



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Douglas de Castro Agostinho

Sistemática da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil

São José do Rio Preto
2013

Douglas de Castro Agostinho

Sistemática da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil

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.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Necchi Junior

São José do Rio Preto
2013

Agostinho, Douglas de Castro.

Sistemática da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil/ Douglas de Castro Agostinho. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.

62 f. : 16 il. ; 30 cm.

Orientador: Orlando Necchi Junior
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Sistemática. 2. Batrachospermales. 3. *Virescentia*. I.
Necchi Junior, Orlando. II. Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.86

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

Douglas de Castro Agostinho

Sistemática da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil

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

Prof^a. Dr^a. Mariana Cabral de Oliveira
USP – São Paulo

São José do Rio Preto
19 de fevereiro de 2013

Agradecimentos

Agradeço à FAPESP (Processos 2007/51270-7, 2008/00708-5), CNPq (Proc. 303952/2009-1) e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Orlando Necchi Junior, pela orientação e apoio durante os anos de desenvolvimento do projeto.

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, alunos e funcionários do Departamento de Zoologia e Botânica pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ciro, Monica e Rogério pelas coletas realizadas para que este trabalho pudesse se concretizar e à professora Morgan Vis por disponibilizar os espécimes-tipo.

Aos amigos do Laboratório BETA pelo apoio e momentos de descontração.

À meu pai Nivaldo, minha mãe Rosália, meus irmãos Maila e Túlio e minha namorada Renata por todo apoio e incentivo.

Muito obrigado!

RESUMO

Três espécies da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* foram anteriormente reconhecidas para o Brasil com base em caracteres morfológicos: *B. helminthosum* Bory, *B. sirodotii* Reis e *B. vogesiacum* Schultz. No entanto, em um estudo posterior da seção com base em análises morfométricas de populações da América do Norte, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* foram tratadas como sinônimos de *B. helminthosum*. O presente estudo teve como objetivo inferir as relações filogenéticas, bem como os limites de variação intra e interespecífico das espécies da seção *Virescentia* no Brasil com base na análise morfológica e molecular, utilizando caracteres diagnósticos atualmente aceitos e dois marcadores moleculares: gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO (*rbcl* – 1.282 pares de base, pb) e região de “barcode” do gene mitocondrial que codifica a subunidade 1 da citocromo c oxidase (*cox1* – 664 pb). Foram analisadas 13 amostras provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil, além dos espécimes-tipo da seção, provenientes do Herbário PC (Paris, França). Os espécimes foram coletados em águas com baixa concentração de nutrientes e bem oxigenadas (condições oligotróficas e oligossapróbicas) sugerindo serem bioindicadores de rios/riachos de boa qualidade. Não foi possível distinguir as três espécies anteriormente reconhecidas para o Brasil com base em caracteres morfológicos. As dimensões dos carpogônios, carposporófitos e carposporângios dos espécimes brasileiros foram consideravelmente superiores às dos espécimes-tipo, indicando que o material brasileiro representa uma espécie distinta. As análises moleculares geraram os seguintes dados: *rbcl* - 11 sequências novas e 19 do GenBank (1 do Brasil, 13 dos E.U.A. e 5 do Japão); *cox1* - 12 sequências novas e 7 do GenBank (E.U.A.). Análises baseadas nas sequências de *rbcl* revelaram

a seção *Virescentia* como monofilética e evidenciaram três clados bem definidos e com nítida separação geográfica entre sequências do Brasil, E.U.A. e Japão. Os níveis de divergência dentro de cada clado foram os seguintes: Brasil de 0 a 12 pb (0–1,0%); E.U.A. de 0 a 30 pb (0–2,4%); Japão de 2 a 41 pb (0,2–3,2%). Por outro lado, a divergência entre os clados foi consideravelmente maior: 35 a 57 pb (2,8–4,5%) entre sequências do Brasil e E.U.A; 24 a 53 pb (1,9–4,2%) entre Brasil e Japão; 29 a 66 pb (2,3–5,2%) entre sequências dos E.U.A. e Japão. Para a análise de *cox1*, observou-se dois clados com distinta separação geográfica entre amostras brasileiras e americanas, com variação de 48 a 69 pb (7,3–10,4%) entre os clados e variação dentro de cada clado de 2 a 19 pb (0,3–2,9%) para sequências do Brasil e 1 a 45 pb (0,2–6,8%) para sequências dos E.U.A. Análises baseadas nas sequências de *rbcL* e *cox1* foram, portanto, congruentes, indicando níveis de divergência suficientes para distinguir espécies dentro da seção. Esses resultados sugerem que as amostras do Brasil, Japão e EUA correspondem a, pelo menos, três espécies distintas. As amostras de *B. helminthosum* do Brasil apresentaram variação de 1 a 2 pb (0,1–0,2%) para as sequências de *rbcL*, enquanto que as de *B. sirodotii* variaram de 1 a 8 pb (0,1–0,7%) e as de *B. vogesiacum* de 2 a 6 pb (0,2–0,5%). Comparando-se as sequências entre as três espécies, observou-se uma variação de 0 a 12 pb (0–1,0%). Para as sequências de *cox1*, as amostras de *B. helminthosum* apresentaram variação de 4 a 13 pb (0,7–2,0%), enquanto que as amostras de *B. sirodotii* de 4 a 19 pb (0,7–2,9%) e as de *B. vogesiacum* de 2 a 17 pb (0,3–2,6%). Comparando-se as sequências entre as espécies, observou-se uma de divergência de 9 a 19 pb (1,4–2,9%). Não se observou, portanto, disjunção entre os limites de divergência inter e intraespecífica das sequências para ambos marcadores que permitisse a separação das três espécies. Desse modo pode-se concluir, com base em dados morfológicos e moleculares, que: a seção *Virescentia* constitui um grupo monofilético dentro do gênero

Batrachospermum; as amostras do Brasil correspondem a uma única espécie, provisoriamente identificada como *B. helminthosum*; as amostras do Brasil, E.U.A. e Japão correspondem a, pelo menos, três espécies distintas.

Palavras-chave: Batrachospermales, *Batrachospermum*, *cox1*, *rbcL*, sistemática, *Virescentia*

ABSTRACT

Three species of Batrachospermum section Virescentia were previously recognized for Brazil based on morphological characters: B. helminthosum Bory, B. sirodotii Reis and B. vogesiacum Schultz. A further revisionary study of the section based on morphometric analysis for populations from North America treated B. sirodotii and B. vogesiacum as synonyms of B. helminthosum. The goals of this study were to infer the phylogenetic relationships, as well as the limits of intra and interspecific variation among the species of Virescentia section in Brazil, based on morphological and molecular analyses, using the diagnostic characters currently accepted and two molecular markers: the plastidial gene that encodes the RUBISCO large subunit (rbcL) and the “barcode” region of the mitochondrial gene cox1 that encodes the cytochrome c oxidase sub-unity 1). We analyzed 13 samples from the south and southeast regions of Brazil and six dried archival samples (type specimens) from PC Herbarium (Paris, France). The specimens were collected in well oxygenated waters with low concentration of nutrients (oligotrophic and oligosaprobic conditions), suggesting to be bioindicators of good quality environments. It was not possible to distinguish the three species previously recognized in Brazil based on morphological characters. Carpogonium, carposporophyte and carposporangium dimensions among Brazilian specimens were considerably higher in comparison to type specimens, indicating that they probably represent distinct species. Molecular analysis yielded the following data: rbcL – 11 new sequences and 19 from GenBank (1 from Brazil, 13 from USA and 5 from Japan); cox1 – 12 new sequences and 7 from GenBank (USA). Analyses based on rbcL sequences (1,282 base pairs, bp) and cox1 (664 bp) were congruent and showed section Virescentia as a clear monophyletic group and showed three clades with distinct geographical separation between Brazilian, North American and

Japanese samples. The divergence within each clade was as follows: Brazil 0 to 12 bp (0–1,0%); U.S.A. 0 to 30 bp (0–2,4%); Japan 2 to 41 bp (0,2–3,2%). On the other hand, the divergences between each clade was considerably higher: 35 to 57 bp (2,8–4,5%) between Brazil and USA; 24 to 53 bp (1,9–4,2%) between Brazil and Japan; 29 to 66 bp (2,3–5,2%) between U.S.A. and Japan. The *cox1* analyses showed two clades with clear geographical separation between Brazilian and North American samples with a divergence of 48 to 69 bp (7,3–10,4%) between clades and a divergence of 2 to 19 bp (0,3–2,9%) among Brazilian sequences and 1 to 45 bp (0,2–6,8%) among sequences from U.S.A. Therefore, analysis based on *rbcL* and *cox1* were congruent, with enough divergence to distinguish species among the section. These findings imply that samples from Brazil, Japan and U.S.A. correspond to at least three distinct species. Samples of *B. helminthosum* from Brazil had variation of 1 to 2 bp (0,1–0,2%) for *rbcL* sequences, whereas those of *B. sirodotii* ranged from 1 to 8 bp (0,1–0,7%) and the ones of *B. vogesiacum* from 2 to 6 bp (0,2–0,5%). The comparison among the species revealed a variation of 0 a 12 bp (0–1,0%). For *cox1* sequences, the samples of *B. helminthosum* had a variation from 4 to 13 bp (0,7–2,0%), whereas those of *B. sirodotii* from 4 to 19 bp (0,7–2,9%) and the ones of *B. vogesiacum* from 2 to 17 bp (0,3–2,6%). The comparison among the species showed a divergence of 7 to 19 bp (1,1–2,9%). Therefore, we have not found clear disjunctions among the limits of inter and intra-specific divergences for both markers that allowed the distinction of the three species. These values were, as a rule, lower than the intraspecific variation reported in other members of the order *Batrachospermales*. In summary, we concluded that, based on morphological and molecular data, the section *Virescentia* represents a monophyletic clade within the genus *Batrachospermum*; the Brazilian samples represent a single species, for which we provisionally adopted the combination *B. helminthosum*; the sequences from Brazil, USA and

Japan, represent at least three distinct species within the section Virescentia.

Key index words: Batrachospermales, Batrachospermum, cox1, rbcL, systematic, Virescentia

Sumário

1.	Introdução	11
1.1.	Gênero <i>Batrachospermum</i>	14
1.2.	Seção <i>Virescentia</i>	16
1.3.	DNA “barcoding”	18
1.4.	Análises moleculares em Batrachospermales	20
1.5.	Hipóteses	22
1.6.	Objetivos	22
2.	Materiais e Métodos	23
2.1.	Características ambientais	25
2.2.	Preservação	25
2.3.	Análises Morfológicas	26
2.4.	Análises Moleculares	28
2.4.1.	Extração de DNA	28
2.4.2.	Amplificação de DNA	28
2.4.3.	Eletroforese em gel de agarose	29
2.4.4.	Purificação e quantificação dos produtos de PCR	30
2.4.5.	Sequenciamento e alinhamento	30
2.5.	Análises Filogenéticas	31
3.	Resultados	34
3.1.	Variáveis ambientais	34
3.2.	Análises morfológicas	35
3.4.	Análises moleculares	41
3.4.1.	Análises das sequências de <i>rbcL</i>	41
3.4.2.	Análises das sequências de <i>cox1</i>	46
4.	Discussão	48
5.	Conclusões	52
6.	Referências	54

1. Introdução

As algas vermelhas (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). A maioria das rodófitas habita ambientes marinhos (98%), mas muitos táxons bem conhecidos são de habitats de água doce e nascentes de água quente e ácida. Também foram relatadas em florestas tropicais como membros de comunidades subaéreas (GURGEL & LOPEZ-BAUTISTA, 2007). Segundo Graham & Wilcox (2009), são estimados de 500 a 600 gêneros e pouco mais de 6.000 espécies de algas vermelhas e acredita-se que o número de espécies possa chegar a 20.000, devido às recentes descobertas de espécies crípticas (NORTON et al., 1996).

As algas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos como produtores primários e, portanto, como fonte de alimento, produção de oxigênio e ciclagem de nutrientes (BLANCK et al., 1984). Além de sua importância evolutiva e ecológica, as rodófitas apresentam grande importância econômica, movimentando mais de dois bilhões de US dólares por ano, principalmente como alimento humano ou para a extração de substâncias químicas de natureza diversa, como os ficocolóides (ARMISEN, 1995). As rodófitas são fontes exclusivas de certos hidrocolóides como o ágar-ágar e as carragenanas, que são imprescindíveis à vida no mundo moderno (CRICHLEY & OHNO, 1998).

