao eixo e não compactos, densos, obcônicos ou doliformes e separados, 71–290 µm de diâmetro; internó 200–1600 µm de comprimento;

filamentos rizoidais bem desenvolvidos, formados por células cilíndricas alongadas, com 4–7 µm de largura e 20–50 µm de comprimento; fascículos primários (Figura 17) separados uns dos outros, com 3–8 células; células proximais cilíndricas, com 8,0–20,0 µm de comprimento e 5,0–13,0 µm de diâmetro; células distais cilíndricas, doliformes ou elípticas 7,0–20,0 µm de comprimento e 4,0–13,0 µm de diâmetro; fascículos secundários numerosos, próximos do verticilo ou até 2/3 do internó; filamentos rizoidais bem desenvolvidos, formados por células cilíndricas alongadas, com 4–7 µm de largura e 20–50 µm de comprimento (Tabelas 9 e 10); espermatângios esféricos a obovoides, terminais nos fascículos primários e secundários, com 4,0–9,5 µm de diâmetro; carpogônio com 8–30 µm de comprimento e 4,0–7,0 µm de diâmetro; tricogínios claviformes ou elípticos; ramos carpogoniais com 3–5 células, ligeiramente curvo, filamentos involucrais com 1–2 células (Figura 23); carposporófitos semi-esféricos de 1 a 2 por verticilo, 70–242 µm de diâmetro e 39–175 µm de altura (Figura 14); carposporângios obovoides ou elípticos, 7,0–14,0 µm de comprimento e 5,5–11,0 µm de diâmetro e filamentos gonimoblásticos com 3–7 células (Figura 20) (Tabelas 9 e 10).

Observações: a variação dos caracteres morfométricos dos espécimes examinados situou-se dentro dos valores reportados por outros autores, mas geralmente próximos ou acima dos limites máximos (Tabelas 9 e 10).

Batrachospermum puiggarianum Grunow in Wittrock & Nordstedt, *Algae Exsic.* 11: 1. 1889 (Figuras 10, 13, 16, 19 e 22).

Sinônimo: *B. schwacheanum* Möbius, *Ber. dt. Bot. Ges.* 10: 20. 1892; *B. nigrescens* W. West & G.S. West. *J. Bot.* 35: 2. 1897; *Sirodotia nigrescens* (W. West & G.S. West) Skuja, *Bol. Soc. bot.* 34: 54. 1960; *B. atrum* (Hudson) Harvey var. *puiggarianum* (Grunow) Necchi. *Bolm. Bot. Univ.* 11: 25. 1989. Tipo: Brasil, São Paulo, Apiaí, 24°31'S, 48°50' W. Coll. Y. I. Puiggari, B225281 (Isótipo).

Plantas dioicas ou monoicas, com verticilos reduzidos e conspícuos, compactos, aderidos ao eixo, densos, obcônicos ou doliformes e separados, 91–344µm de diâmetro (Figura 13); internó 200–1087 µm de comprimento; fascículos primários aderidos uns aos outros, com 2–6 células; células proximais cilíndricas, 7,0–19,0 µm de comprimento e 6,0-14,0 µm de diâmetro; células distais cilíndricas, elípticas ou doliformes com 4,0–18,0 µm de comprimento e 4,0–12,0 µm de diâmetro (Figura 16); fascículos secundários numerosos sobre todo ou 2/3 do internó; filamentos rizoidais bem desenvolvidos, formados por células cilíndricas alongadas, com 3–13 µm de largura e 16–49 µm de comprimento; espermatângios esféricos a obovoides, terminais nos fascículos primários e secundários com 4–7µm de diâmetro (Figura 16); carpogônios com 8–32 µm de comprimento e 5–9 µm de diâmetro; tricogínios claviformes ou elípticos; ramos carpogoniais retos ou ligeiramente curvos, com 1-4 células; filamentos involucrais com 1-3 células (Figura 22); carposporófitos esféricos ou semi-esféricos 1-2(-3) com 61–304 µm de diâmetro e 44–278 µm de altura; carposporângios obovoides ou elípticos, 7,0–13,0 µm de comprimento e 5,0–11,0 µm de diâmetro, filamentos gonimoblásticos com 3–5 células (Figura 19) (Tabelas 9 e 10).

Observações: O espécime-tipo de *B. puiggarianum* (isótipo) analisado apresentou verticilos reduzidos e conspícuos, compactos, densos, obcônicos ou cônicos e separados, com 47–327 µm de diâmetro; interno 90–327 µm de comprimento (Tabela 9). Os outros caracteres não foram visualizados e medidos pelo mal estado de conservação da amostra, mas foi possível distinguir o espécime por meio dos caracteres vegetativos diagnósticos para a espécie.

As características descritas para as populações brasileiras examinadas concordaram com as obtidas do espécime tipo (Tabelas 9 e 10) e também com aquelas reportadas por outros autores (ENTWISLE, 1992; NECCHI, 1990b; KUMANO, 2002). No entanto, algumas características morfométricas (internó, fascículos primários e carposporófitos) excederam os limites máximos anteriormente reportados na literatura.

Batrachospermum sp. (Figuras 12, 15, 18, 21 e 24)

Plantas monoicas e dioicas, com verticilos reduzidos e inconspícuos, não compactos, não aderidos ao eixo, densos, obcônicos ou doliformes e separados, 172–423 μm de diâmetro; internó439–1377 μm de comprimento (Figura 15); fascículos primários (Figura 18) não aderidos uns aos outros, com 4–8 células; células proximais cilíndricas, 11,0–16,0 μm de comprimento e 6,0–12,0 μm de diâmetro; células distais doliformes a elípticas 7,0–12,0 μm de comprimento e 5,0–9,0 μm de diâmetro; fascículos secundários numerosos, sobretudo o internó; filamentos rizoidais bem desenvolvidos, formados por células cilíndricas alongadas, com 6–12 μm de largura e 25–55 μm de comprimento; espermatângios (Figura 18) esféricos, terminais nos fascículos primários e secundários com 6,5–9,0 μm de diâmetro; carpogônio com 20–30 μm de comprimento e 6,5–8,0 μm de diâmetro, tricogínio claviforme; ramos carpogoniais com 3–5 células, ligeiramente curvo; filamentos involucreais com 1–2 células (Figura 24); carposporófitos semi-esféricos, 1 a 2 por verticilo, 95–236 μm de diâmetro e 53–184 μm de altura (Figura 15); carposporângios obovoides ou elípticos, 7,0–13,0 μm de comprimento e 7,0–10,0 μm de diâmetro; filamentos gonimoblásticos com 3–6 células (Figura 21) (Tabelas 9 e 10).

Observações: A amostra CJ1 apresentou espermatângios abundantes e dispostos predominantemente sobre fascículos secundários. Estes caracteres diferem da outra população analisada (PEVV), bem como de *B. atrum*, mas não foi considerado por si só como suficiente para distinguir um táxon distinto, o que foi reforçado pela pequena diferença genética entre as populações brasileiras.

Tabela 9: Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Setacea*. Código das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores (em μm exceto quando especificado de outra maneira) representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio padrão (linha inferior). AD: aderidos; CI: cilíndricas; CO: cônicos; CP: compactos; Dis: discoides; Dol: doliformes; EL: elípticos; NA: não aderidos; NC: não aderidos; NC: não aderidos; NC: não aderidos; OBc: obcônicos; OBv: obovooides; OV: ovooides; Pir:piriformes; PO: poucos

