

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 24/11/2018.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

**Taxonomia e filogenia dos gêneros *Nitella* e *Chara* (Charales, Charophyceae)
baseada em dados moleculares e morfológicos com ênfase nas regiões
Sudeste e Centro-Oeste do Brasil**

FÁBIO RENATO BORGES

setembro - 2017



TAXONOMIA E FILOGENIA DOS GÊNEROS *NITELLA* E *CHARA* (CHARALES, CHAROPHYCEAE) BASEADA EM DADOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS COM ÊNFASE NAS REGIÕES SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL

FABIO RENATO BORGES

Orientador: Prof. Dr. ORLANDO NECCHI JÚNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Rio Claro

Setembro – 2017

589.3 Borges, Fabio Renato
B732t Taxonomia e filogenia dos Gêneros Nitella e Chara
(Charales, Charophyceae) baseada em dados moleculares e
morfológicos com ênfase nas Regiões Sudeste e Centro-oeste
do Brasil / Fabio Renato Borges. - Rio Claro, 2017
85 f. : il., figs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Orlando Necchi Júnior

1. Alga. 2. Espaçadores do transcrito interno do DNA
ribossômico. 3. MatK. 4. Morfologia. 5. Ornamentação da
parede do oósporo. 6. RbcL. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

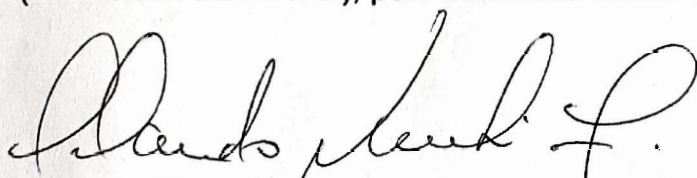
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Taxonomia e filogenia dos gêneros *Nitella* e *Chara* (Charales, Charophyceae) baseada em dados moleculares e morfológicos com ênfase nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil

AUTOR: FÁBIO RENATO BORGES

ORIENTADOR: ORLANDO NECCHI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ORLANDO NECCHI JUNIOR

Departamento de Zoologia e Botânica / UNESP- Câmpus de São José do Rio Preto/ SP



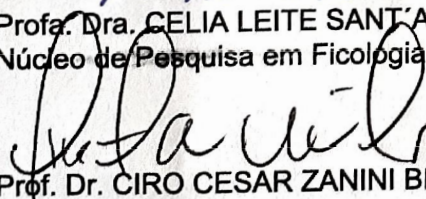
Profa. Dra. VALÉRIA CASSANO

Departamento de Botânica / Universidade de São Paulo



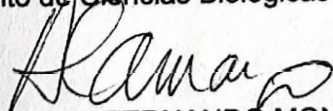
Profa. Dra. CELIA LEITE SANT'ANNA

Núcleo de Pesquisa em Ficologia / INSTITUTO DE BOTANICA



Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO

Departamento de Ciências Biológicas / Unesp- Câmpus de Assis



Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MONTEIRO CAMARGO

Departamento de Ecologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 24 de novembro de 2017

À minha família: minha mãe, base de tudo;

Minha esposa: companheira e amada em todos os momentos;

Meu filho: motivo para seguir em frente.

Agradecimentos

Ao final da caminhada ficam as dores dos passos e o doce sabor de ter alcançado o destino! Foram pouco mais de quatro anos de estudos e dedicação, que incluíram desde as prazerosas coletas de amostras, lembrando os velhos tempos de “moleque de graduação”, à custosa elaboração dos textos finais da tese. Recheando este pacote ainda vieram acontecimentos da vida pessoal, como o nascimento de meu filho, a construção da casa de minha família, e as lutas diárias de um professor de Universidade pública, que mesmo afastado, nunca esteve ausente da luta em defesa de sua instituição. Muitos são aqueles que, de uma forma ou de outra devo agradecer:

Ao Prof. Orlando Nechhi Junior, por ter aceitado meu retorno ao grupo de pesquisa, oferecendo todo o suporte necessário para o desenvolvimento do trabalho. Já se passaram 17 anos da parceria. Muito aprendi, muito discuti (afinal, sou inseguro para muitas coisas, mas muito teimoso quando acho que estou certo!), várias mancadas cometi, mas não deixei de admirar o grande profissional com quem tive oportunidade de trabalhar por tanto tempo!

À Monica, Maria Helena Carabolante e Auro, por ajudarem com meus primeiros passos na Biologia Molecular. Serei eternamente grato e prometo que agora não mando mais mensagens no final de semana para atormentar vocês! E isso serve para Anna Isabel, que não é da Molecular, mas sempre esteve disposta a ajudar (e ajudou muito, mesmo nas coisas mais simples, como uma palavra de incentivo!).

À equipe do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz— Universidade de São Paulo, em especial a Renato B. Salarolie e ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela permissão de uso e colaboração durante o desenvolvimento dos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura.

À Universidade Federal de Mato Grosso pelo afastamento concedido para a execução das atividades de doutorado, bem como permissão para uso de suas dependências e equipamentos.

Ao IBILCE, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde realizei todas as atividades relacionadas à biologia molecular.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Biologia Vegetal, da Universidade Estadual Paulista, com especial agradecimento à equipe da Seção de Pós-graduação e à Profa. Alessandra Ike Coan, que sempre entenderam minhas dificuldades com relação à distância e fizeram o possível para atender às minhas solicitações.

À FAPEMAT, pela liberação de recursos para execução do projeto (processo (151182/2014).

Aos amigos e familiares dos companheiros de cerveja Dariston, Fabiano, Wendel e Alcione. Afinal, nem só de trabalho deve viver ao homem! A manutenção da saúde mental (e um pouco menos da saúde do meu fígado) se deve a vocês!

Aos meus amigos Bruno M. Teixeira, Denilson F. Peralta, Prof. Luis H. Z. Branco e à Profa. Gerdine F. de O. Sanson, que sempre dedicaram boas palavras nos momentos em que tanto precisei. À Gerdine agradeço profundamente também pelas aulas de biologia molecular e do tempo dedicado a ajudar na finalização de meus trabalhos.

À minha mãe, Célia, que apesar das dificuldades, conseguiu fornecer todo o suporte necessário para que eu conseguisse iniciar meus estudos. Hoje, mais do que nunca, entendo o quanto ela abdicou de suas vontades para poder dar a educação que tive. Exemplo de mãe, exemplo de mulher forte.