Rodófitas não possuem clorofilas *b* e *c*, mas contêm ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) na forma de ficobilissomos em tilacóides não empilhados (GRAHAM & WILCOX, 2009). Os membros desse grupo não apresentam flagelos e centríolos em nenhum estágio de vida (GABRIELSON et al., 1990; GRAHAM & WILCOX, 2009). O cloroplasto é envolto por duas membranas e produz amido das florídeas, que é armazenado no citoplasma. Acredita-se 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; DELWICHE et al., 1995; CAVALIER-SMITH, 1998; MCFADDEN, 1999; BHATTACHARYA et al., 2004; RODRIGUEZ-EZPELETA et al., 2005).

Tradicionalmente, o filo Rhodophyta tem sido dividido em duas classes (ou subclasses): Bangiophyceae (Bangiophycidae) e Florideophyceae (Florideophycidae) (GARBARY & GABRIELSON, 1990). No entanto, estudos concluíram que Florideophyceae forma um grupo monofilético com a ordem Bangiales, que pertence à classe Bangiophyceae (OLIVEIRA & BHATTACHARYA, 2000; MULLER et al., 2001; YOON et al., 2002; SAUNDERS & HOMMERSAND, 2004). Bangiophyceae, que no passado foi dividida em seis ordens (Bangiales, Cyanidiales, Compsopogonales, Erythropeltiales, Porphyridiales, e Rhodochaetales), atualmente é considerada como formada por uma série de radiações que definem as linhagens ancestrais das algas vermelhas (GABRIELSON et al., 1985; FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994).

Saunders & Hommersand (2004) propuseram a criação do sub-reino Rhodoplantae com os filios Cyanidiophyta e Rhodophyta. No entanto, segundo Yoon et al. (2006), as Cyanidiophyta compartilham muitas características com Rhodophyta, e a criação de um sub-reino e dois filios não é necessária. Com base em resultados de múltiplos marcadores moleculares, Yoon et al. (2006) propuseram sete linhagens de Rhodophyta que devem ser reconhecidas como classes. Como as Cyanidiophyceae divergiram primeiro na evolução das rodófitas e são separadas das outras linhagens, foi proposto a criação dos subfilios Cyanidiophytina e Rhodophytina. Este último agrupa todas as demais linhagens de algas vermelhas e está subdividida nas classes Bangiophyceae, Florideophyceae,

Compsopogonophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae, sendo que as duas primeiras formam um grupo monofilético (YOON et al., 2006).

Florideophyceae apresenta 99% das espécies conhecidas, o que equivale a aproximadamente 6.000 espécies (GRAHAM & WILCOX, 2009). O número de ordens reconhecidas varia de 16 (YOON et al., 2006) a 23 (LE GALL & SAUNDERS, 2007). A classificação das ordens e famílias de Florideophyceae é feita, em grande parte, com base nas características dos ciclos de vida e tipos de reprodução sexuada. Tais organismos crescem por meio de células apicais e consistem de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas através de “pit-connections” (conexões intercelulares entre células adjacentes), as quais em nível ultraestrutural formam os chamados “pit plugs” (GRAHAM & WILCOX, 2009). Caracteres ultraestruturais dos “pit plugs” são importantes para delimitação das ordens, tais como número e arranjo das camadas. Outra característica que também complementa a caracterização das ordens de rodófitas é a composição química da parede celular: ágar ou carragenana (FRESHWATER et al., 1994).

Dentre as ordens de Florideophyceae, Batrachospermales é distinta das demais com base em seu ciclo de vida heteromórfico (com presença da fase alternante denominada estágio ‘Chantransia’), ausência de tetrasporângio e ocorrência de meiose somática, “pit plug” com duas camadas (com a camada externa expandida e abaulada), e por ser estritamente de água doce (PUESCHEL & COLE, 1982; SHEATH, 1984). Segundo Saunders & Hommersand (2004), Batrachospermales é composta por três famílias: Batrachospermaceae, Lemaneaceae e Psilosiphonaceae. ENTWISLE et al. (2009) adotaram apenas uma família (Batrachospermaceae) com circunscrição expandida (incluindo Lemaneaceae e Psilosiphonaceae).

O número formalmente descrito de espécies de Batrachospermales continua a crescer desde a monografia de Simon Sirodot (SIRODOT, 1884). A estrutura básica dentro da ordem parecia bem confiável até Necchi & Entwisle (1990) questionarem se a classificação

de vários táxons era informativa, consistente, e filogeneticamente coerente, propondo uma revisão radical na classificação. O novo sistema foi relativamente pouco adotado, até mesmo pelos próprios autores, principalmente pela dificuldade em interpretar o significado filogenético dos dados morfológicos rapidamente gerados e a descrição de novas espécies ao redor do mundo. Quando Entwisle & Foard (1997) descreveram um grupo de espécies da Austrália e Nova Zelândia que não se encaixavam confortavelmente em nenhuma das seções de *Batrachospermum* descritas para o Hemisfério Norte, ficou claro que algumas mudanças seriam necessárias. Assim, desde a publicação da primeira árvore filogenética baseada em dados moleculares (VIS et al., 1998), tornou-se óbvio que uma simples reestruturação seria insuficiente.

1.1. Gênero *Batrachospermum*

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, o gênero *Batrachospermum* Roth (família Batrachospermaceae) é o mais especioso, com pelo menos 112 espécies reconhecidas mundialmente (KUMANO, 2002), bem como bastante diverso morfológicamente. O gênero é distinto 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 (nunca observados em *B. brasiliense* Necchi) esféricos ou semiesféricos, diretamente resultantes do carpogônio fecundado; e ramo carpogonial mais ou menos reto e radialmente simétrico (não torcido espiralmente ou fortemente curvado) (PUESCHEL & COLE, 1982; SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; ENTWISLE et al., 2009).

As algas vermelhas de águas continentais pertencentes ao gênero *Batrachospermum* podem ter importância como fonte de alimento e abrigo para invertebrados e também como

bioindicadores de poluição antropogênica relativamente baixa (SHEATH & HAMBROOK, 1990; SHEATH et al., 1995; SHEATH et al., 1996). Espécies de *Batrachospermum* e outros membros de Batrachospermales não possuem propágulos resistentes à dessecação, o que pode limitar a capacidade de dispersão (SHEATH & HAMBROOK, 1990). Por outro lado, espécies de *Batrachospermum* foram reportadas para todo o globo, do ártico aos trópicos, e algumas espécies apresentam ampla distribuição, tendo sido coletadas em mais de um continente (KUMANO, 2002). Estes organismos são tipicamente encontrados em ambientes bem oxigenados, aderidos a rochas ou a troncos lenhosos submersos e macrófitas (SHEATH, 1984).

O gametófito macroscópico é dominante no histórico de vida, e suas características são frequentemente utilizadas na discriminação taxonômica em nível específico. *Batrachospermum* apresenta reprodução oogâmica, onde o espermácio não flagelado fecunda o carpogônio. Diferente de outras algas vermelhas de Florideophyceae, *Batrachospermum* e gêneros relacionados não apresentam tetrasporângio, mas possuem dois estágios esporofíticos (carposporófito e estágio ‘Chantransia’) e um gametófito (SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; SHEATH, 2003).

A arquitetura taxonômica do gênero *Batrachospermum* sofreu poucas modificações desde a monografia de Sirodot (1884). Nas décadas recentes, algumas categorias infragenéricas foram adicionadas: o subgênero *Acarposporophytum* Necchi, a seção *Gonimopropagulum* Sheath et Whittick, e várias subseções das seções *Aristata* Skuja e *Contorta* Skuja (KUMANO, 2002). Houve certa revisão e rearranjo nomenclatural entre esses grupos (NECCHI & ENTWISLE, 1990; COMPÈRE, 1991) e algumas modificações taxonômicas maiores envolvendo sinonímias (VIS et al., 1995). No entanto, as unidades taxonômicas chave e princípios permaneceram notavelmente estáveis.

O gênero *Batrachospermum* tem sido demonstrado como parafilético em todos os estudos filogenéticos moleculares realizados (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000;

VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009). Há evidências convincentes dessa parafilia (KAPRAUN et al., 2007), e em um estágio que não se pode mais ser taxonomicamente corrigido com pequenos ajustes. ENTWISLE et al. (2009) propuseram uma revisão da ordem Batrachospermales, que resultou na aceitação provisória do gênero *Batrachospermum* e reconhecimento de oito seções – *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora* Kumano, *Setacea* De Toni, *Turfosa* Sirodot e *Virescentia* Sirodot. A maioria das seções carece de análises mais amplas incluindo número representativo de espécies e de populações de cada espécie.

Os trabalhos taxonômicos recentes mais relevantes sobre o gênero resumem o conhecimento atual no nível de espécie, e são brevemente comentados a seguir: Necchi (1990b) realizou revisão das espécies do gênero para o Brasil, incluindo descrições detalhadas de 29 espécies, sendo duas delas descritas como espécies novas para a Ciência. Robert Sheath e Morgan L. Vis (SHEATH et al., 1992, 1993b, 1994a, b, c; SHEATH & VIS, 1995; VIS et al., 1995; VIS & SHEATH, 1996; VIS et al., 1996a, b) realizaram trabalhos de revisão para os grupos (seções) representados na América do Norte, com base em análises morfológicas detalhadas; Entwisle (1992; 1993) e Entwisle & Foard (1997; 1999a; b; 2007) conduziram análises semelhantes para os grupos representados na Austrália e Nova Zelândia.

1.2. Seção *Virescentia*

Dentre as seções do gênero *Batrachospermum*, a seção *Virescentia* (SIRODOT, 1873) corresponde a espécies com aparência esverdeada e verticilos bem desenvolvidos, carposporófitos grandes produzidos isoladamente ou em pares e inseridos no eixo principal, ramos carpogoniais retos e curtos originados das células pericentrais ou células

fasciculares proximais, e carpogônio com tricogínios alongados e pedicelados (MORI, 1975; KUMANO, 2002).

KUMANO (2002) reconheceu, em nível mundial, onze espécies para a referida seção: 1) *B. crispatum* Kumano; 2) *B. gombakense* Kumano; 3) *B. vogesiacum* T.G. Schultz (= *B. flageliforme* Sirodot); 4) *B. gulbenkianum* Reis; 5) *B. bakarense* Kumano; 6) *B. azeredoi* Reis; 7) *B. ferreri* Reis; 8) *B. elegans* Sirodot; 9) *B. transtaganum* Reis; 10) *B. helminthosum* Bory; e 11) *B. desikacharyi* Sankaran.

Necchi (1990b) verificou a ocorrência de três espécies deste grupo para o Brasil: *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*. A distinção destas espécies foi baseada no número de células dos fascículos primários e abundância dos fascículos secundários. *Batrachospermum vogesiacum* apresenta plantas masculinas com 6-10 células nos fascículos primários e fascículos secundários em pequeno número e esparsos, enquanto que plantas femininas ou monóicas apresentam 8-12 células e fascículos secundários numerosos e situados ao longo do entrenó. *Batrachospermum helminthosum* apresenta plantas masculinas com 10-15 células nos fascículos primários, com fascículos secundários ao longo de todo ou 2/3 do entrenó e 12-18 células em plantas femininas ou monóicas, com fascículos secundários numerosos, sobre metade do entrenó ou apenas próximos dos nós. *Batrachospermum sirodotii* apresenta fascículos secundários pouco numerosos e situados próximo do nó ou esparsamente no entrenó e fascículos primários com 6-10 células em plantas masculinas e 8-12 células em plantas femininas ou monóicas (NECCHI, 1990b).

Sheath et al. (1994a) reconheceram duas espécies desta seção para a América do Norte: *B. helminthosum* e *B. elegans*. Estes autores trataram *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* como sinônimos de *B. helminthosum*. No entanto, os dados morfológicos obtidos por esses autores abrangem praticamente toda a amplitude reportada para todas as espécies da seção. As relações filogenéticas entre as espécies da seção *Virescentia* (NECCHI, 1990b), baseada em número representativo de espécies, bem como desta com outras seções do

gênero *Batrachospermum* estão ainda estabelecidas de maneira muito superficial devido à pequena representatividade de sequências disponíveis.