Amostras/ Espécies	Separação de		Verticilos		Internós		Fascículos primários			Fascículos 2 ^{ários}
	sexo	Forma	Diâmetro	Arranjo	Internós	Arranjo	Nº células	Proximais	Distais	
<i>B. atrum</i> PEVV	Monoico e dioico	OBc, Dol	172 – 423 (262,4 \pm 33,1)	NC	721 – 1377 (988,2 \pm 198,0)	NA	4 – 6 (4,9 \pm 0,7)	CI 11 – 16 x 7,5 – 12 (13,0 \pm 1,4 x 10,2 \pm 1,6)	Dol, EL 8 – 10 x 6 – 9 (8,9 \pm 0,9 x 8,0 \pm 0,8)	NU – todo internó
<i>B. atrum</i> CJ1	Monoico	OBc, Dol	238 – 352 (294,5 \pm 36,7)	NC	439 – 1339 (987,0 \pm 211,8)	NA	5 – 8 (6,2 \pm 1,0)	CI 11 – 15 x 6 – 11 (12,7 \pm 1,3 x 8,8 \pm 1,1)	Dol, EL 7 – 12 x 5 – 9 (9,1 \pm 1,6 x 6,7 \pm 1,0)	NU – todo internó
<i>B. atrum</i> ESP	Monoico e dioico	OBc	158 – 290 (223,1 \pm 30,4)	NC	337 – 581 (489,6 \pm 52,9)	NA	4 – 8 (5,9 \pm 1,0)	CI 10 – 14 x 6 – 10 (12,4 \pm 1,3 x 7,6 \pm 1,2)	Dol, EL 7,5 – 10,5 x 5 – 7 (8,5 \pm 0,9 x 5,7 \pm 0,6)	NU – 2/3 internó
<i>B. atrum</i> JAP	Monoico	OBc	73 – 118 (98,9 \pm 10,1)	NC	200 – 490 (348,2 \pm 69,0)	NA	3 – 4 (3,4 \pm 0,5) ^b	CI 11 – 12 x 7 – 10 (12,0 \pm 0,5 x 8,8 \pm 1,1) ^b	Dol 8 – 10 x 6 – 8 (9,1 \pm 0,5 x 6,6 \pm 0,9) ^b	PO – próximos ao nó
<i>B. puiggarrianum</i> RPD	Monoico e dioico	OBc	179 – 344 (256,6 \pm 44,2)	CP	437 – 1087 (682,4 \pm 210,7)	AD	3 – 5 (4,3 \pm 0,6)	CI, OBv 12 – 19 x 8 – 13,5 (14,6 \pm 1,9 x 11,4 \pm 1,6)	Dol, EL 7 – 10 x 6 – 9 (8,3 \pm 1,1 x 7,3 \pm 1,0)	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> RSB	–	OBc	147 – 251 (195,0 \pm 23,9)	CP	345 – 917 (595,4 \pm 142,2)	AD	–	–	–	–
<i>B. puiggarrianum</i> PAS2	Monoico e dioico	OBc	120 – 226 (158,3 \pm 27,3)	CP	410 – 905 (673,2 \pm 175,8)	AD	3 – 6 (4,4 \pm 1,0)	CI 11 – 17 x 9 – 13 (13,9 \pm 2,1 x 11,5 \pm 1,5)	CI, Dol 5 – 10 x 4 – 8 (7,7 \pm 1,3 x 6,2 \pm 0,9)	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> PAS3	Dioico	OBc	132 – 343 (244,9 \pm 56,1)	CP	261 – 971 (735,2 \pm 221,7)	AD	3 – 5 (4,9 \pm 0,8)	CI 9 – 18 x 6 – 12 (13,0 \pm 2,6 x 9,6 \pm 1,7)	Dol 6 – 8 x 5 – 8 (7,4 \pm 0,8 x 6,5 \pm 1,0)	PO – próximos ao nó

Tabela 9: Continuação

Amostras/ Espécies	Separação de		Verticilos			Internós	Fascículos primários			Fascículos 2 ^{ários}
	sexo	Forma	Diâmetro	Arranjo	Arranjo		Nº células	Proximais	Distais	
<i>B. puiggarrianum</i> PAS5	Monoico e dioico	OBC	214 – 261 (245,7 ± 29,8)	CP	AD	379 – 996 (677,6 ± 171,1)	4 – 6 (4,6 ± 0,6)	CI 10 – 16 x 7 – 14 (12,8 ± 1,4 x 10,2 ± 1,6)	Dol 5 – 12 x 4 – 9 (7,4 ± 1,8 x 6,0 ± 1,3)	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> CAMB	Dioico	OBC	166 – 273 (230,4 ± 25,2)	CP	AD	470 – 860 (671,3 ± 88,3)	3 – 6 (4,7 ± 0,7)	CI, OBv 12 – 17 x 8 – 13 (13,7 ± 1,4 x 10,9 ± 1,5)	Dol, EL 6-10,5 x 6-8 (8,0 ± 1,4 x 6,6 ± 0,7)	NU – todo internó
<i>B. puiggarrianum</i> BRT	–	OBC	157 – 214 (177,6 ± 15,5)	CP	AD	345 – 917 (460,5 ± 35,0)	–	–	–	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> CJ4	Monoico e dioico	OBC	166 – 232 (193,7 ± 19,0)	CP	AD	276 – 494 (386,6 ± 71,6)	3 – 5 (4,4 ± 0,8)	CI 9 – 15 x 7 – 11 (11,8 ± 1,6 x 9,4 ± 1,0)	Dol 6,5 – 10 x 5,5 – 7 (7,6 ± 1,1 x 6,0 ± 0,7)	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> BPJ3	Dioico	OBC, Dis	144 – 270 (184,6 ± 34,9)	CP	AD	240 – 494 (415,5 ± 80,0)	3 – 5 (4,3 ± 0,8)	CI 9 – 13 x 7 – 11 (10,2 ± 0,9 x 8,5 ± 1,1)	Dol 4 – 9 x 4 – 8 (7,0 ± 1,1 x 6,1 ± 1,2)	PO – próximos ao nó
<i>B. puiggarrianum</i> BOR	–	OBC	91 – 245 (146,1 ± 50,5)	CP	AD	252 – 639 (468,8 ± 149,2)	–	–	–	NU – 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> SP18737	–	OBC	96 – 216 (146,9 ± 39,2)	CP	AD	295 – 694 (497 ± 107,3)	–	–	–	NU

Tabela 9: Continuação

Amostra/ Espécie	Separação de sexo		Verticilos		Internós	Fascículos primários			Fascículos 2 ^{ários}
	Forma	Diâmetro	Arranjo	Arranjo		Nº células	Proximais	Distais	
Tipos nomenclaturais									
<i>B. puiggarranum</i> (isótipo)	-	OBC, CO	47 – 327 (75,1 ± 28,0)	CP	90 – 327 (172,9 ± 88,4) ^a	AD	-	-	-
<i>B. atrum</i> (lectótipo) (Sheath et al., 1993)	-	-	71 – 130 (98)	NC	-	NA	-	-	-
Trabalhos anteriores									
<i>B. atrum</i> (Mori, 1975)	Polioco	-	-	NC	-	NA	-	-	NU
<i>B. atrum</i> (Necchi, 1990b)	Dioico ou polioco	OBC, Pir	-	NC	300 – 1600	NA	(2-) 3 – 7	CI 8 – 20x 5 – 13	NU – todo ou 2/3 internó
<i>B. atrum</i> (Entwisle, 1992)	Monoico ou dioico	Ov, OBc	-	NC	380 – 800	NA	3 – 6	CI (7-12 x 4-8)	CI, EL (4-12 x 4-6) Frequente
<i>B. atrum</i> (Kumano, 2002)	Monoico ou dioico	Ov, CO	-	NC	-	NA	3 – 6	-	Frequente
<i>B. atrum</i> (Eloranta & Kwadrans 2011)	Polioco	Ov, CO	100 – 240	NC	-	NA	3 – 6	-	NU

Tabela 9: Continuação

Amostra/ Espécie	Separação de sexo	Verticilos			Fascículos primários				
		Forma	Diâmetro	Arranjo	Internós	Arranjo	Nº células	Proximais	Distais
<i>B. puiggarrianum</i> (Entwisle, 1992)	Monoico ou dioico	OBc, Pir	–	CP	200 – 1000	AD	2 – 5	Cl, DoI 7 – 18 x 6 – 12	NU – todo internó
<i>B. puiggarrianum</i> (Necchi, 1990)	Monoico ou dioico	OBc, Pir	–	CP	200 – 1000	AD	2 – 5	Cl, DoI 7 – 18 x 6 – 12	NU – todo ou 2/3 internó
<i>B. puiggarrianum</i> (Kumano, 2002)	Monoico ou dioico	OBc, Pir	–	CP	–	AD	2 – 5	Cl, DoI	Frequente

a. N=8; **b.** N=9;

Tabela 10: Caracteres taxonômicos reprodutivos dos espécimes da seção *Setacea*. Código das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores (μm) representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio padrão (linha inferior). Cl: cilíndricas; CLa: claviformes; EL: elípticos; Fu: fusiformes; OBv: obovoides; Ov: ovoides.