À minha esposa Adriana, pela parceria e amparo emocional. Não foram fáceis estes quatro anos, sobretudo quando precisei me ausentar, nas viagens de dias e dias para São José do Rio Preto, e ela foi obrigada a tomar as rédeas da casa. A ela meu eterno amor e minha eterna gratidão.

Ao meu filho Bernardo, por dar o mais singelo sorriso nos momentos em que eu duvidava se iria conseguir. Nestes momentos eu entendia o porquê de tanta luta! Só ao nos tornarmos pais (ou mães), entendemos melhor o sentido da vida.

Foram tantas pessoas envolvidas que certamente alguns não foram citados. Desta forma, agradeço a todos que de uma forma ou de outra participaram, seja profissionalmente, seja emocionalmente, da construção desta tese.

MUITO OBRIGADO!

Resumo Geral

A ordem Charales da classe Charophyceae inclui seis gêneros (*Chara* Linnaeus, *Lamprothamnium* J. Grove, *Lychnothamnus* (Ruprecht) Leonhardi, *Nitella* C. Agardh, *Nitellopsis* Hy e *Tolypella* A. Braun) classificados numa única família (Characeae). O sistema de classificação mais amplamente utilizado foi proposto por Wood & Imahori, é baseado em exclusivamente em caracteres morfológicos e considera que as Characeae formam um contínuo de espécies. As 400 espécies do grupo foram reduzidas a 81 com muitas variedades e formas. Muitos autores apontaram inconsistências no sistema de Wood & Imahori e sugeriram estudos com novas ferramentas (especialmente ultraestruturais e moleculares). No Brasil, foram reportados os gêneros *Chara* e *Nitella*, com abordagens essencialmente florísticas. Este trabalho teve por objetivo aplicar marcadores moleculares (sequências dos genes plastidiais que codificam a subunidade grande da enzima ribulose 1-5 bifosfato carboxilase/oxigenase, *rbcL* – o gene que codifica a enzima maturase K, *matK*; e os espaçadores nucleares 1 e 2 dos transcritos internos do DNA ribossômico, ITS1 e ITS2), bem como morfologia estrutural (todos caracteres morfológicos considerados diagnósticos) e ultraestrutural (microscopia eletrônica de varredura da ornamentação da parede dos oósporos), para: 1) caracterizar as espécies de *Chara* e *Nitella* com ênfase nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil; 2) inferir relações filogenéticas entre as espécies brasileiras de *Chara* e *Nitella* com as de outras regiões do globo; e 3) associar dados morfológicos, ultraestruturais da parede dos oósporos e moleculares, visando detectar os caracteres que permitem definir diferentes espécies reconhecidas, bem como propor eventuais caracteres novos. Foram geradas doze novas sequências para os marcadores *rbcL* e *matK*, e oito para ITS2 para seis espécies de *Chara*: *Chara braunii*, *Chara foliolosa*, *Chara guairensis*, *Chara haitensis*, *Chara hydrophytis* e *Chara rusbyana*. Os dados reforçaram a visão de que alguns táxons infra-genéricos (como subgênero *Charopsis* e subsecção *Willdenowia*) não são naturais, enquanto algumas espécies (*C. foliolosa*, *C. haitensis*, *C. hydrophytis* e *C. rusbyana*), anteriormente consideradas como variedades e formas de *C. zeylanica*, mostraram-se distintas nas análises dos três marcadores moleculares. Para *Nitella* geramos quarenta e duas novas sequências de *rbcL*, doze de ITS1 e vinte e três de ITS2 para cinco espécies: *Nitella acuminata*, *Nitella axillaris*, *Nitella elegans*, *N. flagellifera* e *Nitella microcarpa*. Dados sobre a parede oósporo confirmaram estudos prévios e os dados moleculares sugeriram a sinonimização de: *Nitella subglomerata* e *Nitella gollmeriana* com *Nitella acuminata*; e *Nitella axilliformis* com *Nitella axillaris*. A identidade entre as seqüências foi alta para os três marcadores, mesmo entre populações de *Nitella* geograficamente muito distantes, assim como a variação dentro de cada caráter morfológico analisado. Nossa primeira hipótese de que o número de espécies de *Chara* e *Nitella* descritas até o momento para as regiões Sudeste e Centro-Oeste encontra-se equivocado foi parcialmente comprovada, com redução devido à sinonimização de algumas espécies; porém, nenhuma espécie nova foi reconhecida. A segunda hipótese, que previa que algumas espécies de *Chara* e *Nitella* ocorrentes no Brasil apresentariam alta divergência de sequências, devido ao isolamento geográfico em período relativamente remoto, daquelas de outras regiões do mundo foi refutada.

Palavras chave: espaçadores transcritos internos do DNA ribossômico, *matK*, morfologia, ornamentação da parede do oósporo, *rbcL*.