Espécies da seção *Virescentia* foram reportadas na Europa (SIRODOT, 1884; ISRAELSON, 1942; STARMACH, 1977), Brasil (NECCHI, 1990b) e Japão (MORI, 1975). Na América do Norte, coleções foram amplamente reportadas no leste dos Estados Unidos, de Louisiana a Vermont (HYLANDER, 1928; FLINT, 1948, 1950; SCHUMACHER & WHITFORD, 1961; MOUL & BUELL, 1979; SHEATH & BURKHOLDER, 1985; SHEATH et al., 1993a) e, na porção oeste do continente, populações desta seção foram encontradas em Oregon (SHEATH et al., 1986) e Washington (SHEATH & HAMBROOK, 1988). O único registro de coleção de região tropical na América do Norte é de Starmach (1986-1987), proveniente de Cuba. No Brasil, as três espécies da seção foram reportadas em áreas predominantemente subtropicais e temperadas, menos frequentemente em tropicais, das regiões sudeste e sul, do estado de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (19°10' - 30°45'S) (NECCHI, 1990b).

1.3. DNA “barcoding”

A identificação e delimitação de espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) são notoriamente difíceis devido a uma morfologia e anatomia relativamente simples e em muitos casos convergentes, grande plasticidade fenotípica, e alternância de gerações heteromórficas no ciclo de vida (ROBBA et al., 2006). Devido a essas dificuldades, pesquisadores têm utilizado de forma crescente ferramentas moleculares para auxílio na taxonomia e biogeografia de algas (SAUNDERS, 2005).

DNA “barcoding” é um método de identificação e reconhecimento de espécies utilizando sequências de DNA (HEBERT et al., 2003; HEBERT et al., 2004a; HEBERT et al., 2004b). A técnica de DNA “barcoding” é baseada na amplificação por PCR

(“Polymerase Chain Reaction”) de um segmento de DNA relativamente curto (~400-700 pares de base – pb) que pode ser inteiramente sequenciado com os mesmos dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) usados na PCR. O sistema de DNA “barcoding” é prático e uniforme para identificação de espécies; além disso, os dados gerados possuem ampla aplicação, com grande utilidade em levantamentos de biodiversidade e em estudos de conservação (COSTION et al., 2011; PAZ & CRAWFORD, 2012). O método de DNA “barcoding” pode ser aplicado mesmo quando as técnicas tradicionais não são viáveis, como organismos em estado juvenil, espécies com alta plasticidade fenotípica ou fragmentos de espécimes (FLOYD et al., 2002; NEIGEL et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009; EATON et al., 2010; LUMBSCH & LEAVITT, 2011). No caso das algas vermelhas, a presença de estruturas reprodutivas é muitas vezes necessária para a identificação, e na ausência dessas, a determinação da espécie e até mesmo do gênero é impossibilitada (SAUNDERS, 2005). O DNA “barcoding” permite ainda a detecção de espécies crípticas e fornece dados que ajudam a entender a diversidade biológica e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação (HEBERT et al., 2004a; SMITH et al., 2006; SMITH et al., 2007; BURNS et al., 2008; SMITH et al., 2008; HUBERT et al., 2012).

Diferentes marcadores ou protocolos podem ser necessários em certos grupos taxonômicos, mas aparentemente não existem barreiras para a aplicação dessa metodologia em nenhum grupo de ser vivo (DESALLE et al., 2005; SAUNDERS, 2005; SMITH et al., 2006).

Estudos envolvendo DNA “barcoding” têm demonstrado grande potencial para sistemática em níveis específicos de algas vermelhas (SAUNDERS, 2005; ROBBA et al., 2006; SAUNDERS & MCDEVITT, 2012) e recebido grande atenção recentemente. A região de “barcode” do gene *cox1* (codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) tem sido aplicada como marcador clássico para estudos desse tipo, com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores e termociclos específicos para diferentes grupos

(SAUNDERS, 2005; SAUNDERS & MCDEVITT, 2012), apresentando níveis de variação suficientes e apropriados para avaliação de variabilidade genética específica em representantes de Batrachospermales (SHERWOOD et al., 2008). Assim, a utilização da região de “barcode” do gene *cox1* como marcador molecular para reconhecimento de espécies está sendo intensamente utilizada em estudos mais recentes.

1.4. Análises moleculares em Batrachospermales

VIS et al. (1998) efetuaram a primeira tentativa de análise filogenética molecular de membros da ordem Batrachospermales com base na análise de sequências de dois marcadores: gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO (*rbcL*) e gene nuclear que codifica a subunidade pequena do ribossomo (SSU rDNA). A representação de espécies de cada grupo dentro do gênero foi relativamente pequena e somente investigações mais recentes conduzidas por Morgan L. Vis e colaboradores (VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2012) têm incluído maior número de espécies do grupo em análises filogenéticas moleculares, e referem-se especialmente ao gene *rbcL*.

Múltiplos marcadores moleculares têm sido utilizados para examinar padrões biogeográficos de *B. helminthosum* na América do Norte, incluindo o ISSR (“intersimple sequence repeats”), espaçador transcrito interno (ITS), gene plastidial *rbcL* e a região espaçadora das subunidades 2-3 da citocromo oxidase (*cox2-3*) (VIS et al., 2001; HALL & VIS, 2002; CHIASSON et al., 2003). Os dados de ISSR apresentaram níveis de variação semelhantes entre 11 localidades analisadas ao longo da região leste da América do Norte, sugerindo que cada segmento de riacho é distinto e contribui para a diversidade genética dessa espécie (HALL & VIS, 2002). As sequências de *rbcL*, ITS e *cox2-3* foram congruentes entre si e forneceram maior evidência da dispersão entre riachos do que os

dados de ISSR, mas os dados que forneceram maior resolução filogeográfica foram os de *cox2-3* (VIS et al., 2001; CHIASSON et al., 2003).

HANYUDA et al. (2004) realizaram análises biogeográfica e taxonômica de *B. helminthosum* no Japão, com base em sequências de *rbcL* de 27 populações coletadas em várias localidades e concluíram que houve uma recente dispersão dessa alga nas ilhas daquele país. Estes pesquisadores encontraram um haplótipo dominante e quatro haplótipos menos comuns, representados por um a três indivíduos. Um dos haplótipos japoneses apresentou nível de divergência bem mais alto em relação aos demais (37 a 46 pb, 2,6–3,3%) e com posicionamento mal resolvido, sugerindo tratar-se de uma espécie distinta.

Estudos já publicados combinando dados moleculares e morfológicos enfocaram apenas as relações filogenéticas entre os grupos maiores (gêneros ou seções) (FRESHWATER et al., 1994; VIS et al., 1998; VIS et al., 2005) e abordagens visando avaliar o número de espécies só foram iniciados muito recentemente e são ainda escassos. 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 (gênero *Sirodotia*, LAM et al., 2012; e seções *Turfosa* e *Virescentia* de *Batrachospermum*, NECCHI, VIS e colaboradores, em andamento) têm evidenciado tendências muito interessantes: a diversidade genética no nível específico tem sido muito maior do que a inicialmente prevista, isto é, um número consideravelmente maior de espécies tem sido encontrado em relação aos estudos anteriores, bem como ocorrência de espécies crípticas. Essas últimas têm sido reconhecidas com alto nível de divergência genética, porém sem a correspondente distinção morfológica, mas em alguns casos, apenas geográfica, como a ocorrência de linhagens distintas geneticamente, mas não morfológicamente, entre continentes (LAM et al., 2012). 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, conforme ocorreu com o gênero *Kumanoa* (ENTWISLE et al., 2009).

1.5. Hipóteses

Com base nas informações atualmente disponíveis (morfológicas e moleculares) sobre representantes do gênero *Batrachospermum* no Brasil e em outras regiões do mundo, as seguintes hipóteses foram testadas: 1) a seção *Virescentia* constitui um grupo monofilético dentro do gênero *Batrachospermum*; a seção tem sido demonstrada como monofilética em estudos filogenéticos (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009); 2) As três espécies atualmente reconhecidas para o Brasil com base em caracteres morfológicos (*B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*) serão corroboradas pelos dados moleculares; 3) Os caracteres morfológicos usados para distinguir as três espécies – abundância de ramos secundários e número de células dos ramos primários (NECCHI, 1990b) – têm sido demonstrados como de valor diagnóstico para outras seções do gênero *Batrachospermum* e gêneros afins da ordem Batrachospermales, como *Kumanoa* (NECCHI & VIS, 2012), e prevê-se que serão corroborados pelos dados moleculares.

1.6. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos: 1) inferir as relações filogenéticas das espécies brasileiras da seção *Virescentia* e destas com representantes da seção de outras regiões do mundo com base na análise de sequências dos genes *rbcL* e *cox1*; 2) avaliar os limites de variação intra e interespecíficos das espécies no Brasil com base nas análises

molecular de sequências dos dois marcadores moleculares e morfológica utilizando caracteres diagnósticos atualmente aceitos.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas treze amostras envolvendo três espécies da seção *Virescentia* de *Batrachospermum* (Tabela 1), provenientes da região sul e sudeste do Brasil e incorporados ao Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica (SJRP) (THIERS, 2012). Foram visitadas várias outras localidades das regiões sudeste e sul do Brasil onde havia sido reportada a ocorrência de representantes da seção no Brasil (NECCHI, 1990b), porém em várias dessas tentativas não foram encontrados espécimes. A identificação das espécies seguiu os critérios morfológicos adotados para populações brasileiras no estudo revisionário de NECCHI (1990b).

Foi feita a análise morfológica dos espécimes-tipo da seção *Virescentia*, através do exame de lâminas semipermanentes preparadas a partir de exsiccatas provenientes do Herbário PC (THIERS 2012, Museu Nacional de História Natural, Paris, França - Tabela 2), a fim de se determinar a afinidade dos espécimes brasileiros com as espécies descritas para a seção.

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

Espécie	Código	Local, coletor e data
1 - <i>Batrachospermum helminthosum</i>	CJ	SP: Campos do Jordão, Ducha da Prata, 22°44'17"S, 45°34'10"W; M. Paiano, 15.xii. 2009
2 - <i>Batrachospermum helminthosum</i>	Prb	SP: Paraibuna, Pousada Alto da Serra, Rio Negro, 23°33'48"W; 45°27'31"S; O. Necchi Jr., 03.ii.2006
3 - <i>Batrachospermum helminthosum</i>	RPe	PR: Guarapuava, Rio das Pedras, 25°15'00"W; 51°20'00"S; R. A. Krupek, 26.x.2008
4 - <i>Batrachospermum helminthosum</i>	SD4	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias; 26°27'21"S, 52°33'41"W, altitude 687m; C.C.Z. Branco, 14.viii.2007
5 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	Mar	PR: Guarapuava, Rio Lageado, Bacia do Rio Marrecas, 25°12'57,2"W; 51°21'18,6"S; R. A. Krupek, 26.iii.2007
6 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	ES8	ES: Domingos Martins, Pedra Azul, Rio Tucú (Braço Norte) Rod. 165, Km 137, 20°19'15,7"W; 0,41°02'41,3"S; O. Necchi Jr., 19.vii.2006
7 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	FLI7	PR: Teixeira Soares, Floresta Nacional de Irati, próximo do viveiro; 25°24'16"S, 50°35'28"W, altitude 727m; O. Necchi Jr. & C.C.Z. Branco, 21.vii.2005
8 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	FLI9	PR: Teixeira Soares, Floresta Nacional de Irati, 400 m estr. principal, linha da Copel 1; 25°23'07"S, 50°35'27"W, altitude 806m; O. Necchi Jr. & C.C.Z. Branco, 19.vii.2005
9 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	SD2	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias, rio Jacutinga; 26°28'08"S, 52°34'00"W, altitude 698m; C.C.Z. Branco, 14.viii.2007
10 - <i>Batrachospermum sirodotii</i>	SD8	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias; 26°28'48"S, 52°34'32"W, altitude 700m; C.C.Z. Branco, 15.viii.2007
11 - <i>Batrachospermum vogesiacum</i>	Brt	SP: Brotas, Parque dos Saltos; 22°17'30" S, 48°07'51W, D.C. Agostinho et al., 09.x.2012
12 - <i>Batrachospermum vogesiacum</i>	PAS2	RS: Cambará do Sul, Parque Nacional de Aparados da Serra, Arroio Camisas, 29°10'44,5"W; 50°08'13,2"S, altitude 939 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009
13 - <i>Batrachospermum vogesiacum</i>	PAS4	RS: Cambará do Sul, Parque Aparados da Serra, Arroio Perdizes; 29°09'29,4"W; 50°04'09,6"S, altitude 920 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009

Tabela 2. Relação dos espécimes-tipo de *Batrachospermum*, seção *Virescentia* do Herbário PC (coleção de Thuret).