Amostras/ Espécies	Carpogônios		Carposporófitos		Carposporângios		Nº. células filamentos gonimobiásticos	Espermatângios (diâmetro)	Células filamentos rizoidais (larg. x compr.)
	Dimensões (comp. x larg.)	Forma	diâam. x alt.)	Forma	Dimensões (alt x larg.)	Forma			
B. atrum PEVV	20–30 x 6,5–8 (24,6 \pm 3,3 x 7,0 \pm 0,7)	CLa	95–202 x 71,5–150 (151,9 \pm 33,0 x 103,6 \pm 23,7)	OBv	9–13 x 7–10 (10,6 \pm 1,0 x 8,6 \pm 0,8)	OBv	3–5 (3,7 \pm 0,7)	6,5–9 (7,7 \pm 0,8)	6–10 x 32–48 (7,6 \pm 1,0 x 40,8 \pm 4,2)
B. atrum CJ1	–	–	148–236 x 53–184 (203,7 \pm 59,2 x 114,1 \pm 34,4) ^h	OBv, EL	7–10 x 7–9 (8,9 \pm 0,9 x 7,7 \pm 0,7)	OBv, EL	4–6 (4,9 \pm 0,7)	7–9 (7,9 \pm 0,5)	8–12 x 25–55 (9,1 \pm 1,2 x 35,2 \pm 7,9)
B. atrum ESP	18,3 x 7,1 ^a	CLa	140–242 x 90–175 (184,6 \pm 25,0 x 130,0 \pm 25,7)	OBv, EL	9–13 x 6–9 (10,6 \pm 0,9 x 7,4 \pm 0,9)	OBv, EL	3–5 (3,8 \pm 0,8)	5–8 (10,0 \pm 0,9) ⁱ	6–7 x 20–50 (6,9 \pm 0,8 x 33,0 \pm 8,7)
B. atrum JAP	17,2 x 4,7 ^a	CLa	85–138 x 39–93 (112,9 \pm 19,1 x 62,9 \pm 13,0)	OBv, EL	10–14 x 7–11 (11,5 \pm 1,2 x 8,4 \pm 1,1) ^h	OBv, EL	3–5 (4,0 \pm 0,7) ^h	6,6–9,5 (8,0 \pm 1,0) ^h	4–7 x 22–41 (5,7 \pm 0,8 x 29,0 \pm 6,6)
B. puiggarrianum RPD	17–30 x 6–7,5 (22,8 \pm 3,3 x 6,8 \pm 0,6)	CLa, OBv	90,5–204 x 72–142 (120,9 \pm 30,3 x 93,3 \pm 21,0)	OBv, EL	10–13 x 7–10 (11,4 \pm 0,8 x 8,5 \pm 1,0)	OBv, EL	3–5 (3,9 \pm 0,8)	5–6 (5,4 \pm 0,6) ^f	6–8 x 16–35 (7,1 \pm 0,8 x 26,9 \pm 5,2)
B. puiggarrianum RSB	–	–	95–183 x 55,5–95,5 (131,3 \pm 26,4 x 72,8 \pm 14,6) ⁱ	OBv	11,4 x 9,4 ^a	OBv	–	–	5–7,5 x 16–30 (6,1 \pm 0,7 x 23,0 \pm 4,7)
B. puiggarrianum PAS2	17–30 x 6–8 (23,1 \pm 3,4 x 6,8 \pm 1,0)	CLa	77–304 x 70–278 (166,0 \pm 63,0 x 140,4 \pm 55,7)	OBv, EL	8–10 x 6–9 (9,0 \pm 0,6 x 7 \pm 0,9)	OBv, EL	3–4 (3,7 \pm 0,5)	5–7 (6,0 \pm 0,7)	6–9 x 25–49 (7,3 \pm 0,7 x 36,8 \pm 6,4)
B. puiggarrianum PASS	19–24 x 6–9 (21,2 \pm 1,4 x 7 \pm 0,6)	CLa	61–205 x 57–143 (135,3 \pm 37,4 x 99,6 \pm 28,3)	OBv	7–10 x 7–8 (8,7 \pm 0,8 x 7,7 \pm 0,5)	OBv	3–5 (3,9 \pm 0,6)	4–7 (5,6 \pm 0,7)	3–8 x 21–36 (6,0 \pm 1,1 x 30,0 \pm 4,2)