Abstract

The order Charales of the class Charophyceae includes six genera (*Chara* Linnaeus, *Lamprothamnium* J. Grove, *Lychnothamnus* (Ruprecht) Leonhardi, *Nitella* C. Agardh, *Nitellopsis* Hy and *Tolypella* A. Braun) classified in a single family (Characeae). The most widely used classification system, proposed by Wood and Imahori, is based exclusively on morphological characters and considers that within Characeae there is a continuum of species. The 400 species of the group were reduced to 81 with many varieties and forms. Many authors pointed out inconsistencies in this system and suggested studies applying new tools (especially ultrastructural and molecular). In Brazil, only the genera *Chara* and *Nitella* were reported, mostly in floristic studies. The aim of this investigation was to apply molecular markers (sequences of the plastid genes coding for the large subunit of the ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/oxygenase enzyme, *rbcL* - and the maturase K enzyme coding gene, *matK*; internal transcriber spacer of nuclear ribosomal DNA, ITS1 and ITS2), as well as morphological (all diagnostic characters currently used) and ultrastructural (scanning electron microscopy of oospore wall ornamentation), to: 1) characterize the *Chara* and *Nitella* species with emphasis in the Midwest and Southeast regions of Brazil; 2) to infer phylogenetic relationships between the Brazilian species of *Chara* and *Nitella* with those from other regions of the globe; and 3) to associate morphological, ultrastructural oospore wall and molecular data, in order to determine characters that can be applied to define species, as well as to propose possible new characters. Twelve new sequences were generated for the *rbcL* and *matK* markers, and eight for ITS2 for six species of *Chara*: *Chara braunii*, *Chara foliolosa*, *Chara guirensis*, *Chara haitensis*, *Chara hydropitys* and *Chara rusbyana*. The data reinforced the view that some infra-generic taxa (such as *Charopsis* subgenus and *Willdenowia* subsection) are not natural, whereas some species (*C. foliolosa*, *C. haitensis*, *C. hidropitys* and *C. rusbyana*), previously considered as forms of *C. zeylanica*, were found to be distinct in the analyzes of the three molecular markers. For *Nitella* we generated forty-two new *rbcL* sequences, twelve of ITS1 and twenty-three of ITS2 for five species: *Nitella acuminata*, *Nitella axillaris*, *Nitella elegans*, *Nitella flagellifera* and *Nitella microcarpa*. Data on the oospore wall confirmed previous studies and the molecular evidences suggested the following synonyms: *Nitella subglomerata* and *Nitella gollmeriana* with *Nitella acuminata*; and *Nitella axilliformis* with *Nitella axillaris*. Identity values among the sequences were high for the three markers, even among populations of *Nitella* geographically very distant, with wide variation for morphological characters. Our first hypothesis that the number of *Chara* and *Nitella* species described so far for the Southeast and Midwest regions is equivocal was partially confirmed, with a reduction due to the proposal of synonyms for some species; however, no new species was recognized, contradicting the second part of this hypothesis. The second hypothesis, which predicted that some species of *Chara* and *Nitella* occurring in Brazil would present high sequence divergence due to ancient geographic isolation, from those of other regions of the world was refuted.

Key words: internal transcribed spacers, *matK*, morphology, oospore wall ornamentation, *rbcL*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Referências.....	16
CAPÍTULO 1.....	22
Abstrac	23
Introduction	23
Material and methods	24
Morphological methods	24
Ultrastructure of the oospore wall	25
Molecular phylogenetic analysis	26
Results and Discussion	26
Species description	29
General Remarks	37
Acknowledgements	39
References	39
CAPÍTULO 2.....	44
Abstract	45
Introduction.....	45
Material and methods	47
Morphological methods.....	48
Ultrastructure of the oospore wall	48
Molecular phylogenetic analysis.	48
Results and Discussion.....	50
Species description	55

General Remarks.....	70
Acknowledgements.....	74
References	74
CONCLUSÃO GERAL	82
Referências	85

INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Charales da classe Charophyceae inclui seis gêneros: *Chara* Linnaeus, *Lamprothamnium* J. Grove, *Lychnothamnus* (Ruprecht) Leonhardi, *Nitella* C. Agardh, *Nitellopsis* Hy e *Tolypella* (A. Braun) A. Braun; todos são classificados dentro da família Characeae (Wood & Imahori 1965). É um grupo de algas cosmopolita, que habitam principalmente ecossistemas de água doce e, secundariamente, água salobra (Wood & Imahori 1965). Segundo Wood & Imahori (1965) e Sakayama (2008), membros da família Characeae são caracterizados por possuírem talo macroscópico e diferenciado em nós e entrenós que se alternam ao longo de um eixo principal. Estes nós suportam ramos verticilados com crescimento limitado. Os órgãos reprodutivos masculino e feminino (glóbulo e núcula, respectivamente) são formados nos nós dos ramos. As estruturas femininas apresentam um envelope protetor formado por cinco células tubulares espiraladas que se posicionam ao redor da célula ovo. No topo das células tubulares, divisões transversais dão origem a uma ou duas células coronais (coroa). Após a fecundação, a célula ovo produz um zigoto resistente e de parede grossa, denominado oósporo.

Segundo Karol (2004), numerosos sistemas de classificação baseados em dados morfológicos têm sido propostos para as Charales (Halsted 1879; Robinson 1906; Groves & Bullock-Webster 1920; Groves & Bullock-Webster 1924; Wood 1951; Allen 1954). O trabalho de Wood & Imahori (1965) é bastante completo e vem sendo amplamente utilizado como referência para estudos taxonômicos. Na concepção de Wood & Imahori (1965), as Characeae formam um contínuo de espécies, variedades e formas taxonômicas definidas por limites, em geral, pouco e/ou mal definidos, porque supostamente, constituem um grupo de evolução contínua, desde os primórdios do pré-Pleistoceno até hoje. Muitas dessas espécies, variedades e formas taxonômicas foram estabelecidas sem circunscrições bem definidas, com muitas sobreposições entre elas. Ainda segundo Wood & Imahori (1965), melhor seria interpretar esta intergradação de limites como reflexos da miscigenação e infertilidade, de modo que, na prática, mais apropriado seria unir essas 'espécies' em outras, com circunscrição mais ampla, porém, melhor definidas e separadas. Wood & Imahori (1965) denominaram as espécies sem circunscrição muito bem definida de microespécies e as de circunscrição mais ampla de macroespécies.

Desta forma, o sistema proposto por Wood & Imahori (1965) sugeriu que as cerca de 400 espécies de Characeae descritas até então fossem reduzidas à níveis taxonômicos infra-específicos (ou seja, variedades ou formas) ou admitidos como sinônimos, resultando em um sistema com apenas 81 espécies.

Chara e *Nitella* são os dois maiores gêneros dentro das Charales (Wood & Imahori 1965), ambos cosmopolitas, sendo representados em todas as regiões temperadas e tropicais, exceto em algumas ilhas isoladas. *Nitella* ocorre preferencialmente em águas neutras ou moderadamente ácidas, sendo mais raras em condições alcalinas (Pal 1932, Zaneveld 1940, Olsen 1944, Imahori 1954, Corillion 1957, Wood & Imahori 1965), enquanto *Chara* ocorre tanto em águas ácidas quanto em alcalinas, mas a grande maioria dos relatos de ocorrência é em habitats alcalinos (Wood & Imahori 1965). Karol (2004) afirmou em sua monografia, que Wood & Imahori (1965) delimitaram os táxons baseados na “morfologia macro e microscópica” mais do que nas características filogenéticas chave (sinapomorfias). Com isso, reduziram as aproximadamente 180 espécies de *Nitella* conhecidas até o ano de 1959 em níveis infraespecíficos (variedades e formas) ou as agrupou como sinônimos, reduzindo-as a apenas 49 espécies com circunscrição ampla; enquanto que as 116 espécies de *Chara* foram reduzidas a apenas 19 (Wood & Imahori 1965).