Espécie	Tipo Nomenclatural	Código (PC, Thuret Collection)	Local	Coletor	Data
1. <i>B. helminthosum</i> Bory	holótipo	PC0591734	França, Fougères	S. Sirodot	13.viii.1882
2. <i>B. sirodotii</i> Skuja	lectótipo	PC0591725	França, Cheminel	S. Sirodot	01.ix.1880
3. <i>B. vogesiacum</i> T.G. Schultz	lectótipo	PC0591499	França, Logerie-Haute	S. Sirodot	01.viii.1880
4. <i>B. coeruleascens</i> Sirodot	holótipo	PC0591735	França, St. Germain	S. Sirodot	13.viii.1882
5. <i>B. bruziense</i> Sirodot	síntipo	PC0591732	França, Chatillou, Bruz	S. Sirodot	27.v.1882
6. <i>B. elegans</i> Sirodot	síntipo	PC0591733	França, Port Garnier	S. Sirodot	09.v.1869

2.1. Características ambientais

Durante as coletas de espécimes da seção *Virescentia*, as seguintes variáveis ambientais foram analisadas em cada segmento de rio/riacho amostrado: temperatura, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido e velocidade 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 utilizados em trabalho anterior (NECCHI et al., 1999)

2.2. Preservação

As amostras destinadas às análises moleculares foram inicialmente secas com papel toalha para redução da umidade. Em seguida a secagem foi feita em sílica-gel, com troca

por sílica seca após 24 horas, ou, em alguns casos, preservadas em etanol 100%. Após o acondicionamento em frascos devidamente marcados, 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

A análise morfológica foi feita para 11 das 13 amostras utilizadas neste estudo. O número de indivíduos disponível nas amostras de *B. helminthosum* Prb e RPe não foi suficiente para a análise morfológica devido à pequena quantidade coletada em campo. Sendo assim, optou-se por utilizar todo o material para as análises moleculares.

Adotou-se o parâmetro de 20 medições ou contagens para cada estrutura em cada amostra (NECCHI, 1990a). As análises foram realizadas com uso de microscópio estereoscópico binocular “Olympus SZH10” (Olympus America, Center Valley, PA, EUA) e microscópio óptico binocular “Olympus BH-2”, com uso de retículo micrometrado para as medições. As fotomicrografias foram feitas com uso de microscópio binocular “Leica DM1000”, equipado com sistema de análise de imagem Leica composto de: câmera de vídeo digital “Leica DFC 320” e software analisador de imagem LAS (“Leica Application Suite”).

Foram analisados os caracteres considerados como diagnósticos para o gênero *Batrachospermum*, e a seção *Virescentia* em particular, de acordo com a literatura relevante: abundância de fascículos secundários, disposição e número de células dos fascículos primários, origem, dimensões e número de células do ramo carpogonial, dimensões do carpogônio, forma do tricogínio, altura do carposporófito em relação ao raio do verticilo, dimensões dos carposporófitos e carposporângios, número de células dos filamentos gonimoblásticos (Fig. 1) (SIRODOT, 1884; MORI, 1975; NECCHI, 1990b;

SHEATH et al., 1994a; ENTWISLE & FOARD, 1997; KUMANO, 2002). Alguns caracteres de menor valor taxonômico também foram analisados para melhor caracterização das espécies: forma e dimensões dos verticilos, espermatângios e células proximais e distais dos fascículos primários (Fig. 1).

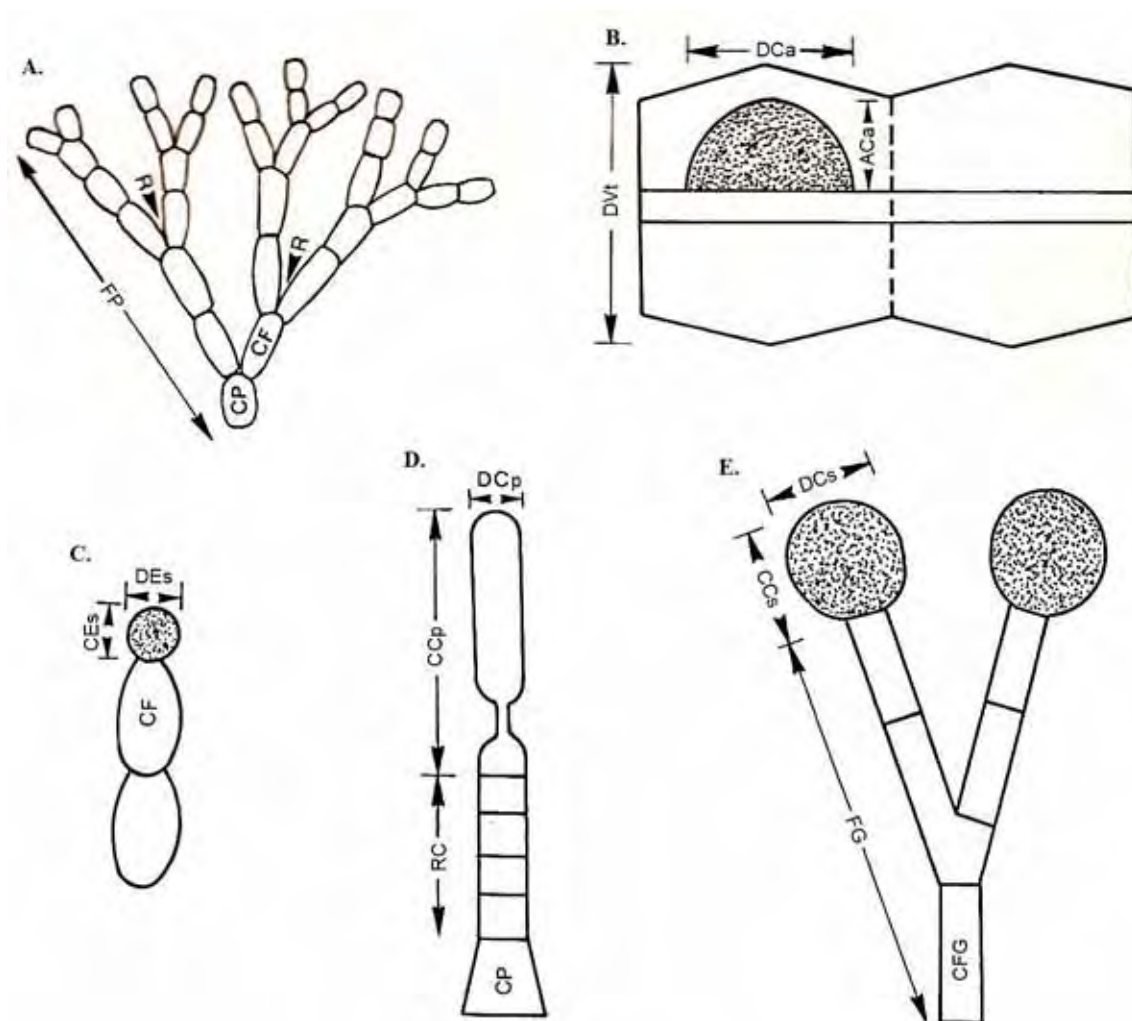


Fig. 1 – Representação esquemática dos caracteres morfológicos numéricos de *Batrachospermum*. **A)** Fascículo primário: CF – célula fascicular; CP – célula pericentral; FP – fascículo primário; R – ramificação; **B)** Verticilo: ACa – altura do carposporófito; DCa – diâmetro do carposporófito; DVt – diâmetro do verticilo; **C)** Espermatângio: CEs – comprimento do espermatângio; CF – célula fascicular; DEs – diâmetro do espermatângio; **D)** Carpogônio: CCp – comprimento do carpogônio; CP – célula pericentral; DCp – diâmetro do carpogônio; RC – ramo carpogonial; **E)** Carposporângio: CCs – comprimento do carposporângio; CFG – célula do filamento gonimoblástico; DCs – diâmetro do carposporângio; FG – filamento gonimoblástico. Adaptado de NECCHI (1990a).

2.4. Análises Moleculares

2.4.1. Extração de DNA

O DNA total (genômico) de cada amostra foi extraído após maceração das plantas gametofíticas em nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de pistilo (ambos previamente resfriados a -20°C) ou, alternativamente, a maceração também foi feita com uso do homogeneizador “Multi – Gen PRO 200” (PRO Scientific Inc., Oxford, E.U.A.). O material obtido por maceração foi submetido à extração com uso dos kits de extração de DNA “DNeasy plant mini kit®” (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e “Nucleo Spin plant II mini kit” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. 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 reações de PCR para os marcadores moleculares *rbcL* e *cox1* foram conduzidas utilizando os kits “GoTaq® Colorless Master Mix” (Promega, Madison, EUA), “puReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE HealthCare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) e “TopTaq® Master Mix” (Qiagen), todos para volume total de 25 µL. 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 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. As reações foram feitas em termocicladores “Techgene TC-312” e “TC-512” (Techne, Burlington, Reino Unido).

Os oligonucleotídeos iniciadores sintéticos 5' e 3' utilizados são descritos a seguir:

- **cox1**: GazF1 (5' TCAACAAATCATAAAGATATTGG -3') e GazR1 (5' ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA - 3') para amplificar um fragmento de 664 pb.

- **rbcL**: F160 (59-CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC-39) e rbcL R (59-ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC-39) para amplificar um fragmento 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).

- **rbcL** conforme VIS et al. (1998) – 95°C por 2 min (desnaturação inicial); 30 a 35 ciclos: 93°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min (anelamento dos “*primers*”); 72°C por 4 min (extensão); 72°C por 6 min (extensão final); 4°C (armazenamento).

2.4.3. Eletroforese em gel de agarose

Os géis (0,7%) foram preparados com a diluição de 70 mg de agarose em 100 ml da solução-tampão TBE: 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 realizadas sob voltagem de 60 V, com tempo de 60 minutos para *cox1* e *rbcL*. Utilizou-se marcador de tamanho “1 Kb DNA ladder”

(Invitrogen, Gaithersburg, E.U.A.). A qualidade do DNA amplificado por PCR foi feita por estimativas visuais por comparação com o marcador. Os géis foram corados com “GelRed®” (Biotium, Hayward, E.U.A.) e observados em fotodocumentador “Mini Bis Pro” e software “Gel Capture®” (Micro Photonics, Allentown, E.U.A.).

2.4.4. Purificação e quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com uso do kit “Wizard SV Clean-up System” (Promega) e “GFX® PCR” (GE Healthcare), 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.).

2.4.5. Sequenciamento e alinhamento

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático “ABI PRISM 310” (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) utilizando o kit “Big Dye Terminator”, versão 3.0 (Applied Biosystems). Os marcadores moleculares utilizados neste trabalho (*rbcL* e *cox1*) foram sequenciados em ambas as direções. Para sequenciamento das amostras de *rbcL* foram utilizados os seguintes primers internos conforme VIS et al. (1998): R472, R897, F650 e F1087.

As sequências obtidas foram carregadas diretamente no software “BioEdit” (HALL, 1999). A qualidade das sequências foi verificada através da checagem dos arquivos “*phd*”, gerados pelo programa “*Phred*” (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998), que analisa arquivos de sequenciamento e atribui valores de qualidade para cada base (numa escala de 0 a 60). Foram utilizadas apenas sequências com prevalência de valores de qualidade iguais ou superiores a 30. Sequências com baixa qualidade (prevalência de

valores ≤ 30) foram desconsideradas e o sequenciamento refeito. Quando a baixa qualidade persistia, novos produtos de PCR foram preparados para o sequenciamento. As sequências de cada amostra foram alinhadas individualmente para obter-se a sequência completa (consenso). Cada sequência consenso foi comparada com as disponíveis no “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa “BLAST” (ALTSCHUL et al., 1990), visando buscar a homologia entre as sequências geradas com aquelas já identificadas em outros trabalhos. Finalmente as sequências consenso de todas as amostras foram agrupadas em uma única matriz de dados.