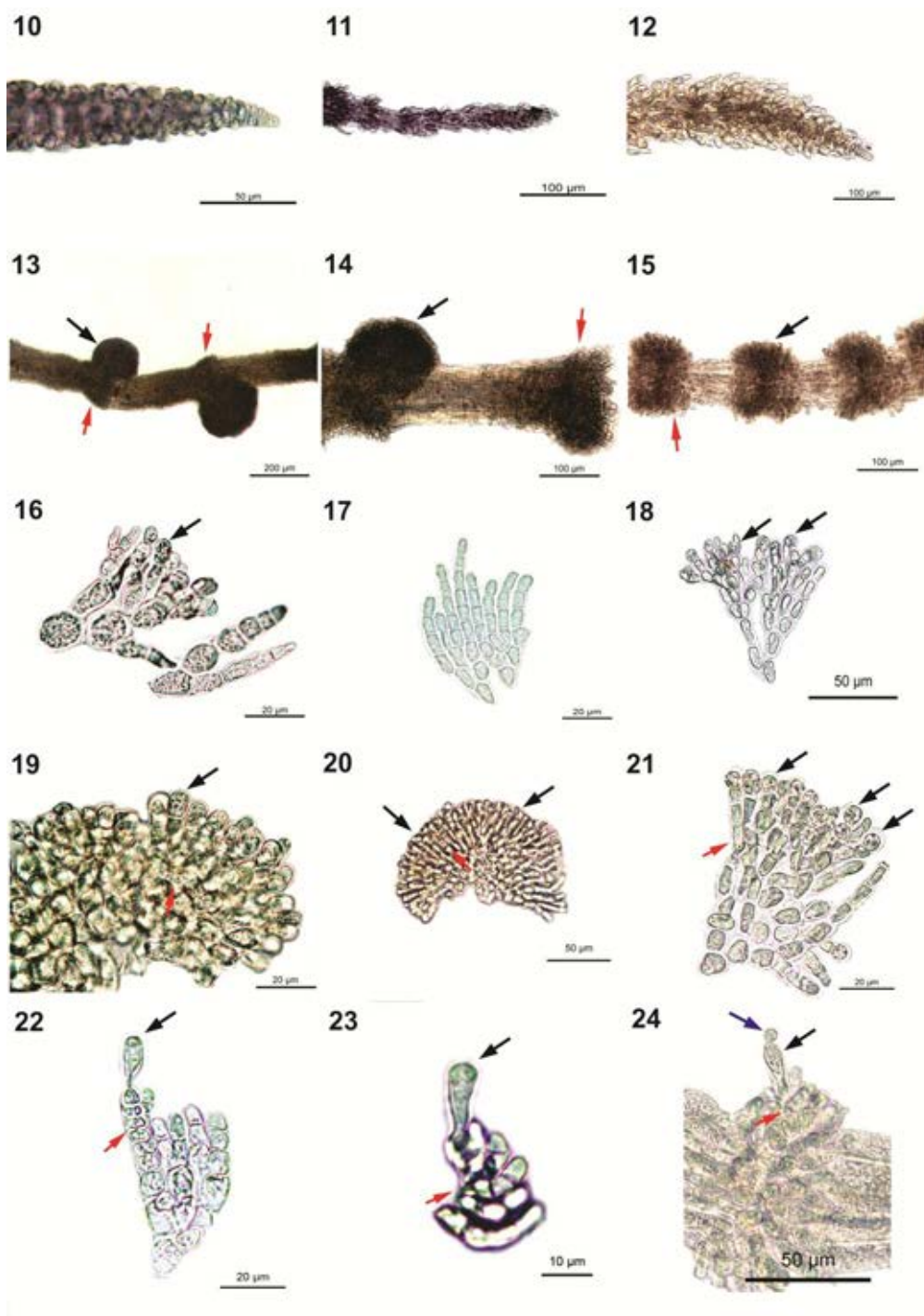
Tabela 10: Continuação

Amostras/ Espécies	Carpogônios		Carposporófitos		Carposporângios		Nº. células filamentos gonimoblasticos	Espermatângios (diâmetro)	Células filamentos rizoidais (larg. x compr.)
	Dimensões (comp. x larg.)	Forma	(diam. x alt.)	Dimensões (alt x larg.)	Forma				
B. puiggarrianum PASS	13-25 x 6-9 (18,8 ± 3,1 x 6,7 ± 1,0)	CLa	114-225 x 79-193 (160,8 ± 27,6 x 128,4 ± 34,5)	8-10 x 7-9 (9,2 ± 0,5 x 7,7 ± 0,7)	OBv	3-5 (4,3 ± 0,6)	5-7 (5,8 ± 0,8)	5-8 x 22-41 (6,5 ± 0,9 x 31,6 ± 5,4)	
B. puiggarrianum CAMB	16-30 x 5-8 (23,5 ± 3,6 x 6,4 ± 0,8)	Cla	176,5-290 x 144-240 (226,5 ± 30,9 x 190,2 ± 31,1)	8-11 x 6-9 (9,4 ± 1,0 x 7,4 ± 1,0)	OBv, EL	3-5 (4,3 ± 0,8)	4-7 (5,4 ± 0,6)	6-10 x 18-33 (8,5 ± 1,4 x 25,1 ± 4,2)	
B. puiggarrianum BRT	-	-	143-263 x 82-216 (188,1 ± 34,1 x 143,6 ± 34,6)	9,5-10 x 6,5-8 (9,8 ± 0,3 x 7,2 ± 1,0) ^b	OBv	4 ^b	-	5-8 x 17-23 (6,7 ± 1,0 x 20,3 ± 2,5) ^e	
B. puiggarrianum C-J4	18,5-28 x 6-9 (23,3 ± 2,6 x 7,0 ± 0,8)	CLa	153-234 x 104-187 (184,4 ± 20,9 x 153,9 ± 21,0)	7-11 x 6-9 (9,4 ± 1,0 x 7,7 ± 0,9)	OBv, EL	3-5 (3,7 ± 0,7)	6-7 (6,4 ± 0,5) ⁱ	6-11 x 17-41 (7,8 ± 1,4 x 25,3 ± 4,7)	
B. puiggarrianum BPJ3	12-23 x 5-8 (18,5 ± 2,8 x 6,9 ± 0,9)	CLa	113-170 x 68-127 (141,5 ± 20,2 x 89,7 ± 20,2) ^j	8-12 x 5-8 (9,4 ± 1,2 x 7,3 ± 1,0) ^k	OBv, EL	3-5 (3,9 ± 0,6) ^k	5-7 (6,0 ± 0,4)	6-11 x 19-34 (8,6 ± 1,4 x 23,4 ± 4,4)	
B. puiggarrianum BOR	17 - 22 x 6 - 7 (19,4 ± 2,0 x 6,4 ± 0,5) ^d	Cla	115 - 154 x 44 - 71 (126,7 ± 16,0 x 57,9 ± 9,8) ^d	8 - 11 x 7 - 8 (9,7 ± 1,2 x 7,5 ± 0,7) ^c	OBv	3	-	-	
B. puiggarrianum SP187337	-	-	87-106 x 51-61 (96,5 ± 13,9 x 55,8 ± 6,7) ^b	-	-	-	-	8-13 x 22-49 (9,8 ± 1,5 x 36,8 ± 7,1)	

Tabela 10: Continuação

Amostras/ Espécies	Carpogônios		Carpoporófitos (diam. x alt.)	Carposporângios		N.º células filamentos gonimobiásticas	Espermatângios (diâmetro)	Células filamentos rizoidais (larg. x compr.)
	Dimensões (comp. x larg.)	Forma		Dimensões (alt. x larg.)	Forma			
Tipos nomenclaturais								
<i>B. puiggarrianum</i> (isótipo)	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>B. atrum</i> (lectótipo) (Sheath <i>et al.</i> , 1993)	25,3–30,2 x 5,6–10,1 (28,3 x 7,9)	–	70–171 x 61–125 (108 x 87)	8,0–12,4 x 5,5–8,2 (9,9 x 6,9)	–	2–7	–	–
Trabalhos anteriores								
<i>B. atrum</i> (Necchi, 1990b)	22–30x 6–7	Cla	100–150x 50–70	10–12x 7–9	OBv, EL	3–5	7–9	–
<i>B. atrum</i> (Entwisle, 1992)	8–16 x 4–7	Ov, Cla, Fu, EL	100–140x 50–70	7–11x 6–7	OBv	3–5	4–6alt. x 4diam.	–
<i>B. atrum</i> (Kumano, 2002)	15–27x 4–7	Ov, EL, Cla	100–140x 50–70	7–11 x 6–7	OBv	3–5	4–6	–
<i>B. atrum</i> (Eloranta & Kwadrans 2011)	15–27 x 4–7	Ov, Cla, EL	80–70 x 50–100	7–12 x 6–8	OBv	–	4–6	–
<i>B. puiggarrianum</i> (Necchi, 1990)	18–32x 5–9	EL, Cla	90–220x 50–130	8–13 x 6–10,5	OBv, EL	3–5	4,5–7	–
<i>B. puiggarrianum</i> (Entwisle, 1992)	8–32 x 5–9	EL, Cla	90–220 x 50–130	8–13 x 6–11	OBv, EL	–	4–7	–
<i>B. puiggarrianum</i> (Kumano, 2002)	8–32x 5–9	EL, Cla	90–220x 50–130	8–13x 6–11	OBv, EL	–	4–7	–

a. N=1; **b.** N=2; **c.** N=4; **d.** N=5; **e.** N=6; **f.** N=7; **g.** N=8; **h.** N=9; **i.** N=10; **j.** N=13; **k.** N=14



Figuras 10-12: Ápices dos ramos das três espécies reconhecidas da seção Setacea. **Figura 10:** *B. puiggarianum* (PAS2); **Figura 11:** *B. atrum* (JAP); **Figura 12:** *Batrachospermum* sp (CJ1).

Figuras 13-15: Verticilos (setas vermelhas) e carposporófitos (setas pretas) das três espécies reconhecidas da seção Setacea. **Figura 13:** *B. puiggarianum* (PAS5); **Figura 14:** *B. atrum* (ESP); **Figura 15:** *Batrachospermum* sp. (CJ1).

Figuras 16-18: Fascículos primários e espermatângios (seta) das três espécies reconhecidas da seção Setacea. **Figura 16:** *B. puiggarianum* (PAS2); **Figura 17:** *B. atrum* (ESP); **Figura 18:** *Batrachospermum* sp. (PEVV).

Figuras 19-21: Carposporângios (setas pretas) e filamentos gonimoblásticos (setas vermelhas) das três espécies reconhecidas da seção Setacea. **Figura 19:** *B. puiggarianum* (PAS2); **Figura 20:** *B. atrum* (ESP); **Figura 21:** *Batrachospermum* sp. (CJ1).

Figuras 22-24: Carpogônios (setas pretas) com tricogínios maduros, ramos carpogoniais (setas vermelhas) e espermatócio (seta azul) das três espécies reconhecidas da seção Setacea. **Figura 22:** *B. puiggarianum* (PAS3); **Figura 23:** *B. atrum* (ESP); **Figura 24:** *Batrachospermum* sp. (PEVV).

4. Discussão

As espécies da seção *Setacea* apresentam ampla distribuição geográfica, pois seus representantes (*B. atrum* e *B. puiggarianum*) têm sido reportados na América do Sul (Brasil, Argentina e Uruguai) (NECCHI, 1990b; ENTWISLE, 1992; KUMANO, 2002), América do Norte (E.U.A.) (SHEATH et al, 1993), Europa (Inglaterra, França, Bélgica, Alemanha e Portugal) (HARVEY, 1841; REIS, 1960; KUMANO, 2002), África, Ásia (China e Japão) (MORI, 1975; KUMANO, 1982; NECCHI, 1990b; ENTWISLE, 1992) e Oceania (Austrália) (ENTWISLE, 1992; ENTWISLE & FORD, 1998; 2007). Ocorrem desde regiões tropicais (NECCHI, 1990b), subtropicais (ENTWISLE & FORD 1998; 2007) até temperadas. Portanto, as espécies do grupo são de ocorrência ampla, sendo distribuídas em diversas regiões do globo.