Trabalhos taxonômicos clássicos sobre a família Characeae feitos previamente à monografia de Wood & Imahori (1965), foram realizados em diversas partes do mundo, dos quais destacamos: para a Europa as publicações de Migula (1890-1897), Hy (1913, 1914), Groves & Bullock-Webster (1920, 1924), Olsen (1944), Corillion (1957); para a Australásia os trabalhos de Nordstedt (1891), Groves & Allen (1927), Pal (1932), Zaneveld (1940), Imahori (1954); e para a América do Norte, os trabalhos de Allen (1888, 1954), Robinson (1906) e Wood (1948). Entre os estudos executados após 1965, destacam-se para a América do Norte os trabalhos de Wood (1967), Mann (1989), Langangen *et al.* (1996), Mann *et al.* (1999); para a Ásia e Australásia Wood (1972), Blazencic & Temniskova-Topalova (1991), Garcia (1999); e para a Europa os trabalhos de Langangen (1974), Moore (1986), Blazencic *et al.* (1990), Simons & Nat (1996) e Krause (1997).

Com o advento da Sistemática Molecular e o aperfeiçoamento das técnicas de análise filogenética, outros trabalhos têm sido desenvolvidos englobando

espécies de Characeae em estudos mais abrangentes geográfica e taxonomicamente. Neste aspecto, merecem destaque os trabalhos de McCourt *et al.* (1996a, 1996b, 1999), Karol (2004) e os estudos de Sakayama e colaboradores (Sakayama 2008, Sakayama *et al.* 2002, 2004a, 2004b, 2005, 2006); Boegle *et al.* (2010), Schneider *et al.* (2015, 2016). Autores como Mandal *et al.* (2002), Casanova (2005), Sakayama *et al.* (2002, 2004a, 2004b, 2005, 2006, 2009), Kato *et al.* (2008, 2010) têm utilizado ainda técnicas de microscopia eletrônica de varredura para descrever a ultraestrutura, tanto de aspectos externos quanto internos, da parede do oósporo. Em alguns casos, correlacionaram esses dados com evidências moleculares para gerarem árvores filogenéticas mais consistentes. Os resultados desses trabalhos demonstraram que o sistema proposto por Wood & Imahori (1965) apresenta sérios problemas, principalmente no que se refere ao agrupamento de diferentes espécies nos níveis infraespecíficos.

Problemas no sistema de Wood & Imahori (1965) já foram apontados em trabalhos mais antigos e baseados exclusivamente na morfologia. Enquanto Wood & Imahori (1965) alegavam que seu sistema era reflexo das relações evolutivas, Proctor (1980) apontou que tal sistema era baseado na conveniência, e não em inferências filogenéticas. Resultados de numerosos experimentos com espécies do gênero *Chara* (Proctor 1970, 1971, 1972, 1975, 1980; Proctor *et al.* 1971; Proctor & Wiman 1971; McCracken *et al.* 1966) também sugerem que existe uma diversidade de espécies maior do que a proposta por Wood & Imahori (1965).

No Brasil, o início efetivo das pesquisas com Characeae foi marcado pelos trabalhos de Bicudo (1968a, 1968b, 1969, 1972, 1974, 1976 1977, 1979) e Bicudo & Yamaoka (1978). Estudos de grande valor taxonômico tiveram continuidade com os trabalhos de Astorino (1983), Picelli-Vicentim (1990), Picelli-Vicentim & Bicudo (1993), Bueno *et al.* (1996, 2009, 2011a, 2011b e 2016), Bueno & Bicudo, (1997), Vieira *et al.* (2002, 2003), Picelli-Vicentim *et al.* (2004) e Meurer & Bueno (2012). Apesar de relativamente numerosos, todos estes trabalhos utilizaram apenas dados morfológicos clássicos para a identificação das espécies e na maioria deles o sistema de Wood & Imahori (1965) foi utilizado para a determinação das espécies e táxons infra-específicos. Nenhum destes trabalhos adotou dados moleculares ou caracterização da parede do oósporo em microscopia eletrônica de varredura.

O trabalho de Picelli-Vicentim *et al.* (2004), corresponde a uma síntese de vários outros trabalhos de vários pesquisadores e pode ser considerado uma das obras de maior relevância para o estudo dos gêneros *Chara* e *Nitella* no Brasil. Os autores relataram a ocorrência de vários espécimes cujas características divergiam das descritas nos trabalhos de Wood & Imahori (1965). Da mesma forma, vários autores (McCracken *et al.* 1966; Proctor 1970, 1971, 1972, 1975, 1980; Proctor *et al.* 1971; Proctor & Wiman 1971; MacCourt *et al.* 1996a, 1999; Karol 2004; Sakayama *et al.* 2004a, 2004b, 2005, 2006; Sakayama 2008;) sugerem fortemente a existência de um número maior de espécies do que o proposto por Wood & Imahori (1965).

Tomando-se como base os aspectos críticos apontados em investigações anteriores em âmbito mundial, bem como a ausência de dados moleculares e de ultraestrutura da parede do oósporo para espécies de *Chara* e *Nitella* brasileiras, este estudo contempla os seguintes objetivos:

- 1) Caracterizar as espécies de *Chara* e *Nitella* analisadas com relação às características morfológicas tradicionais e ultraestruturais da parede dos oósporos com ênfase nas amostras das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil;
- 2) Inferir as relações filogenéticas entre as espécies de *Chara* e *Nitella* do Brasil e de outras regiões do globo com base nas sequências de DNA de diferentes marcadores.
- 3) Associar os dados morfológicos tradicionais, ultraestruturais da parede dos oósporos e moleculares, de forma a detectar os caracteres que permitem definir as espécies reconhecidas, bem como propor eventuais caracteres novos.

Foram testadas as seguintes hipóteses:

- 1) O número de espécies de *Chara* e *Nitella* descritas para as regiões Sudeste e Centro-Oeste encontra-se equivocado. Por um lado novas características morfológicas e moleculares servirão de subsídio para reconhecimento de um número maior de espécies do que o proposto por Wood & Imahori (1965), o que elevaria o número de espécies. Por outro lado, caracteres que têm sido usados tradicionalmente para delinear espécies (como comprimento dos dactilos e diâmetro do talo, entre outras) serão evidenciados como variáveis dentro e entre populações, o que nos levaria a propor que espécies descritas para o Brasil sejam sinônimos.