2.5. Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software “PAUP 4.0b8” (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2003). Para análise baseada nas sequências de *rbcL* foi construída uma matriz de alinhamento com as sequências geradas neste estudo e as obtidas do “GenBank” (Tabela 3). As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (BA) (SCHNEIDER, 2003), utilizando como grupos externos sequências de espécies das seções do gênero *Batrachospermum*, entre elas as seções *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora*, *Setacea* e *Turfosa*, bem como outros gêneros de Batrachospermales (*Kumanoa*, *Sirodotia* e *Tuomeya*).

Para a análise das sequências de *rbcL* foram apresentadas duas árvores que são essencialmente idênticas, apenas que numa delas foram mostradas exclusivamente as sequências da seção *Virescentia*, permitindo uma melhor visualização da topologia da árvore dentro desse grupo. Para determinação dos sítios filogeneticamente informativos, a matriz de dados foi submetida à análise de máxima parcimônia (MP), também com uso do software “PAUP 4.0b8”.

Para a análise das sequências de *cox1* também foi gerada uma matriz de alinhamento com as sequências geradas neste estudo e outras obtidas do “GenBank” (Tabela 4). Foi construída uma árvore de distância (“neighbor joining”, SCHNEIDER, 2003) utilizando *B. gelatinosum* como grupo externo. Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados como valores de suporte de “bootstrap” com 1.000 réplicas de buscas heurísticas, gerando árvores de consenso com o critério de > 50% de semelhança nos ramos das árvores. Para definição do modelo mais apropriado de evolução do DNA (substituição nucleotídica) na construção das árvores filogenéticas utilizou-se o programa “Modeltest 3.0” (POSADA & CRANDALL, 1998). Todas as análises foram conduzidas com uso do pacote “MacIntosh Genetic Data Environment” (Mac GDE, Steven Smith) versão 2.4.

As análises de MV e BA com base nos dados de *rbcL* foram rodadas com uso do modelo de distância GTR (“General Time Reversible”) com os seguintes parâmetros: distribuição gama = 0,9046; proporção de sítios invariáveis = 0,5063; frequência de bases A = 0,3313, C = 0,1103, G = 0,2126, T = 0,3457; e matriz da taxa de substituição A-C = 7,9534, A-G = 6,6252, A-T = 3,6466, C-G = 2,7065, C-T = 45,6534, G-T = 1,0000. Para rodar as análises BA foi utilizado o software “MrBayes v.3.0b4” (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). Para estas análises foram definidos quatro cadeias de Markov e 1.000.000 de gerações, amostradas a cada 100 gerações, com probabilidades posteriores (PP) calculadas utilizando as 1.000 árvores finais.

Tabela 3. Sequências da seção *Virescentia* do gene *rbcL* obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises (Figuras 14 e 15).

Espécie	Acesso “GenBank”	Localidade¹	Referência
<i>B. helminthosum</i>	FJ386460	Brasil, SP, Maringá, Rio Pavão	Entwisle et al. (2009)
<i>B. helminthosum</i>	AF244109	E.U.A., MI, Spring Brook	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244110	E.U.A., MI, Flemming Creek	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244111	E.U.A., OH, Big Run	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244113	E.U.A., CT, Mill Brook	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244114	E.U.A., LA, Unnamed stream	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244115	E.U.A., MA, Poquoy Brook	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244116	E.U.A., CT, Cedar Fork	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244117	E.U.A., TN, Scarboro Creek	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244118	E.U.A., IN, Otter Creek	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244119	E.U.A., RI, Wood River Trib.	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF244120	E.U.A., OH, Five Mile Creek	Vis et al. (2001)
<i>B. helminthosum</i>	AF029142	E.U.A., RI, Chipuxet River	Vis et al. (1998)
<i>B. helminthosum</i>	AY198417	E.U.A., OH, Yellow Springs	Chiasson et al. (2003)
<i>B. helminthosum</i>	AB114642	Japão, Kagoshima, Oguchi	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. helminthosum</i>	AB114643	Japão, Kyoto, Tanba	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. helminthosum</i>	AB114644	Japão, Ehime, Komatsu	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. helminthosum</i>	AB114645	Japão, Iwate, Takizawa	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. helminthosum</i>	AB114646	Japão, Okinawa, Nago	Hanyuda et al. (2004)

¹ CT = Connecticut, IN = Indiana, LA = Louisiana, MA = Massachusetts, MI = Michigan, NC = North Carolina, OH = Ohio, RI = Rhode Island, SP = São Paulo, TN = Tennessee

Tabela 4. Sequências da seção *Virescentia* do marcador *cox1* obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises (Figura 16).

Espécie	Acesso “GenBank”	Localidade¹	Referência
<i>B. helminthosum</i>	EU073835	E.U.A., VA, Carvin Creek	House et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU073841	E.U.A., OH, Sunfish Creek	House et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU073846	E.U.A., TN, Scarboro Creek	House et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU073847	E.U.A., MI, Spring Brook	House et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU073848	E.U.A., OH, Browning Creek	House et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU636733	E.U.A., OH, Big Run	Sherwood et al. (2008)
<i>B. helminthosum</i>	EU636736	E.U.A., OH, Five Mile Creek	Sherwood et al. (2008)

¹ MI = Michigan, OH = Ohio, TN = Tennessee, VA = Virginia.

3. Resultados

3.1. Variáveis ambientais

As variáveis ambientais foram obtidas para 12 dos 13 pontos de coleta (Tabela 5). Os espécimes foram coletados em riachos com águas ligeiramente ácidas a neutras (pH $6,4 \pm 0,4$, média \pm desvio-padrão), temperaturas moderadas a relativamente elevadas ($15,3 \pm 3,6$ °C), baixa concentração iônica (condutividade $25 \pm 11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), alta a moderada oxigenação (oxigênio dissolvido $7,3 \pm 1,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e correnteza rápida a moderada (velocidade $39 \pm 27 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Os espécimes foram encontrados em quatro biomas distintos no Brasil: floresta ombrófila mista, floresta ombrófila densa, cerrado e campos, mas predominantemente no primeiro (Tabela 5).

Tabela 5. Condições ambientais e biomas em cada ponto amostrado. Foram analisados o pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e velocidade média da correnteza. Códigos das amostras conforme Tabela 1.

Amostra	pH	Temperatura (°C)	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Velocidade correnteza* ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	Bioma**
<i>B. helminthosum</i> Prb	6,2	18,3	5	9,1	40	FOD
<i>B. helminthosum</i> RPe	6,1	10,1	19	8,5	14	FOM
<i>B. helminthosum</i> SD4	6,7	19,4	38	6,8	29	FOM
<i>B. sirodotii</i> Mar	6,7	14,5	28	7,5	34	FOM
<i>B. sirodotii</i> ES8	6,7	16,3	27	8,3	118	FOD
<i>B. sirodotii</i> FLI7	6,7	12,0	17	6,4	56	FOM
<i>B. sirodotii</i> FLI9	6,8	13,8	39	6,8	30	FOM
<i>B. sirodotii</i> SD2	6,4	16,1	37	6,4	20	FOM
<i>B. sirodotii</i> SD8	6,2	17,1	37	5,6	44	FOM
<i>B. vogesiacum</i> BRT	6,8	22,4	14	8,1	31	CER
<i>B. vogesiacum</i> PAS2	5,6	12,2	20	6,5	40	CAM
<i>B. vogesiacum</i> PAS4	6,3	11,6	16	7,9	15	CAM

* Média (n = 5)

** CAM: Campos, CER: Cerrado, FOD: Floresta Ombrófila Densa, FOM: Floresta Ombrófila Mista.

3.2. Análises morfológicas

Com base nas características diagnósticas aplicadas para separação das espécies da seção *Virescentia* do Brasil (número de células do fascículo primário e abundância de fascículos secundários), as amostras de *B. helminthosum* analisadas neste trabalho apresentaram fascículos primários com 9-14 células (média $11,3 \pm 0,7$) em plantas masculinas e 10-13 células (média $11,2 \pm 1,1$) em plantas femininas e fascículos secundários mais ou menos numerosos, dispostos até a metade do internó em plantas masculinas e sobre todo internó em plantas femininas (Tabelas 6 e 7; Figuras 2 e 5). Para o espécime-tipo de *B. helminthosum* observou-se fascículos primários com 10-12(-15) células e poucos fascículos secundários, somente próximos ao nó (Tabelas 6 e 7). Para as amostras brasileiras de *B. sirodotii* foi observado fascículos primários com 8-14 células (média $11,4 \pm 0,8$) em plantas masculinas e 8-13 células (média $10,1 \pm 0,9$) em plantas femininas ou monóicas, fascículos secundários variando de poucos a mais ou menos numerosos e próximos ao nó (Tabelas 6 e 7; Figura 3 e 6). O espécime-tipo de *B. sirodotii* apresentou 9-12(-15) células nos fascículos primários e fascículos secundários pouco numerosos dispostos até $\frac{1}{2}$ do internó (Tabelas 6 e 7). Para as amostras brasileiras de *B. vogesiacum* foi observado fascículos primários com 8-10 células (média $8,7 \pm 0,8$) em plantas masculinas e 8-14 células (média $10 \pm 0,9$) em plantas femininas e fascículos secundários variando de poucos e esparsos em plantas masculinas a numerosos sobre $\frac{2}{3}$ a todo internó nas femininas (Tabelas 6 e 7; Figuras 4 e 7). Para o espécime-tipo de *B. vogesiacum* observou-se fascículos primários com 9-14 células e fascículos secundários numerosos sobre todo ou $\frac{2}{3}$ do internó (Tabelas 6 e 7). Tanto para as amostras brasileiras quanto para os espécimes-tipo notou-se variação contínua e não foi possível observar uma disjunção clara das características diagnósticas que permitisse a distinção entre *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*, com sobreposição relativamente alta.

Tabela 6. Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* das amostras do Brasil, dos tipos-nomenclaturais e reportadas em trabalhos relevantes (dimensões em μm). Códigos das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). CI: cilíndricas; DO: doliforme; EL: elípticas; ES: esférico; NU: numerosos; OBv: obovóide; PI: piriforme; PO: poucos.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fasc. 1 ^{artio} (n° céls.)	Tam. e Forma Céls. Fasc. 1 ^{artio}		Fasc. 2 ^{artio}
					proximais	distais	
<i>B. helminthosum</i> CJ	dioico ♂ e ♀	DO, ES	480-800 (640±99,5)	10-13 ♀ (11,2±1,1) 9-14 ♂ (11±0,7)	CI 36-50 x 4-8 (42,7±4,8 x 6,1±1,4)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,2±1,4 x 5,2±0,9)	NU - todo internó ♂ ±NU - ½ internó ♀
<i>B. helminthosum</i> SD4	dioico ♂	ES	620-800 (735,2±52,9)	11-13 (11,5±0,7)	CI 36-46 x 6-8 (40,8±3,2 x 6,3±0,8)	OBv, EL 10-16 x 4-6 (12,2±0,9 x 4,6±0,9)	±NU - ½ internó
<i>B. sirodotii</i> ES8	dioico ♂ e ♀ monoico	DO, ES	720-1080 (883±110,9)	8-11 ♀ (9,2±1,1) 10-14 ♂ (11,7±0,9)	CI 42-66 x 6-10 (56,7±7,4 x 7,4±1,5)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,6±1,6 x 5,9±0,5)	PO a ± NU - ½ internó ou próximos ao nó
<i>B. sirodotii</i> FLI7	dioico ♂	DO, ES, PI	580-820 (720,5±71,7)	8-11 (9,9±1)	CI 36-56 x 4-8; CI (48,6±5 x 5,9±1,6)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,1±1,5 x 5,3±1)	PO - próximos ao nó
<i>B. sirodotii</i> FLI9	dioico ♀	DO, ES	440-840 (617±115,8)	9-11 (10,1±0,9)	CI 36-52 x 4-8 (44,9±4 x 5,9±1,4)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,3±1,2 x 5,3±1)	PO - próximos ao nó
<i>B. sirodotii</i> Mar	dioico ♀	ES, PI	280-740 (440±165,9)	9-12 (9,8±1,1)	CI 28-48 x 4-6 (34,9±5,9 x 5,1±1)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (11,6±1,7 x 4,4±0,7)	PO a ± NU - próximos ao nó
<i>B. sirodotii</i> SD2	dioico ♀	DO, ES	540-920 (733±115,2)	10-13 (11,2±0,9)	CI 34-44 x 4-8 (40±3,5 x 6,2±1,1)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,6±1,3 x 5,4±0,8)	PO - próximos ao nó
<i>B. sirodotii</i> SD8	dioico ♂ e ♀	ES	560-820 (678,7±90,6)	9-11 ♀ (9,7±0,7) 8-10 (9,2±0,6) ♂	CI 34-44 x 4-8 (38,7±3,1 x 6,5±1,6)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,2±1,4 x 5±0,9)	PO a ± NU - próximos ao nó a ½ internó ♂ PO - esparsos ♀
<i>B. vogesiacum</i> Brt	dioico ♀	DO, ES	400-720 (555±109,6)	9-14 (11,1±1)	CI 30-44 x 4-6 (35,1±4,3 x 4,3±0,8)	OBv, EL 10-14 x 4-8 (11,6±1,2 x 5,8±1,7)	NU - todo internó
<i>B. vogesiacum</i> PAS2	dioico ♂ e ♀	DO, ES, OBc	580-680 ♀ (724±103,6) 760-1020 ♂ (885,6±95,5)	8-12 ♀ (9,5±1,2) 8-10 ♂ (8,7±0,8)	CI 36-46 x 6-8 ♀ (41,2±3 x 7,2±1) 40-58 x 6-8 ♂ (45,8±6,6 x 6,8±1)	OBv, EL 10-14 x 4-6 ♀ (12,6±1,3 x 4,4±0,8) 10-14 x 4-6 ♂ (13,2±2 x 5,4±1)	PO - esparsos ♂ NU - todo internó ♀