Existem relativamente poucos dados ambientais publicados em âmbito mundial, sobre a ocorrência de espécies da seção *Setacea*. Os valores das variáveis ambientais encontrados para as populações de *B. puiggarianum*, *B. atrum* e *Batrachospermum* sp. neste trabalho foram, de maneira geral, semelhantes aos descritos para rodófitas continentais em geral (SHEATH, 1984; SHEATH & HAMBROOK, 1990), assim como para populações de *Batrachospermum* da seção *Setacea* nos E.U.A (SHEATH et. al.,1993). O conjunto de dados ambientais para esta seção indica a ocorrência em águas com temperaturas baixas a moderadas (10,8-22,4 °C; $14,7 \pm 4,3$ °C) que reflete a distribuição em regiões de elevadas latitude ou elevação (SHEATH & HAMBROOK, 1990; SHEATH, 2003). A média de ocorrência em pH levemente ácido a neutro (6,0-7,0) típica para as Rhodophyta de águas continentais (SHEATH & HAMBROOK, 1990) foi semelhante, porém mais ampla para as amostras estudadas (pH $6,8 \pm 0,7$). Os valores de condutividade situaram-se dentro da faixa reportada para rodófitas continentais (4,5-15,0 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (SHEATH & HAMBROOK, 1990), o que reflete a baixa concentração iônica, com exceção de duas amostras coletadas em águas duras com valores elevados de condutividade (685-750 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Os valores de concentração de oxigênio dissolvido (3,3–8,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram médios a elevados e situaram-se dentro da ampla faixa reportada para as Rhodophyta de águas continentais (0,2-21,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A velocidade de correnteza de moderada a rápida (31-112

cm.s⁻¹) indicou ocorrência destas espécies em águas mais agitadas do que o reportado para as espécies da seção *Setacea* que ocorreram em águas de correnteza baixa ou moderada (21-22 cm.s⁻¹) (SHEATH et al. 1993) e para as rodófitas em geral (média 29-57cm.s⁻¹). Por outro lado, os dados concordam com os de outros autores (NECCHI, 1990b; ENTWISLE, 1992; KUMANO, 2002), segundo os quais as espécies da seção *Setacea*, *B. puiggarianum* e *B. atrum* são encontradas em corpos d'água com velocidade de correnteza moderada a rápida.

O conjunto das condições encontradas para as amostras da seção *Setacea*, tanto neste trabalho quanto em estudos anteriores, indicam ocorrência predominante em águas oligotróficas e oligossapróbicas (SHEATH, 1984; SHEATH & HAMBROOK, 1990; ELORANTA & KWANDRANS, 2004) e sugerem seu potencial de utilização como bioindicadores de rios/riachos de boa qualidade.

As características morfológicas descritas para as amostras examinadas situaram-se em sua maioria dentro dos limites reportados nas descrições em trabalhos relevantes de espécies da seção *Setacea* (MORI, 1975; KUMANO, 1982; NECCHI, 1990b; ENTWISLE, 1992; SHEATH et al. 1993; ENTWISLE & FOARD, 1998, 2007; KUMANO, 2002; ELORANTA et al., 2011). As amostras de *B. atrum* do Brasil (*Batrachospermum* sp.) não apresentaram características morfológicas e morfométricas suficientemente distintas daquelas reportadas para a espécie *B. atrum*. Observou-se uma sobreposição relativamente alta com relação às características morfométricas entre as três espécies reconhecidas na seção. Por outro lado, foi possível distinguir dois grupos de espécies (*B. atrum* e *B. puiggarianum*) com base em caracteres vegetativos. A principal característica diagnóstica indicada em estudos anteriores da seção (verticilos reduzidos, NECCHI, 1990b) foi confirmada. Os fascículos primários são aderidos uns aos outros e às células dos filamentos rizoidais, resultando em verticilos compactos em *B. puiggarianum*. Em contraste, os fascículos primários são separados e não aderidos uns aos outros ou às células dos filamentos rizoidais, resultando em verticilos não compactos em *B. atrum* e *Batrachospermum* sp. Este é um dos raros casos dentro do gênero *Batrachospermum* em que caracteres vegetativos permitem separar espécies. Entretanto, não foi detectado qualquer caráter morfológico diagnóstico para

separar *B. atrum* de *Batrachospermum* sp. e a distinção entre as duas foi baseada na distribuição geográfica disjunta (Europa-Ásia x Brasil) e na existência de “barcode gap” entre as sequências de *cox1* (PUILLANDRE et al., 2012; LELIAERT et al., 2014). A nítida separação das duas espécies foi corroborada pelas análises de sequências de *rbcL*.

A seção *Setacea* tem sido reconhecida (MORI, 1975; NECHI, 1990; ENTWISLE, 1992; KUMANO, 2002; este trabalho) com base em características morfológicas principalmente pela presença de verticilos reduzidos. Necchi (1990) e Necchi & Entwisle (1990) propuseram que a seção *Setacea* deveria ser incluída na seção *Virescentia*, baseado no fato de que a principal característica da seção (verticilos reduzidos) também ocorre em representantes de outras seções (*Contorta* – atual gênero *Kumanoa* e *Turfosa*). Sheath et al. (1994b) rejeitaram a unificação das duas seções apenas com base nos dados morfológicos. Deve-se notar que verticilos reduzidos podem ocorrer ainda em outros grupos de Batrachospermales (como o grupo *Australasica*) (VIS & ENTWISLE, 2000; NECCHI & VIS 2012; VIS et al., 2012). Isso nos leva a questionar se esta característica é apropriada para definição desta seção. Além disso, membros de outras seções distinguem-se basicamente pelas características da morfologia reprodutiva. Com base nos resultados das análises moleculares, particularmente das sequências de *rbcL*, podemos afirmar que a seção constitui um grupo bem definido dentro da ordem, o qual pode ser definido pela presença de verticilos reduzidos, associada a caracteres reprodutivos (carpogônio e carposporófito), conforme descrito nos resultados morfológicos. Os dados deste estudo nos permitem, portanto, inferir que a formação de verticilos reduzidos deve ter ocorrido várias vezes na evolução das Batrachospermales e pode ser interpretada como convergência morfológica.

As análises filogenéticas em estudo realizado por Entwisle et al. (2009), baseado em dados moleculares indicaram a seção *Setacea* como um grupo monofilético com alto suporte. Porém, a seção posicionou-se dentro do grupo denominado *Australasica*, formado por *B. pseudogelatinosum*, *B. kraftii*, *B. theaquum*, *Nothocladus lindauri* e *B. antipodites*. Esses dados provavelmente refletiram a pequena representatividade de populações e regiões geográficas. Neste estudo ampliamos a amostragem de populações, com a inclusão de 13

amostras do Brasil, assim como da cobertura geográfica, com amostras da Espanha e do Japão. A análise dos dados moleculares para os dois marcadores testados (região de “barcode” de *cox1*, e *rbcL*), permitiu corroborar a hipótese de que a seção *Setacea* constitui um grupo monofilético dentro do gênero *Batrachospermum*. O grupo irmão da seção *Setacea* é representado por uma parte do grupo *Australasica*, que foi demonstrado ser parafilético neste estudo. Portanto, a seção *Setacea* não deve ser considerada dentro do grupo *Australasica* (ENTWISLE et al., 2009), podendo ser reconhecido como um táxon distinto, provavelmente um gênero dentro de Batrachospermaceae. Entretanto, preferimos não propor formalmente a elevação da seção para o nível gênero até que mais dados sejam obtidos para algumas outras seções de *Batrachospermum*, particularmente o grupo *Australasica*. Estudos sobre este grupo estão atualmente em curso por Vis e colaboradores.

Os níveis de divergência das sequências para o gene *rbcL* observados entre as amostras de *B. puiggarianum* (0 a 34pb; 0-2,6%), de *B. atrum* (6-22pb; 0,5-1,7%) e *Batrachospermum* sp. (4pb; 0,3%) situaram-se dentro dos valores de variação intraespecífica observada em outras rodófitas continentais da ordem Batrachospermales (0-4,5%, Tabela 11). Os valores amplos reportados para espécies de Batrachospermales nos trabalhos de Vis et al. (2008, 2010 e 2012) referem-se a sequências de espécimes coletados em amplas regiões geográficas, e muito provavelmente representam complexo de espécies, dentro dos quais poderão ser reconhecidas duas ou mais espécies, algumas delas (p.ex. *B. macrosporum*) crípticas (VIS et al.,2008).