2) Algumas espécies de *Chara* e *Nitella* ocorrentes no Brasil apresentarão, devido ao isolamento geográfico em período relativamente remoto, sequências de DNA bastante divergentes daquelas de outras regiões do mundo (especialmente da América do Norte, Europa Ásia e Austrália). Esta hipótese possibilitaria inclusive a proposição de novas espécies, algumas crípticas e outras com variações em caracteres morfológicos não empregados tradicionalmente na identificação em nível específico.

Referências

- ALLEN, T. F. 1888. *Nitella* (not *Tolypella*) Macounii. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 15:11.
- ALLEN, G. O. 1954. An annotated key to the Nitelleae of North America. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 81:35-60.
- ASTORINO, H.A.B. 1983. Charophyceae do Estado do Rio Grande do Sul: uma contribuição ao seu inventário. **Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.**
- BICUDO, R.M.T. 1968a. An annotated list of Charophyceae already cited for Brazil. **Rickia** 3:221-238.
- BICUDO, R.M.T. 1968b. Index to the Brazilian cryptogamic literature, 1: a bibliography of the Brazilian Charophyceae. **Rickia** 3: 239-245.
- BICUDO, R.M.T. 1969. Brazilian Characeae of the Herbarium of the Instituto de Botânica, São Paulo. **Nova Hedwigia** 17: 1-14.
- BICUDO, R.M.T. 1972. O gênero *Chara* (Chlorophyceae) no Brasil. **Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.**
- BICUDO, R.M.T. 1974. O gênero *Chara* (Charophyceae) no Brasil, 1: Subsecção Willdenowia R. D. Wood. **Rickia** 6: 127-189.
- BICUDO, R.M.T. 1976. *Chara linharensis*, uma nova espécie de Characeae do Sudeste do Brasil. **Ciência e Cultura** 28: 1314-1318.
- BICUDO, R.M.T. 1977. O gênero *Chara* (Charophyceae) in Brasil, 2: Secção *Chara*. In Anais do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Sociedade Botânica do Brasil, Rio de Janeiro. p.23-32.
- BICUDO, R.M.T. 1979. O gênero *Chara* (Charophyceae) no Brasil, 3: Secção *Charopsis* (Kütz. emend. Rupr., Leonh.) R. D. Wood. **Rickia** 8:17-26.
- BICUDO, R.M.T. & YAMAOKA, D.M.1978. O Gênero *Nitella* (Charophyceae) no Brasil, 1: subgênero *Nitella*. **Acta Biol. Parana**, v.7, n. 1-4, p. 77-98.
- BLAZENCIC, J., BLAZENCIC, Z., CVIJAN, M. & STEVANOVIC, B. 1990. Systematics and Biogeographic studies of Charophytes in Yugoslavia. **Cryptogamye, Algologie** 11: 249-256.
- BLAZENCIC, J. & TEMNISKOVA-TOPALOVA, D. 1991. Charophyta from Babylon (Republico f Iraq). **Cryptogamie Algologie** 12: 289-300.
- BOEGLE, M.G., SCHNEIDER, S.C., SCHUBERT, H. & MELZER, A. 2010 *Chara baltica* Bruzelius 1824 and *Chara intermedia* A. Braun 1859-Distinct species or habitat specific modifications? **Aquatic Botany** 93(3): 195–201.

BUENO, N.C., BICUDO, C.E.M., PICELLI-VICENTIM, M.M. & ISHII, I.I. 1996. Characeae (Charophyceae) do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil: *Chara*. **Hoehnea** 23:21-31.

BUENO, N.C. & BICUDO, C.E.M. 1997. Characeae (Charophyceae) do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil: *Nitella*. **Hoehnea** 24:29-55.

BUENO, N.C., BICUDO, C.E.M., BILOLO, S. & MEURER, T. 2009 Levantamento florístico das Characeae (Chlorophyta) de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil: *Chara*. **Revista Brasileira de Botânica** 32(4): 759–774.

BUENO, N.C., MEURER, T., BILOLO, S. & BICUDO, C.E.M. 2011a Novos registros de *Nitella* (Chlorophyta, Characeae) para regiões dos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea** 38(3): 385–396.

BUENO, N.C., PRADO, J.F., MEURER, T. & BICUDO, C.E.M. 2011b New Records of *Chara* (Chlorophyta, Characeae) for Subtropical Southern Brazil. **Systematic Botany** 36(3): 523–541.

BUENO, N.C., PRADO, J.F., MEURER, T. & BICUDO, C.E.M. 2016 *Nitella* (Streptophyta, Characeae) from southern Brazil. **Iheringia** 71(2): 132-154.

CASANOVA, M.T. 2005 An overview of *Chara* L. in Australia (Characeae, Charophyta). **Australian Systematic Botany** 18(1): 25–39.

CORILLION, R. 1957. Les Charophycées de France et d'Europe Occidentale. **Bulletin de La Société Scientifique de Bretagne** 32:1-256.

GARCIA, A. 1999. Charophyte flora of southeastern South Australia and southwestern Victoria, Australia: systematic, distribution and ecology. **Australian Journal of Botany** 47: 407-426.

GROVES, J., AND G. R. BULLOCK-WEBSTER. 1920. **The British Charophyta, I. Nitelleae**. Ray Society, London.

GROVES, J., AND G. R. BULLOCK-WEBSTER. 1924. **The British Charophyta, II. Chareae**. Ray Society, London.

GROVES, J.; AND ALLEN, G. O. 1927. On some Indian Charophyta. **Jour. Bot.** 65: 335-339.

HALSTED, B. D. 1879. Classification and description of the American species of Characeae. **Proceedings of the Boston Society of Natural History** 20:169-190.

HY, F. 1913. Les Characées de France. **Bull. Bot. Fr. Mém.** 26:1-47.

HY, F. 1914. Les Characées de France. Note additionnelle. **Bull. Soc. Bot. Fr** 61:235-241.

IMAHORI, K. 1954. **Ecology, phytogeography and taxonomy of the Japanese Charophyta**. Kanazawa University Press. Reprinted 1977, Otto Koeltz Science Publishers, Kownigstein, Germany.