Tabela 6. Continuação.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fasc. 1 ^{ários} (n° céls.)	Tam. e Forma Céls. Fasc. 1 ^{ário}		Fasc. 2 ^{ários}
					proximais	distais	
<i>B. vogesiacum</i> PAS4	dióico ♀	DO, ES, OBC	400-700 (520±72,2)	8-11 (9,5±0,7)	CI 24-32 x 4-6 (27,8±1,9 x 4,5±0,8)	OBv, EL 10-14 x 4-6 (12,5±1,6 x 4,7±0,8)	NU - 2/3 a todo internó
Tipos nomenclaturais							
<i>B. helminthosum</i> (holótipo)	monóico	ES, DO	---	10-12(-15)	CI, EL	OBv, EL	PO, 1/2 do verticilo
<i>B. sirodotii</i> (lectótipo)	monóico e dióico	ES, DO	---	9-12(-15)	CI	OBv, EL	PO, 1/2 do verticilo
<i>B. vogesiacum</i> (lectótipo)	monóico	PI, OBC	---	9-14	CI	OBv, EL	NU, todo ou 2/3 internó
<i>B. coerulescens</i> (holótipo)	dióico	ES, DO	---	9-14	CI	OBv, EL	NU, todo ou 2/3 internó
<i>B. bruziense</i> (síntipo)	dióico	ES, DO	---	10-18	CI	OBv, EL	---
<i>B. elegans</i> (síntipo)	dióico	DO	---	9-12(-14)	CI	OBv, EL	PO, esparsos, próximos ao nó
Trabalhos anteriores							
<i>B. helminthosum</i> (NECCHI, 1990b)	dióico ou polióico	DO, ES, OBC	500-1000	10-15 ♂ 12-18(-20) ♀	CI, EL 30-75 x 3-12,5	EL, OBv 8-20 x 3-10,5	NU, 2/3 a todo internó ♂ NU, 1/2 internó ou próximo ao nó ♀
<i>B. sirodotii</i> (NECCHI, 1990b)	dióico ou monóico	DO, ES, OBC	400-1100	6-10 ♂ 8-12 ♀	CI, EL 20-65 x 4-15	EL, OBv, PI 7-25 x 4,5-8,5	PO, próximos ao nó
<i>B. vogesiacum</i> (NECCHI, 1990b)	dióico ou monóico	DO, PI	500-900	6-10 ♂ 8-12 ♀	CI, EL 40-90 x 4-8	EL, PI 11-20 x 5-10	PO, esparsos ♂ NU, todo internó ♀
<i>B. helminthosum</i> (SHEATH et al., 1994)	monóico	DO	306-900 (585)	7-21 (12,3)	---	---	PO

Tabela 7. Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* das amostras do Brasil, dos tipos-nomenclaturais e reportadas em trabalhos relevantes. Códigos das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). OBv: obovóide; PI: piriforme.

Amostra	Carporgônio (comp. x larg.)	Carporófito (larg. x alt.)	Carposporângio		No. células filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio (diâmetro)
			dimensões	forma		
<i>B. helminthosum</i> CJ	48-74 x 8-12 (61,6 \pm 8 x 8,6 \pm 1,1)	300-520 x 140-240 (370,6 \pm 57,5 x 187,6 \pm 29,1)	20-26 x 10-16 (22,5 \pm 2,1 x 13,5 \pm 1,4)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	4-6
<i>B. helminthosum</i> SD4	---	---	---	---	---	4-6 (5,4 \pm 0,9)
<i>B. sirodotii</i> ES8	62-102 x 8-12 (81,7 \pm 11,5 x 10,8 \pm 1,3)	---	---	---	---	5-7 (6,05 \pm 0,5)
<i>B. sirodotii</i> FLI7	---	---	---	---	---	4-6 (5,1 \pm 0,9)
<i>B. sirodotii</i> FLI9	---	200-300 x 100-160 (240 \pm 29,7 x 131 \pm 22,9)	20-24 x 12-16 (22 \pm 1,4 x 13,6 \pm 1,4)	OBv, PI	4-5 (4,4 \pm 0,5)	---
<i>B. sirodotii</i> Mar	36-78 x 8-10 (55,7 \pm 16,8 x 9,1 \pm 1)	140-320 x 110-160 (232,5 \pm 70,9 x 121,3 \pm 25,3)	22-28 x 12-18 (24,7 \pm 1,5 x 14,2 \pm 1,3)	OBv, PI	4-5 (4,4 \pm 0,5)	---
<i>B. sirodotii</i> SD2	56-84 x 8-10 (67,6 \pm 6,8 x 8,6 \pm 0,9)	200-290 x 100-150 (240,2 \pm 23,4 x 138,2 \pm 16,1)	18-28 x 12-16 (23,6 \pm 2,4 x 13,9 \pm 1,4)	OBv, PI	3-5 (4,2 \pm 0,7)	---
<i>B. sirodotii</i> SD8	58-110 x 8-10 (71,7 \pm 13,3 x 8,6 \pm 1)	240-440 x 120-220 (293 \pm 56,7 x 153 \pm 30,6)	20-26 x 14-16 (23,3 \pm 2,1 x 14,7 \pm 1)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	4-6 (5 \pm 0,9)
<i>B. vogesiacum</i> Brt	68-86 x 8-10 (77,2 \pm 6,3 x 8,4 \pm 0,8)	240-380 x 120-240 (290 \pm 36,6 x 144,3 \pm 30,6)	20-30 x 14-16 (24,5 \pm 2,3 x 14,9 \pm 1)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	---
<i>B. vogesiacum</i> PAS2	---	340-480 x 160-240 (412 \pm 41,8 x 193 \pm 22,7)	20-26 x 10-14 (21,9 \pm 1,9 x 11,5 \pm 1,3)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	6
<i>B. vogesiacum</i> PAS4	54-74 x 6-10 (62 \pm 7 x 8,1 \pm 0,9)	260-360 x 100-180 (296,2 \pm 33,2 x 141,5 \pm 26,4)	18-24 x 10-16 (20,8 \pm 1,8 x 12,2 \pm 1,6)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	---
Tipos Nomenclaturais						
<i>B. helminthosum</i> (holótipo)	---	148-229 x 70-129 (168,3 \pm 35,4 x 94,6 \pm 26,8)	11,4-14,1 x 7-9,1 (12,6 \pm 0,8 x 7,8 \pm 0,7)	OBv	---	---

Tabela 7. Continuação.

Amostra	Carpoônio (comp. x larg.)	Carposporófito (larg. x alt.)	Carpospor-ângio		No. células filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio (diâmetro)
			dimensões	forma		
<i>B. sirodotii</i> (lectótipo)	---	165-230 x 90,5-122 (194±25,3 x 101,5±12,2)	13-16,4 x 7,7-9,5 (14,9±1,1 x 8,5±0,7)	OBv	---	4,5-6
<i>B. vogesiacum</i> (lectótipo)	23,8-36,7 x 5-7 (28,1±3,8 x 6,1±0,7)	180-315 x 95-175 (226,9±48,4 x 125,9±29,1)	9,5-12,9 x 6,6-8,7 (10,7±1,1 x 7,7±0,6)	OBv	---	---
<i>B. coerulescens</i> (holótipo)	26,5-36,3 x --- (30,2±3,8 x ---)	---	9,5-12,5 x 7,5-9	OBv	---	---
<i>B. bruziense</i> (síntipo)	25,1-35,5 x ---	---	---	---	---	---
<i>B. elegans</i> (síntipo)	---	---	---	---	---	---
Trabalhos anteriores						
<i>B. helminthosum</i> (NECCHI, 1990b)	40-110 x 9-13	200-450 x 110-250	17-31 x 10-23	OBv, PI, EL	3-5	5-8,5
<i>B. sirodotii</i> (NECCHI, 1990b)	45-100 x 6-10	200-550 x 100-300	19-35 x 11-24	OBv, PI	3-5	5-9
<i>B. vogesiacum</i> (NECCHI, 1990b)	50-85 x 6-8	200-500 x 100-250	20-30 x 12,5-18	OBv	3-6	6-7
<i>B. helminthosum</i> (SHEATH et al., 1994)	40,2-69 x 4,8-13,7 (54,4 x 6,9)	120-415 x 102-420 (216 x 202)	9,8-27,6 x 5,3-16,9 (17,9 x 9)	OBv	1-8 (4,1)	---

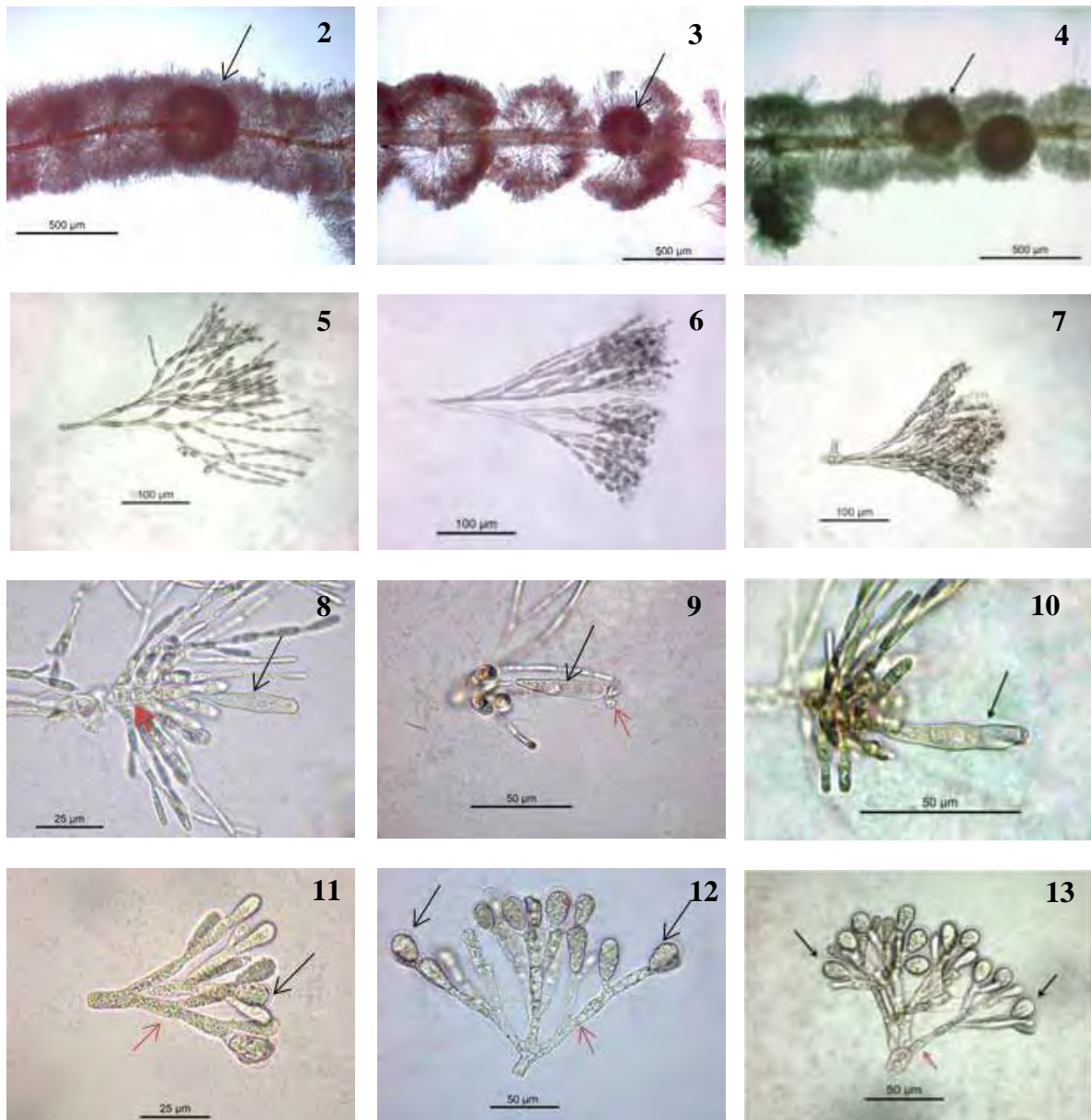


Figura 2. Verticilos e carposporófito (seta) de *B. helminthosum* (amostra CJ).