Para a região de “barcode” do gene *cox1* os limites de variação intraespecífica para as amostras de *Batrachospermum* sp. (4pb; 0,6%) e *B. puiggarianum* (0 a 17 pb, 0-2,5%) encontraram-se, respectivamente, dentro e bem superiores aos limites reportados para rodófitas marinhas. A variação intraespecífica para a região de “barcode” do gene *cox1* descrita por Saunders (2005) foi de 0 a 2 pb (0–0,2%) em 16 espécies das ordens Ceramiales, Gigartinales e Rhodymeniales. Da mesma forma, Robba et al. (2006) encontraram variação intraespecífica baixa (0 a 4pb, 0-0,7%) para representantes de seis ordens de algas vermelhas. Por outro lado, os valores amplos reportados nos trabalhos de House et al.(2008) e Sherwood et al. (2010) (Tabela 11) referem-se, a exemplo dos dados para *rbcL*, a espécimes

coletados em amplas regiões geográficas e muito provavelmente também devem representar complexos envolvendo mais de uma espécie, algumas provavelmente crípticas. Por outro lado, a ampla variação aqui reportada para *B. puiggarianum* para os marcadores *cox1* e *rbcL* (0-17 pb e 0-2,5%; 0-34pb e 0-2,6%), respectivamente, foi contínua com a ausência de “barcode gap”. Com base na análise de ABGD (PUILLANDRE et al., 2012; LELIAERT et al., 2014) ficou evidente que *B. puiggarianum* representa uma mesma entidade taxonômica.

Informações sobre espécies crípticas foram relatadas por Robba et al. (2006) em três espécies de algas vermelhas apresentando divergências de 52-53 pb. Dessa forma, a variação de *B. atrum* (4-41 pb e 5,6-6,2%; 4-47pb e 0,5-3,7%) para os marcadores *cox1* e *rbcL* respectivamente, assim como a sua posição nas árvores filogenéticas, permite concluir que as amostras do Brasil (CJ1 e PEVV) representam uma espécie geneticamente distinta, *Batrachospermum* sp., sendo caracterizada como espécie críptica, provavelmente endêmica do Brasil.

Tabela 11: Trabalhos anteriores da variação intraespecífica em espécies de Batrachospermales para os dois marcadores utilizados neste estudo.

Espécies	Marcadores moleculares	Fonte e variação	Referências
<i>B. gelatinosum</i>	<i>rbcl</i>	E.U.A. e Canadá, 15 localidades, 0-1,9%	Vis & Sheath (1997)
<i>B. pseudogelatinosum</i>	<i>rbcl</i>	Austrália, 0-3,9%	Vis & Entwisle (2000)
<i>B. atrum</i>	<i>rbcl</i>	Austrália e Reino Unido, 0,9%	Vis & Entwisle (2000)
<i>B. helminthosum</i>	<i>rbcl</i>	E.U.A., 12 localidades, 0-1,4%	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	<i>rbcl</i>	Japão, 27 localidades, 0,2-3,6%	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. macrosporum</i>	<i>rbcl</i>	Américas do Sul e Norte, 0-6%	Vis et al. (2008)
<i>B. arcuatum</i>	<i>rbcl</i>	América do Norte, Ásia e Europa, 107 espécimes, 0-6,4%	Vis et al. (2010)
<i>K. brevearticulata</i>	<i>rbcl</i>	Várias localidades, 17 espécimes de 12 táxons, 2,7%	Vis et al. (2012)
<i>K. abilli</i>	<i>rbcl</i>	Várias localidades, 17 espécimes de 12 táxons, 4,5%	Vis et al. (2012)
<i>B. helminthosum</i>	<i>rbcl</i>	Brasil, 13 amostras, 0-0,9%	Agostinho et al. (2014)
<i>B. puiggarianum</i>	<i>rbcl</i>	Brasil, 11 amostras, 0-2,6%	Este estudo
<i>B. atrum</i>	<i>rbcl</i>	Espanha, Japão e Austrália, 4 amostras, 0,5-1,7%	Este estudo
<i>Batrachospermum sp</i>	<i>rbcl</i>	Brasil, 2 amostras, 0,3%	Este estudo
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	E.U.A. e Canadá, 16 localidades, 0-0,6%	House et al. (2010)
<i>B. helminthosum</i>	<i>cox1</i>	E.U.A., 15 localidades, 0-6,6%	House et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	<i>cox1</i>	Brasil, Guiana Francesa e E.U.A., 23 amostras, 0-10,1%	Sherwood et al (2010)
<i>B. helminthosum</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 13 amostras, 0-2,3%	Agostinho et al. (2014)
<i>B. puiggarianum</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 9 amostras, 0-2,5%	Este estudo
<i>Batrachospermum sp</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 2 amostras, 0,6%	Este estudo

O número de amostras para os dois marcadores (*rbcl* e *cox1*) não são o mesmo e não existem dados disponíveis no “GenBank” para *cox1* para táxons deste grupo. Ainda assim, foi possível observar e concluir que os dois marcadores em conjunto (*rbcl* e *cox1*) foram basicamente congruentes resultando em árvores com topologias semelhantes. O conjunto dos dados evidenciaram: 1) a seção *Setacea* como grupo monofilético; 2) a divisão da seção em três clados bem definidos (*B. puiggarianum*, *B. atrum* e *Batrachospermum* sp.), com alto suporte e variação interespecífica das sequências de *cox1* de: *B. puiggarianum* e *B. atrum* (61-64 pb; 6,8-9,6%) e *Batrachospermum* sp. e *B. puiggarianum* (46-52pb; 6,8-7,9%); 3) as sequências de *rbcl* das amostras CJ1 e PEVV posicionaram-se externas a *B. atrum*, formando um clado distinto e divergente inicial da seção, tratando-se portanto de uma espécie críptica do grupo no Brasil. Além disso, esses resultados comprovaram que o marcador *cox1* é uma ferramenta aplicável para a identificação de espécies de algas vermelhas (DNA “barcoding”), especialmente quando analisados com uso de técnicas para avaliação de “barcode gap” (como ABGD, PUIILLANDRE et al, 2012).

Esses dados demonstraram que sequências de *cox1* e *rbcl* representaram bons marcadores para, respectivamente, realizar comparações intra e interespecíficas e inferir filogenia nesse grupo de *Batrachospermales*. Dessa forma, os resultados apresentados para os dois marcadores utilizados permitem concluir que as amostras de *Batrachospermum puiggarianum* reportadas para o Brasil apresentaram níveis de divergência altos, mas com uma variação contínua e sem grupos internos bem delimitados, o que permite tratá-las como uma única espécie. Os dados gerados mostraram que *B. atrum* também constitui uma espécie distinta dentro da seção e é amplamente distribuída mundialmente (Europa e Ásia). Além de *B. atrum* e *B. puiggarianum*, uma espécie críptica (*Batrachospermum* sp. CJ1 e PEVV), identificadas morfologicamente como *B. atrum*, foram evidenciadas como espécie distinta pelos dados moleculares, conforme informações apresentadas acima. Assim, o número de espécies da seção, confirmado por dados moleculares, passa a ser de três. Os resultados confirmaram, portanto, a hipótese de que as espécies reconhecidas previamente na seção com base em caracteres morfológicos seriam corroboradas pelos dados moleculares. A hipótese propunha, ainda,

que outras espécies (particularmente espécies crípticas) seriam encontradas e reconhecidas como espécies distintas dentro do grupo e foi também confirmada.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos através das análises morfológicas e moleculares das sequências de *cox1* e *rbcL* de representantes da seção *Setacea* do gênero *Batrachospermum* em âmbito mundial, podemos concluir que:

- 1) A seção *Setacea* corresponde a um grupo monofilético dentro do gênero *Batrachospermum*.
- 2) As duas espécies previamente reconhecidas *B. atrum* e *B. puiggarianum* mostraram-se nitidamente separadas por caracteres morfológicos e evidências moleculares;
- 3) As sequências de *B. puiggarianum* apresentaram divergência molecular relativamente alta para ambos marcadores, porém com variação contínua entre as populações e sem qualquer grupo interno bem definido; portanto, não foi possível distinguir táxons infra-específicos.
- 4) A nítida separação e divergência de *Batrachospermum* sp. do Brasil das demais espécies de *B. atrum* permitem concluir que é uma espécie geneticamente distinta, sendo, portanto uma espécie críptica e provavelmente endêmica do Brasil; entretanto, não foi detectado qualquer caráter morfológico diagnóstico para separar *B. atrum* de *Batrachospermum* sp. e a distinção entre as duas foi baseada na existência de “barcode gap” entre as sequências de *cox1* que foi corroborada pelas análises das sequências de *rbcL* e refletida na distribuição geográfica disjunta (Europa-Ásia x América do Sul - Brasil).

6. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, D. C; NECCHI, O. Jr. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. **Phycologia**, v.53, n. 5, 2014.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **J. Phycol.**, v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. **J. Phycol.**, v. 31, p. 489–98, 1995.