KAROL, K. G. 2004. **Phylogenetic Studies of the Charales: the closest living relatives of land plants**. UNIVERSITY OF MARYLAND, College Park, 164 pages.

KATO, S., SAKAYAMA, H., SANO, S., KASAI, F., WATANABE, M. M., TANAKA, J. & NOZAKI, H. 2008 Morphological variation and intraspecific phylogeny of the ubiquitous species *Chara braunii* (Charales, Charophyceae) in Japan. **Phycologia** 47(2): 191–202.

KATO, S., SAKAYAMA, H. & MORISHIMA, H. 2010 Morphology and molecular phylogeny of *Chara altaica* (Charales, Charophyceae), a monoecious species of the section *Gymnobasalia*. **Cytologia** 75 (2): 211–220.

KHAN, M.; SARMA, Y. S. R. K. 1984. **Cytogeography and cytosystematics of Charophyt**. In Irvine, D. E. G. and John, D. M. (Eds) **Systematics of the Green Algae**. Academic Press, London, pp303-330.

KRAUSE, W. 1997. **Charales (Charophyceae)**. In H. Ettl, G. Gartner, H. Heynig & D. Mollenhauser (eds.) *Subwasserflora von Mitteleuropa*, Band 18. Gustav Fisher, Stuttgart, 202 p.

LANGANGEN, A. 1974. Ecology and distribution of Norwegian charophytes. **Norwegian Journal of Botany** 21:31-52.

LANGANGEN, A.; HANSEN, J.B. & MANN, H. 1996. The Charophytes of Greenland. **Cryptogamie Algologie** 17: 239-257.

MANDAL, D.K., BLAZENCIC, J. & RAY, S. 2002 SEM study of compound oospore wall ornamentation of some members of Charales from Yugoslavia, Croatia and Slovenia. **Archives of Biological Sciences** 54: 28–34.

MANN, H. 1989. Charophytes of insular Newfoundland. **Canadian Field-Naturalist** 103: 34-42.

MANN, H.; PROCTOR, V. W. & TAYLOR, A. S. 1999. Towards a biogeography of North America Charophytes. **Australian Journal of Botany** 47: 445-458.

MCCOURT, R. M., KAROL, K. G., GUERLESQUIN, M. & FEIST, M. 1996a. Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Chlorophyta) based on *rbcL* sequences and morphology. **American Journal of Botany** 83: 125-131.

MCCOURT, R. M., MEIERS, S. T., KAROL, K. G. & CHAPMAN, R. L. 1996b. **Molecular Systematics of Charales**. In: B. R. Chaudhary & S. R. Agrawal (eds.). **Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae**. SPB Academic Publishing, Amsterdam, pp. 323-336.

MCCOURT, R. M., KAROL, K. G., CASANOVA, M. T. & FEIST, M. 1999. Monophyly of genera and species of Characeae based on *rbcL* sequences, with special reference to Australian and European *Lychnothamnus barbatus* (Characeae: Charophyceae). **Australian Journal of Botany** 47:361-369.

MCCRACKEN, M. D., V. W. PROCTOR, AND A. T. HOTCHKISS. 1966. Attempted hybridization between monoecious and dioecious clones of *Chara*. **American Journal of Botany** 53:937-940.

MEURER, T. & BUENO, N.C. 2012 The genera *Chara* and *Nitella* (Chlorophyta, Characeae) in the subtropical Itaipu Reservoir, Brazil. **Brazilian Journal of Botany** 35(2): 219–232.

MIGULA, W. (1890-1897) Die Characeen...etc. In R. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. Ed 2, 5: 765pp., 149 fig. Leipzig. [Parts 1-4, pp. 1-256. 1890; parts 5-6, pp.257-384. 1891; part 7, pp. 385-448. 1892; part 8, pp. 449-512. 1893; part 9, pp. 513-576. 1894; part 10, pp. 577-640. 1895; part 11, pp. 641-688. 1896; part 12, pp. 689-765. 1897.] [A edição original do trabalho de Migula surge na 2ª edição de Rabenhorst's Krypt. – FL., 1980-97. Edição especial de "Die Characeen" surgiu em 1900].

MOORE, J. A. 1986. **Charophytes of Great Britain and Ireland**. Botanical Society of the British Isles, London, n. 5, 141 p.

NORDSTEDT, C. F. O. 1891. **Australasian Characeae, described and figured**, Lund.

OLSEN, S. 1944. Danish Charophyta: Chorological, ecological and biological investigations. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab, **Biologiske Skrifter** 3:1-240.

PAL, B. P. 1932. Burmese Charophyta. **Linnean Journal, Botany** 49:47-92.

PICELLI-VICENTIM, M.M. 1990. **Characeae do estado de São Paulo: inventário sistemático**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PICELLI-VICENTIM, M.M. & BICUDO, C.E.M. 1993. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 4: Charophyceae. **Hoehnea**, 20, n.1-2, p. 9-22.

PICELLI-VICENTIM, M.M.; BICUDO, C.E.M. & BUENO, N.C. 2004. **Flora ficológica do estado de São Paulo, 5: Charophyceae**. São Carlos, RiMa Editora.

PROCTOR, V. W. 1970. Taxonomy of *Chara braunii* : an experimental approach. **Journal of Phycology** 6: 317-321.

PROCTOR, V. W. 1971. *Chara globularis* Thuillier (= *C. fragilis* Desvaux): Breeding patterns within a cosmopolitan complex. **Limnology and Oceanography** 16: 422-436.

PROCTOR, V. W. 1972. Taxonomic significance of monoecism and dioecism in the genus *Chara*. **Phycologia** 10:299-307.

PROCTOR, V. W. 1975. The nature of Charophyte species. **Phycologia** 14:97-113.

PROCTOR, V. W. 1980. Historical biogeography of *Chara* (Charophyta): An appraisal of the Braun-Wood classification plus a falsifiable alternative for future consideration. **Journal of Phycology** 16: 218-233.

PROCTOR, V. W., D. G. GRIFFIN III, AND A. T. HOTCHKISS. 1971. A synopsis of the genus *Chara*, Series *Gymnobasalia* (Subsection *Willdenowia* RDW). **American Journal of Botany** 58: 894-901.