Figura 3. Verticilos e carposporófito (seta) de *B. sirodotii* (amostra SD8).

Figura 4. Verticilos e carposporófitos (seta) de *B. vogesiacum* (amostra PAS2).

Figura 5. Fascículo primário de *B. helminthosum* (amostra CJ).

Figura 6. Fascículo primário de *B. sirodotii* (amostra SD8).

Figura 7. Fascículo primário de *B. vogesiacum* (amostra PAS2).

Figura 8. Carpogônio de *B. helminthosum* (amostra CJ) com um tricogínio bem desenvolvido (seta preta) e ramo carpogonial com três células (seta vermelha).

Figura 9. Carpogônio de *B. sirodotii* (amostra SD8) com um tricogínio bem desenvolvido (seta preta) e dois espermácios aderidos (seta vermelha).

Figura 10. Carpogônio de *B. vogesiacum* (amostra PAS2) com um tricogínio bem desenvolvido (seta preta).

Figura 11. Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha) de *B. helminthosum* (amostra CJ).

Figura 12. Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha) de *B. sirodotii* (amostra SD8).

Figura 13. Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha) de *B. vogesiacum* (amostra PAS2).

3.4. Análises moleculares

Neste trabalho foi gerado, conjuntamente, um total de 23 sequências dos dois marcadores moleculares utilizados. Sequências parciais (1.282 pb) do gene *rbcL* foram obtidas para 11 das 13 amostras estudadas. Não foi possível obter produtos de PCR para as amostras “*B. helminthosum* SD4” e “*B. sirodotii* Mar” após inúmeras tentativas. A região de “barcode” do gene *cox1* (664 pb) foi completamente sequenciada para 12 das 13 amostras analisadas, não sendo possível obter produto de PCR para a amostra “*B. vogesiacum* Brt”.

3.4.1. Análises das sequências de *rbcL*

Dentre as sequências de *rbcL* geradas neste estudo, pode-se observar que as amostras de *B. helminthosum* apresentaram uma variação de 1 a 2 pb (0,1–0,2%) enquanto que as de *B. sirodotii* variaram de 1 a 8 pb (0,1–0,7%) e as de *B. vogesiacum* de 2 a 6 pb (0,2–0,5%) (Tabela 8). Entre as sequências de *B. helminthosum* e *B. sirodotii* pode-se observar uma divergência de 0 a 7 pb (0–0,6%), do mesmo modo, *B. helminthosum* e *B. vogesiacum* divergiram em 0 a 7 pb (0–0,6%) e entre *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* a divergência foi de 0 a 12 pb (0–1,0%). A divergência entre as sequências geradas neste estudo foram muito baixas, com ampla sobreposição entre os limites de variação interespecífica (0 a 12 pb, 0–1,0%) com os de variação intraespecífica. Dessa maneira, as sequências das amostras de *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* serão tomadas conjuntamente como uma única entidade taxonômica para comparação com as demais sequências obtidas do “GenBank”.

Para as sequências de *B. helminthosum* dos Estados Unidos da América (E.U.A.) observou-se uma variação de 0 a 30 pb (0–2,4%) e as sequências do Japão apresentaram uma variação de 2 a 41 pb (0,2–3,2%). Comparando-se as sequências brasileiras com as

americanas a diferença foi de 35 a 57 pb (2,8–4,5%), enquanto que entre as sequências do Brasil e do Japão a variação foi de 24 a 53 pb (1,9–4,2%). Os limites de divergência entre as sequências americanas e japonesas foram de 29 a 66 pb (2,3–5,2%) (Tabela 8).

A árvore de consenso (MV) mostrou a seção *Virescentia* como um grupo monofilético com alto suporte de bootstrap (BS > 95%) e de probabilidade posterior (PP > 0,95) (Figura 14). As seções *Aristata* e *Macrospora* foram evidenciadas como grupos irmãos da seção *Virescentia*, indicando a maior proximidade filogenética entre esses três grupos. A análise de MP revelou que dos 1.282 sítios, 808 foram constantes, 364 informativos e 110 não informativos. O clado da seção *Virescentia* apresentou três cladogramas menores, cada um abrangendo espécimes de distintas regiões geográficas (Figura 15): 1) sequências do Brasil, incluindo todas as sequências geradas neste trabalho e mais uma publicada anteriormente, também proveniente de uma amostra coletada no Brasil (*B. helminthosum* FJ386460); 2) sequências dos E.U.A.; 3) sequências do Japão. Os três cladogramas referentes às sequências brasileiras, americanas e japonesas apresentaram alto suporte de bootstrap (BS > 95%) e probabilidade posterior (PP > 0,95). Dentro do clado com sequências do Brasil, não houve divergência que permitisse a separação entre as amostras de *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*, ficando misturadas entre si. Notou-se apenas tendência de amostras coletadas em áreas muito próximas posicionarem-se juntas na árvore, p.ex. PAS2 e PAS4, FLI7 e FLI9 (Tabela 1, Figura 15).

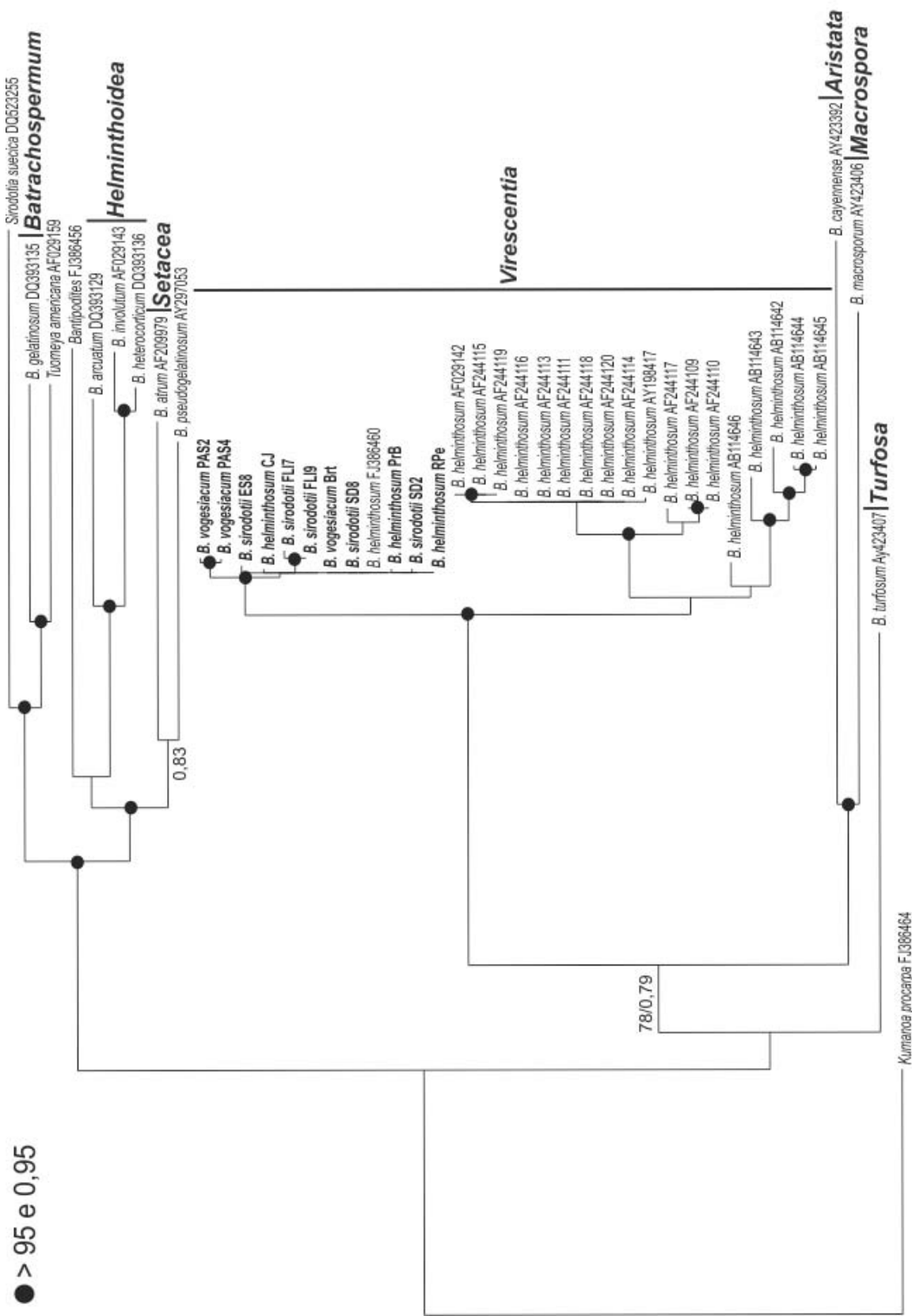


Figura 14: Árvore filogenética (máxima verossimilhança, $-\ln L = 7606,5674$) gerada com base nas seqüências do gene *rbcL*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 70$ BS ou $PP \leq 0,70$.