BHATTACHARYA, D.; YOON, H. S.; HACKETT, J. D. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. **BioEssays**, v. 26, n. 1, p. 50-60, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 73, n. 3, p. 203-66, 1998.

COSTION, C.; FORD, A.; CROSS, H.; CRAYN, D.; HARRINGTON, M.; LOWE, A. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26841, 2011.

CRICHLEY, A. T.; OHNO, M. **Seaweed resources of the world**. Japan International Cooperation Agency, Nagai, 1998.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. v.9, p. 772, 2012.

DE TONI, J. B. Sylloge Algarum. 4: Florideae, section 1. *Typis Seminarii Patavii*, 383 pp. 1897.

DRUMMOND A.J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; DURAN, C.; HELED, J.; KEARSE, M.; MARKOWITZ, S.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; SWIDAN, F.; THIERER, T., W.A. **Geneious**. v. 5.6, 2012. Disponível em: <<http://www.geneious.com>>.

EATON, M.; MEYERS, G.; KOLOKOTRONIS, S.-O.; LESLIE, M.; MARTIN, A.; AMATO, G. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1389-1404, 2010.

ELORANTA, P.; KWANDRANS, J. Indicator value of freshwater red algae in running Waters for water quality assessment. **Int. J. Oceanogr. Hydrobiol.** v.23, p. 48-54, 2004.

ELORANTA, P.; KWANDRANS, J. **Freshwater red algae (Rhodophyta):** identification guide and to European taxa, particularly to those in Finland. *Norrinia*. v.15, p. 1-103, 2007.

ELORANTA, P.; KWANDRANS, J.; KUSEL-FETZMANN, E. Rhodophyta and Phaeophyceae. In *Freshwater Flora of Central Europe*, Heidelberg: Spectrum Akademischer Verlag, 2011.p. 57-59.

ENTWISLE, T.J. The setaceous species of *Batrachospermum* (Rhodophyta): A re-evaluation of *B. atrum* (Hudson) Harvey and *B. puiggarianum* Grunow including the description of *B. dyatyches* sp. nov. from Tasmania, Australia. **Muelleria**. v.7, p. 425-445, 1992.

ENTWISLE, T.J.; FOARD, H.J. *Batrachospermum latericium* sp. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) from Tasmania, Australia, with new observations on *B. atrum* and a discussion of their relationships. **Muelleria**. v.11, p. 27-40, 1998.

ENTWISLE, T.J.; FOARD, H.J. Batrachospermales. In: **Algae of Australia:** Batrachospermales, Thoreaales, Oedogoniales and Zygnemaceae. ABRS, Canberra; CSIRO Publ., Melbourne, p.1-25, 2007.

ENTWISLE, T.J.; VIS, M.L.; CHIASSON, W.B.; NECCHI, O. JR.; SHERWOOD, A.R. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. **J. Phycol.** v. 45, p. 704-715, 2009.

ENTWISLE, T. J., VIS, M. L. & MCPHERSON, H. *Batrachospermum pseudogelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta), a polyecious

paraspecies from Australia and New Zealand. **Aust. Syst. Bot.** v.17. p. 17–28. 2004.

FRESHWATER, D.W.; FREDERICQ, S.; BUTLER, B.S.; HOMMERSAND, M.H.; CHASE, M.W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcl*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**v. 91, p. 7281-7285, 1994.

GABRIELSON, P. W.; GARBARY, D. J.; SCAGEL, R. F. The nature of the ancestral red alga: inferences from a cladistic analysis. **Biosystems**, v. 18, p. 335–46, 1985.

GONZALEZ, M. A.; BARALOTO, C.; ENGEL, J.; MORI, S. A.; PETRONELLI, P.; RIERA, B.; ROGER, A.; THEBAUD, C.; CHAVE, J. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. 7483. 2009.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W., GRAHAM, J. **Algae**. Prentice-Hall, New Jersey, 2009.

GURGEL, C. F. D.; LOPEZ-BAUTISTA, J. **Red algae, In: Encyclopedia of Life Sciences**. Wiley, Chichester, UK, 2007.

HANYUDA, T.; SUZAWA, Y.; SUZAWA, T.; ARAI, S.; SATO, H.; UEDA, K. Biogeography and taxonomy of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Japan inferred from *rbcl* gene sequences. **J. Phycol.**, v. 40, p. 581–8, 2004.

HARVEY, W. H. A manual of the British Algae. London, 3^o edition. 1841.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1512, p. 313-21, Feb 7 2003.

HOUSE, D. L.; SHERWOOD, A. R.; VIS, M. L. Comparison of three organelle markers for phylogeographic inference in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North America. **Phycological Research**, v. 56, n. 2, p. 69-75, 2008.

HOUSE, D. L.; VANDENBROEK, A. M.; VIS, M. L. Intraspecific genetic variation of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in eastern North America. **Phycologia**, v. 49, n. 5, p. 501-507, 2010.

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

HUGHEY, J.R. & GABRIELSON, P.W. Comment on “Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment”. **Botany**, v.90, p. 1191–1194, 2012.

JI, L.; FENG, J.; CHEN, L.; XIE, S.L. A molecular and morphological investigation of *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in China. **Aquatic Botany**.v. 95. p. 254–257,2011.

KAPRAUN, D. F.; BRALY, K. S.; FRESHWATER, D. W. Nuclear DNA content variation in the freshwater red algal orders Batrachospermales and Thoreaales (Florideophyceae, Nemaliophycidae). **Phycologia**, v.46, n. 1, p. 54-62, 2007.

KUMANO, S. Four taxa of the sections *Moniliformia*, *Hybrida* and *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Rhodophyta, Nemalionales) from temperate Japan. **Jap.J.Phycol.** v.30, p. 289-296, 1982.

KUMANO, S. Freshwater red algae of the world. **Bristol, Biopress Ltd.** p. 375, 2002.

LAM, D., ENTWISLE, T.J., ELORANTA, P., KWANDRAS, J.; VIS, M.L. Circumscription of species in the genus *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. **Eur. J. Phycol.** 47, p. 42-50, 2012.

LE GALL, L.; SAUNDERS, G. W. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 43, n. 3, p. 1118-30, 2007.

LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; VANORMELINGEN, P.; STEEN, F.; LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; ZUCCARELLO, G. C.; DE CLERCK, O. DNA-based species delimitation in algae. **Eur. J. Phycol.**, v.49, n. 2, p. 179-196, 2014.

LI, Q.; JI, L.; XIE, S.L. Phylogenetic analysis of Batrachospermales (Florideophyceae, Rhodophyta) based on chloroplast *rbcL* sequences. **Shui sheng sheng wu hsueh bao**, v.34, n. 1, p. 20-28, 2010.

LOPEZ-BAUTISTA, J. M. **Red algal genomics: A synopsis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.** Springer; 1st Edition, 2010. 526p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.

MORI, M. Studies on the genus *Batrachospermum* in Japan. **Jap. J. Bot.** v. 20. p. 464-484. 1975.

MULLER, K. M.; OLIVEIRA, M. C.; SHEATH, R. G.; BHATTACHARYA, D. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. **Am. J. Bot.**, v. 88, n. 8, p. 1390-400, 2001.

MCFADDEN, G. I. Plastids and protein targeting. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 339-46, 1999.

NECCHI, O. JR. Rhodophyta de água doce do estado de São Paulo: levantamento taxonômico. **Bolm. Botanica, Univ. S. Paulo.** v.11, p. 11-69, 1989.

NECCHI, O. JR. Evaluation of numeric taxonomic characters in Brazilian species of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermales). **Rev. Bras. Biol.** v. 50, p. 627-641, 1990a.

NECCHI, O. J. Revision of the genus *Batrachospermum* Roth (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil. **Berlin; J. Cramer**, p. 201 p. (Bibliotheca Phycologica, 84), 1990b.

NECCHI, O. JR.; BRANCO, C.C.Z.; BRANCO, L.H.Z. Distribution of Rhodophyta in streams from São Paulo State, southeastern Brazil. **Algol. Stud.** v. 97, p. 43-57, 1999.

NECCHI, O. J.; ENTWISLE, T. J. A reappraisal of generic and subgeneric classification in the Batrachospermaceae (Rhodophyta). **Phycologia**, v. 29, p. 478–88, 1990.