PROCTOR, V. W., AND F. H. WIMAN. 1971. An experimental approach to the systematics of the monoecious-conjoined members of the genus *Chara*, Series *Gymnobasalia*. **American Journal of Botany** 58:885-893.

ROBINSON, C. B. 1906. The Characeae of North America. **Bulletin of the New York Botanical Garden** 4:244-308.

SAKAYANA, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. **Phycological Research** 56: 202-215.

SAKAYAMA, H., NOZAKI, H., KASAKI, H. AND HARA, Y. 2002. Taxonomic re-examination of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Japan, based on microscopical studies of oospore wall ornamentation and *rbcL* gene sequences. **Phycologia** 41: 397-408.

SAKAYAMA, H., HARA, Y., ARAI, S., SATO, H. AND NOZAKI, H. 2004a. Phylogenetic analyses of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Phycologia** 43: 672-81.

SAKAYAMA, H., HARA, Y. AND NOZAKI, H. 2004b. Taxonomic re-examination of six species of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Asia, and phylogenetic relationships within the genus based on *rbcL* and *atpB* gene sequences. **Phycologia** 43: 91-104.

SAKAYAMA, H., MIYAJI, K., NAGUMO, T., KATO, M., HARA, Y. AND NOZAKI, H. 2005. Taxonomic re-examination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences. **Journal of Phycology** 41: 195-211.

SAKAYAMA, H., ARAI, S., NOZAKI, H., KASAI, F. AND WATANABE, M. M. 2006. Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of *Nitella comptonii* (Charales, Characeae). **Phycologia** 45: 417-21.

SAKAYAMA, H., KASAI, F., NOZAKI, H., WATANABE, M., KAWACHI, M., SHIGYO, M. & ITO, M. 2009 Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (Charales,

Charophyceae) from Japan based on oospore morphology and *rbcL* gene sequences, and the description of *C. leptospora* sp. nov.1. **Journal of Phycology** 45(4): 917–927.

SCHNEIDER, S.C., NOWAK, P., VON AMMON, U. & BALLOT, A. 2016 Species differentiation in the genus *Chara* (Charophyceae): considerable phenotypic plasticity occurs within homogenous genetic groups. **European Journal of Phycology** 262: 1–12.

SCHNEIDER, S. C., RODRIGUES, A., MOE, T.F. & BALLOT, A. 2015 DNA barcoding the genus *Chara*: Molecular evidence recovers fewer taxa than the classical morphological approach. **Journal of Phycology** 51 (2): 367–380.

SIMONS, J. & NAT, E. 1996. Past and present distribution of stoneworts (Characeae) in the Netherlands. **Hydrobiologia** 340: 127-135.

VIEIRA JR., J., NECCHI JR., O., BRANCO, C.C.Z. & BRANCO, L.H.Z. 2002. Characeae (Chlorophyta) de ecossistemas lóticos do estado de São Paulo, Brasil: gênero *Nitella* . **Hoehnea** 29:249-266

VIEIRA JR., J., NECCHI JR., O., BRANCO, C.C.Z. & BRANCO, L.H.Z. 2003 Characeae (Chlorophyta) em ecossistemas lóticos do Estado de São Paulo, Brasil: gênero *Chara*, distribuição ecológica. **Hoehnea** 30: 53–70.

WOOD, R. D. 1948. A review of the genus *Nitella* (Characeae) of North America. **Farwolia** 3(3): 331-392, 2pl.

WOOD, R. D. 1951. The Characeae. **Botanical Review** 18:317-353.

WOOD, R. D. 1967. **Charophytes of North America: a guide to the species of Charophyta of North America, Central and West Indies**. Stella's Print, West Kingston, 72p.

WOOD, R. D. 1972. Characeae of Australia. **Nova Hedwigia** 22: 1-120.

WOOD, R. D.; IMAHORI, K. A. 1965. **A Revision of the Characeae, 1: monograph of the Characeae**. Weinheim: J. Cramer, 904 pp.

ZANEVELD, J. S. 1940. The Charophyta of Malaysia and adjacent countries. **Blumea** 4:1-224.

CONCLUSÃO GERAL

A presente tese apresentou duas hipóteses gerais. A primeira previa que o número de espécies de *Chara* e *Nitella* descritas para as regiões Sudeste e Centro-Oeste encontra-se equivocado. Por um lado, esse número estaria super-estimado devido à grande quantidade de espécies definidas com base em critérios mal definidos; e por outro sub-estimado pela provável ocorrência de espécies distintas geneticamente, tanto crípticas como diferenciadas por novos critérios diagnósticos. As evidências moleculares associadas aos dados morfológicos tradicionais e ultra-estruturais comprovaram que, ao menos na primeira parte, esta hipótese foi confirmada. Wood & Imahori (1965) propuseram o rebaixamento de várias espécies a níveis taxonômicos infra-específicos, ampliando os limites dos caracteres que delimitavam as espécies, ou seja, utilizando-se do conceito que denominaram de macro-espécie. Além das comprovações moleculares, segundo McCourt *et al.* (2016), o sistema de Wood e Imahori não vem sendo amplamente utilizado porque trabalhos experimentais (McCracken *et al.* 1966, Grant & Proctor 1972, Proctor 1975) mostraram que ele não reflete as diferenças em nível específico em termos de isolamento reprodutivo. Após consulta ao Algae Base (Guiry & Guiry 2017), nos deparamos com vários táxons propostos como níveis infra-específicos por Wood e Imahori e que vêm sendo re-elevados a nível de espécie. Entretanto, a simples elevação ou rebaixamento dos níveis taxonômicos não contribui de forma efetiva para o avanço da taxonomia de Characeae, pois acreditamos que os dados moleculares podem definir melhor as circunscrições das espécies, e complementarmente caracteres morfológicos podem ser selecionados para a diagnose das mesmas. Assim evitaríamos a adoção de um número enorme de espécies e níveis infra-específicos que em muitos casos não são mais do que variações morfológicas (usualmente refletindo respostas ambientais ou variações populacionais) de um mesmo grupo genético. Na presente tese pudemos apontar prós e contras no sistema proposto por Wood e Imahori (1965), comprovando a necessidade de novos estudos, sobretudo através de dados moleculares, antes de adotar ou descartar totalmente o conceito de macroespécie:

1- Como ponto falho no sistema de Wood e Imahori destacamos a proposta de incluir *C. foliolosa*, *C. haitensis*, *C. hydrophytes* e *C. rusbyana* como variedades e formas da espécie *Chara zeylanica*. Os três marcadores (*rbcl*, ITS2 e *matK*) forneceram subsídios para tratarmos cada um destes táxons como uma espécie distinta. Situação semelhante ocorreu para *Nitella flagellifera*, que foi tratada como uma forma de *Nitella furcata*, mas nossos dados evidenciaram tratar-se de uma espécie distinta e até filogeneticamente distante de *N. furcata*, apesar das semelhanças nas características morfológicas.

2- Como ponto positivo, pudemos confirmar o agrupamento de *N. acuminata*, *N. gollmeriana* e *N. subglomerata* como categorias infra-específicas de *Nitella acuminata*. Os marcadores *rbcl*, ITS1 e ITS2 foram eficientes em mostrar que, apesar das diferenças morfológicas, estes três táxons apresentaram-se geneticamente muito semelhantes. Discordamos, entretanto, em adotar categorias infra-específicas e propusemos a inclusão de *N. gollmeriana* e *N. subglomerata* dentro de *N. acuminata*.

Não encontramos nenhuma nova espécie discernível com base em dados genéticos, bem como não conseguimos definir nenhum novo caráter com grande potencial para diagnose das espécies. Nessa linha, o único caso que merece destaque, foram nossos dados moleculares e morfológicos para *C. guairensis*, que mostraram tratar-se de espécie endêmica do Brasil e totalmente distinta das demais espécies comparáveis, tanto para o Brasil quanto para o resto do mundo

A segunda hipótese enunciava que algumas espécies de *Chara* e *Nitella* ocorrentes no Brasil apresentariam, devido ao isolamento geográfico em período relativamente remoto, sequências de DNA bastante divergentes daquelas de outras regiões do mundo (especialmente da América do Norte, Europa, Ásia e Austrália). Esta hipótese foi refutada ao compararmos as sequências de nossas amostras com aquelas provenientes de outras regiões, inclusive coletadas em países bastante distantes, como por exemplo Malásia e Japão, entre outros. As sequências de *rbcl* apresentaram valores de identidade de 98,4% a 100%, as de ITS1 de 90% a 100% e as de ITS2 de

94,4% a 100%, tanto de *Chara* quanto de *Nitella*. As sequências geradas para o marcador *matK* foram as primeiras a serem incluídas no Genbank para as espécies amostradas neste trabalho, de forma que não há base para comparação com aquelas de outros países. Vale aqui destacar que estes valores foram para clados que, algumas vezes, incluíram mais de uma espécie, como no caso de *Nitella furcata*, que englobou 5 diferentes espécies para o marcador *rbcL*.

Acreditamos que os dados moleculares minimizam a subjetividade na interpretação dos dados, o que é comum em sistemas taxonômicos baseados apenas na morfologia clássica, em que o autor dá maior peso a um caráter em relação a outros. Esta é uma das grandes críticas ao sistema de Wood & Imahori (1965). Com o avanço nos estudos envolvendo maior número de sequências de diversas espécies, provavelmente teremos maior subsídio para determinarmos quais características morfológicas associadas às unidades genéticas melhor se aplicam para separar as espécies.

Quanto à ornamentação da parede do oósporo, a sua aplicabilidade tem grande potencial, uma vez que tem se mostrado como um caráter morfológico bastante conservado em níveis taxonômicos supra-específicos (sub-gêneros e secções), não sendo, porém, tão efetivo para separação de espécies. Isso foi demonstrado por Sakayama *et al.* (2002, 2004a, 2004b, 2008) e corroborado em nosso trabalho.

Por fim, esperamos que esta tese estimule outros pesquisadores brasileiros a realizarem novos trabalhos empregando ferramentas moleculares e ultra-estruturais. O campo a ser explorado no país ainda é vasto, visto que, são reportadas 23 espécies de *Chara* e 27 de *Nitella* para o Brasil (Bueno *et al.* 2015). Esperamos que o uso destas ferramentas, associadas à análise crítica da taxonomia clássica, possam contribuir de forma efetiva para aprimorar o sistema de classificação de Characeae em nível global.

Referências

- BUENO, N.C.; MEURER, T.; BICUDO, C.E.M. Charophyceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015
Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB119566>>.
- GRANT, M. C. & PROCTOR V. W. 1972 *Chara vulgaris* and *C. contraria*: patterns of reproductive isolation for two cosmopolitan species complexes. **Evolution** 26: 267-281.
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. (2017) **AlgaeBase: World-wide electronic publication**. National University of Ireland, Galway.
- MCCOURT, R. M., KAROL, K.G.; HALL, J. D.; CASANOVA, M.; GRANT, M. C. Charophyceae (Charales) In: ARCHIBALD, J. M.; SIMPSON, A. G. B.; SLAMOVITS, C. H.; MARGULIS, L.; MELKONIAN, M.; CHAPMAN, D. J.; CORLISS J.O. **Handbook of the Protists**. Springer International Publishing 2016 p. 1-20
- MCCRACKEN, M. D., V. W. PROCTOR, AND A. T. HOTCHKISS. 1966. Attempted hybridization between monoecious and dioecious clones of *Chara*. **American Journal of Botany** 53:937-940.
- PROCTOR, V. W. 1975. The nature of Charophyte species. **Phycologia** 14:97-113.
- SAKAYANA, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. **Phycological Research** 56: 202-215.
- SAKAYAMA, H., NOZAKI, H., KASAKI, H. AND HARA, Y. 2002. Taxonomic re-examination of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Japan, based on microscopical studies of oospore wall ornamentation and *rbcL* gene sequences. **Phycologia** 41: 397–408.
- SAKAYAMA, H., HARA, Y., ARAI, S., SATO, H. AND NOZAKI, H. 2004a. Phylogenetic analyses of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Phycologia** 43: 672–81.
- SAKAYAMA, H., HARA, Y. AND NOZAKI, H. 2004b. Taxonomic re-examination of six species of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Asia, and phylogenetic relationships within the genus based on *rbcL* and *atpB* gene sequences. **Phycologia** 43: 91–104.
- WOOD, R. D.; IMAHORI, K. A. 1965. **A Revision of the Characeae, 1: monograph of the Characeae**. Weinheim: J. Cramer, 904 pp.