NECCHI, O. JR.; VIS, M.L. **Monograph of the genus *Kumanoa* (Rhodophyta, Batrachospermales)**. Stuttgart, J. Cramer in der GebrüderBorntraeger Verlagsbuchhandlung, 2012.79 p. ISBN 9783443600433 (pbk.)0067-8112.

NECCHI, O. Jr., VIS, M.L.; OLIVEIRA, M.C. Phylogenetic relationships of *Sirodotia* species (Batrachospermales, Rhodophyta) in North and South America. **Crypt. Algal.** v. 28, n. 2, p. 117-127, 2007.

NECCHI, O. Jr., VIS, M.L.; OLIVEIRA, M.C. Phylogenetic relationships in *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta) species in Brazil with the proposal of *Kumanoa amazonensis* sp. nov. **Phycologia**. v.49 (1), p. 97-103, 2010.

NEIGEL, J.; DOMINGO, A.; STAKE, J. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. **Coral Reefs**, p. 26: 487–499, 2007.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. **Phycologia**, v. 35, p. 308-326, 1996.

OLIVEIRA, M. C.; BHATTACHARYA, D. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. **Am. J. Bot.**, v. 87, n. 4, p. 482-92, 2000.

PAZ, A.; CRAWFORD, A. J. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. **J. Biosci**, v. 37, n. 5, p. 887-96, 2012.

PUILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Mol. Ecol.**, v. 21, p. 1864-1877, 2012.

RAGAN, M. A.; BIRD, C. J.; RICE, E. L.; GUTELL, R. R.; MURPHY, C. A.; SINGH, R. K. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta)

based on the nuclear small-subunit rRNA gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 7276–80, 1994.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. "Tracer version 1.4." Computer program and documentation distributed by the author, *website <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> [accessed August 2009]* (2007).

RAYAN, B. F.; JOINER, B. L.; RYAN, T. A. **Minitab Handbook**. 2. ed. Boston: Duxbury Press, 1985.

REIS, M. P. Revisão dos espécimes de *Batrachospermum* Roth e *Sirodotia* Kylin dos herbários dos Institutos Botânicos de Coimbra e Lisboa. **Bol. Soc. Brot.** v. 34, p. 37-58, 1960.

ROBBA, L., RUSSELL, S. J., BARKER, G. L.; BRODIE, J. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). **Am. J. Bot.** v. 93, p. 1101–1108, 2006.

RODRIGUEZ-EZPELETA, N.; BRINKMANN, H.; BUREY, S. C.; ROURE, B.; BURGER, G.; LOFFELHARDT, W.; BOHNERT, H. J.; PHILIPPE, H.; LANG, B. F. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. **Curr. Biol.**, v. 15, n. 14, p. 1325-30, 2005.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-4, 2003.

RUENESS, J. DNA barcoding of select freshwater and marine red algae (Rhodophyta). **Crypt. Algal.**, v. 31 (4): p. 377-386, 2010.

SALOMAKI, E. D.; KWANDRAWS, J.; ELORANTA, P.; VIS, M. L. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. **J. Phycol.** v. 50 (3), p. 526-542, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. **Phil. Trans. Roy. Soc. B** 360, p. 1879–1888, 2005.

SAUNDERS, G. W.; HOMMERSAND, M. H. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. **Am. J. Bot.**, v. 91, n. 10, p. 1494-507, 2004.

SAUNDERS, G. W.; MCDEVITT, D. L. **Methods for DNA barcoding photosynthetic protists emphasizing the macroalgae and diatoms.** *In* **DNA barcodes: methods and protocols**. KRESS, W.J. & ERICKSON, D.L. (Eds.), p. 3-8. Springer Science, New York, 2012.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética:** um guia prático. Ribeirão Preto, Holos Editora. 114 p. 2003.

SHEATH, R. G. **The biology of freshwater red algae.** *In* **Progress in Phycological Research**. Biopress, Bristol, 1984.

SHEATH, R.G., VIS, M.L.; COLE, K.M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 3. Section *Setacea*. **J. Phycol.** v. 29, p. 719-725, 1993.

SHEATH, R.G., VIS, M.L.; COLE, K.M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 4. Section *Virescentia*. **J. Phycol.** v. 30, p. 108-117, 1994a.

SHEATH, R.G., VIS, M.L.; COLE, K.M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 5. Section *Aristata*. **Phycologia**. v. 33, p. 404-414, 1994b.

SHEATH, R.G., VIS, M.L.; COLE, K.M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 6. Section *Turfosa*. **J. Phycol.** v. 30, p. 872-884, 1994c.

SHEATH, R. G. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. *In*: WEHR, J. D. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Red Algae**: Elsevier Science, p.197–224. 2003. ISBN 9780127415505.

SHEATH, R. G.; HAMBROOK, J. A. The biology of the red algae. In: COLE, K. M. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Freshwater ecology**: Cambridge University Press, New York., p.455–476.1990.

SHERWOOD, A.R., VIS, M.L., ENTWISLE, T.J., NECCHI, O. JR; PRESTING, G.G. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. **Phycol. Res.** v. 56, p. 269-279, 2008.

SILVESTRO, D.; MICHALAK, I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. **Org. Divers. Evol.** v. 12, p. 335-337, 2012.

SIRODOT, S. **Les Batrachospermes, Organisation, fonctions, Développement, Classifications.** Librairie de Académie de Médecine, Paris, 1884.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **J. Appl. Phycol.** v.16, p. 245-262, 2004.

SMITH, M. A.; WOOD, D. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, p. 104: 4967–4972, 2007.

SMITH, M. A.; WOODLEY, N. E.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proc.Natl.Acad.Sci. U S A**, v. 103, n. 10, p. 3657-3662, 2006.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v.22, p. 2688-2690, 2006.

STWART, S. A.; VIS, M. L. Investigation of two species complexes in *Batrachospermum* section *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 46, n. 4, p. 380-385, 2007

SWOFFORD, D. L. **PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)**: Sunderland, Sinauer Associates, 2003.

THIERS, B. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. **New York Botanical Garden's Virtual Herbarium**. 2014. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>. Acesso em: 21 agosto. 2014.

VIS, M. L.; CAMERON HODGE, J.; NECCHI, O. J. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. **J. Phycol.**, v. 44, n. 4, p. 882-888, 2008.

VIS, M.L., CHIASSON, W.B.; SHEATH, R.G. Phylogenetic relationships of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. **Phycologia**. v.44, p. 441-446, 2005.

VIS, M.L.; ENTWISLE, T.J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. **J.Phycol.** v. 36, p. 1175-1182, 2000.

Vis, M.L., Entwisle, T.J., West, J.A. & Ott, F.D. *Ptilothamnion richardsii* (Rhodophyta) is a chantransia stage of *Batrachospermum*. **Euro. J. Phycol.**, v.41, p. 125-130, 2006.

VIS, M. L.; FENG, J.; CHIASSON, W. B.; XIE, S.-L.; STANCHEVA, R.; ENTWISLE, T. J.; CHOU, J.-Y.; WANG, W.L. Investigation of the molecular and morphological variability in *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from geographically distant locations. **Phycologia**, v. 49, n. 6, p. 545-553, 2010.

VIS, M. L.; MILLER, E. J.; HALL, M. M. Biogeographical analyses of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America using molecular and morphological data. **Phycologia**, p. 40: 2–9, 2001.

VIS, M.L., NECCHI, O. JR., CHIASSON, W.B.; ENTWISLE, T.J. Molecular phylogeny of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta). **J. Phycol.** v. 48, p. 750-758, 2012.

VIS, M.L., SAUNDERS, G.W., SHEATH, R.G., DUNSE, K.; ENTWISLE, T.J. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences. **J. Phycol.** v. 34, p. 341-350, 1998.

VIS, M. L.; SHEATH, R. G. Biogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America based on molecular and morphological data. **J. Phycol.**, v. 33, p. 520-6, 1997.

YOON, H. S., HACKETT, J. D., CINIGLIA, C., PINTO, G., BHATTACHARYA, D. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. **Mol. Biol. Evo.**, v. 21, p. 809-818, 2004

YOON, H. S.; HACKETT, J. D.; PINTO, G.; BHATTACHARYA, D. The single, ancient origin of chromistplastids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 24, p. 15507-12, 2002.

YOON, H. S.; MÜLLER, K. M.; SHEATH, R. G.; OTT, F. D.; BHATTACHARYA, D. Defining the Major Lineages of Red Algae (Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 42, p. 482-492, 2006.