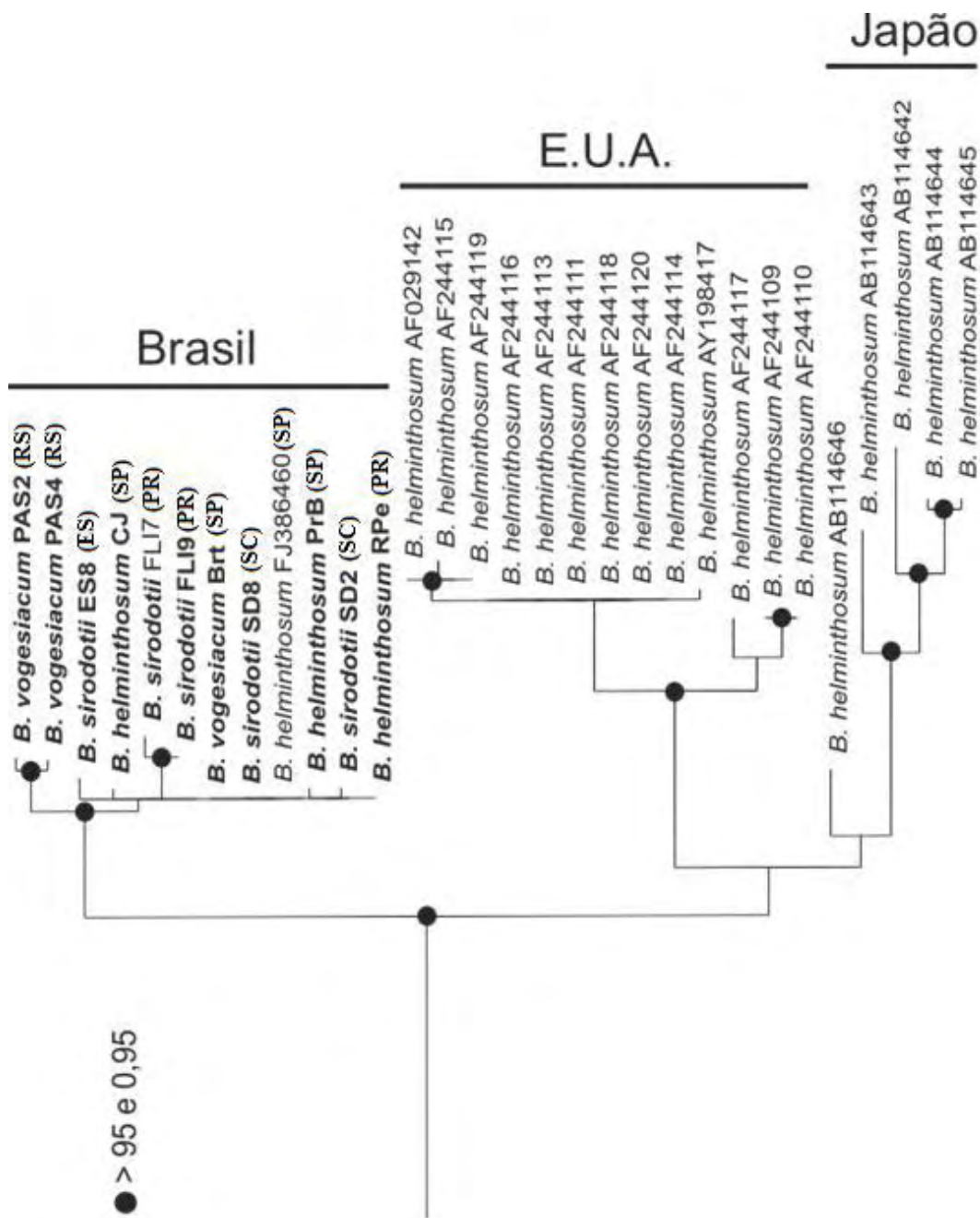


Figura 15: Árvore filogenética (máxima verossimilhança, $-\ln L = 7606,5674$) (idem a Figura 14) gerada com base nas seqüências do gene *rbcl*, destacando a seção *Virescentia* com três cladogramas principais contendo seqüências do Brasil, E.U.A. e Japão, respectivamente. Os números associados aos nós indicam os valores de "bootstrap" (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 70$ BS ou $PP \leq 0,70$. Nas amostras do Brasil foram incluídas as siglas dos estados após os códigos das amostras. ES: Espírito Santo; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo.

3.4.2. Análises das sequências de *cox1*

Dentre as 12 sequências geradas para *cox1*, as amostras de *B. helminthosum* apresentaram uma variação de 4 a 13 pb (0,7–2,0%), enquanto que as amostras de *B. sirodotii* variaram de 4 a 19 pb (0,7–2,9%) e as de *B. vogesiacum* de 2 a 17 pb (0,3–2,6%) (Tabela 9). Entre as sequências de *B. helminthosum* e *B. sirodotii* pode-se observar uma divergência de 9 a 18 pb (1,4–2,8%), entre *B. helminthosum* e *B. vogesiacum* uma divergência de 7 a 17 pb (1,1–2,6%) e entre *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* de 10 a 19 pb (1,6–2,9%). Não se observou, portanto, disjunção entre os limites de divergência interespecíficas (2 a 19 pb, 0,3–2,9%) e intraespecífica das sequências que permitisse a separação das três espécies, que serão consideradas como uma entidade taxonômica para efeitos de comparação. A variação entre as sequências dos E.U.A. a foi de 1 a 45 pb (0,2–6,8%). Comparando-se as sequências brasileiras e americanas constatou-se uma variação de 48 a 69 pb (7,3–10,4%).

O grupo formado pelas amostras da seção *Virescentia* apresentou dois subgrupos com alto suporte (bootstrap > 95% e PP > 0,95) (Figura 16): 1) amostras do Brasil, incluindo todas as geradas neste trabalho; 2) amostras dos E.U.A. Assim como para o *rbcL*, as sequências brasileiras apresentaram-se misturadas entre si e houve apenas uma tendência de amostras coletadas em áreas muito próximas posicionarem-se juntas na árvore, p.ex. PAS2 e PAS4, FLI7 e FLI9, (Tabela 1, Figura 16). As análises baseadas nas sequências de *cox1* são essencialmente congruentes com as análises de *rbcL*.

Tabela 9. Porcentagem de divergência (na porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as sequências do *cox1* de espécimes da seção *Virescentia* do Brasil e dos Estados Unidos*. As sequências geradas neste estudo estão em negrito (códigos conforme Tabela 1) e as obtidas do “GenBank” estão identificadas pelo código de acesso (Tabela 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	Sequências																			
1. <i>B. helminthosum</i> CJ	–	13	7	4	14	10	12	9	13	14	10	12	61	58	53	53	54	62	60	
2. <i>B. helminthosum</i> PrB	2,0	–	10	13	10	12	12	18	11	17	14	13	68	65	58	58	59	69	67	
3. <i>B. helminthosum</i> RPe	1,1	1,6	–	7	11	13	13	12	12	7	10	10	64	61	54	54	55	65	63	
4. <i>B. helminthosum</i> SD4	0,7	2,0	1,1	–	12	14	14	9	15	12	12	12	63	60	53	53	54	64	62	
5. <i>B. sirodotii</i> ES8	2,2	1,6	1,7	1,9	–	12	12	19	11	16	15	13	65	62	51	53	54	66	64	
6. <i>B. sirodotii</i> FLI7	1,6	1,9	2,0	2,2	1,9	–	4	19	9	18	12	12	65	62	57	59	60	66	64	
7. <i>B. sirodotii</i> FLI9	1,9	1,9	2,0	2,2	1,9	0,7	–	19	11	18	12	12	67	64	55	59	60	68	66	
8. <i>B. sirodotii</i> SD2	1,4	2,8	1,9	1,4	2,9	2,9	2,9	–	18	17	17	17	58	55	48	48	49	59	57	
9. <i>B. sirodotii</i> SD8	2,0	1,7	1,9	2,3	1,7	1,4	1,7	2,8	–	19	12	10	62	59	58	58	59	63	61	
10. <i>B. vogesiaticum</i> Mar	2,2	2,6	1,1	1,9	2,5	2,8	2,8	2,6	2,9	–	17	17	65	62	53	55	56	66	64	
11. <i>B. vogesiaticum</i> PAS2	1,6	2,2	1,6	1,9	2,3	1,9	1,9	2,6	1,9	2,6	–	2	58	57	52	52	53	59	59	
12. <i>B. vogesiaticum</i> PAS4	1,9	2,0	1,6	1,9	2,0	1,9	1,9	2,6	1,6	2,6	0,3	–	60	59	54	54	55	61	61	
13. <i>B. helminthosum</i> EU073835*	9,2	10,3	9,7	9,5	9,8	9,8	10,1	8,8	9,4	9,8	8,8	9,1	–	7	39	43	44	1	5	
14. <i>B. helminthosum</i> EU073841*	8,8	9,8	9,2	9,1	9,4	9,4	9,7	8,3	8,9	9,4	8,6	8,9	1,1	–	36	40	41	6	2	
15. <i>B. helminthosum</i> EU073846*	8,0	8,8	8,2	8,0	7,7	8,6	8,3	7,3	8,8	8,0	7,9	8,2	5,9	5,5	–	27	28	40	38	
16. <i>B. helminthosum</i> EU073847*	8,0	8,8	8,2	8,0	8,0	8,9	8,9	7,3	8,8	8,3	7,9	8,2	6,5	6,1	4,1	–	1	44	42	
17. <i>B. helminthosum</i> EU073848*	8,2	8,9	8,3	8,2	8,2	9,1	9,1	7,4	8,9	8,5	8,0	8,3	6,7	6,2	4,3	0,2	–	45	43	
18. <i>B. helminthosum</i> EU636733*	9,4	10,4	9,8	9,7	10,0	10,0	10,3	8,9	9,5	10,0	8,9	9,2	0,2	1,0	6,1	6,7	6,8	–	4	
19. <i>B. helminthosum</i> EU636736*	9,1	10,1	9,5	9,4	9,7	9,7	10,0	8,6	9,2	9,7	8,9	9,2	0,8	0,4	5,8	6,4	6,5	0,7	–	

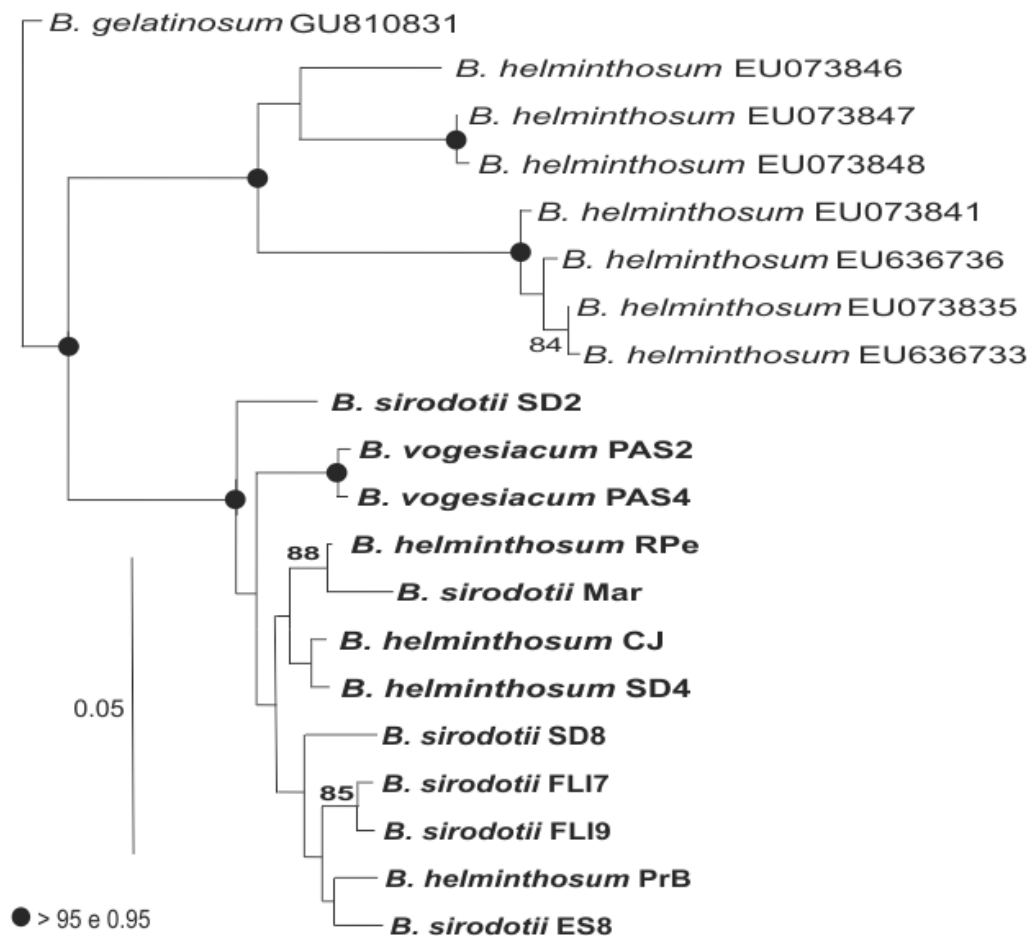


Figura 16: Árvore de distância (“neighbor joining”) gerada com base nas sequências da região de “barcode” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”.

4. Discussão

Existem relativamente poucos dados ambientais publicados, em âmbito mundial, sobre a ocorrência de espécies da seção *Virescentia*. Os valores encontrados para as variáveis ambientais medidas das populações brasileiras foram semelhantes aos reportados por Sheath (1984) para rodófitas em geral, assim como para populações de *B. helminthosum* dos E.U.A. (SHEATH et al., 1994a), da Finlândia (ELORANTA & KWANDRANS, 1996) e para populações de *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* do Brasil (NECCHI et al., 1999). A ocorrência sob determinadas condições ambientais, particularmente em águas com baixa concentração de nutrientes e bem oxigenadas, estão

geralmente associadas a condições oligotróficas e oligossapróbicas (SHEATH, 1984) e sugerem sua utilização como bioindicadores de rios/riachos de boa qualidade.

As dimensões dos carpogônios, carposporófitos e carposporângios das amostras do Brasil ($\geq 40 \mu\text{m}$ de comprimento; $\geq 200 \mu\text{m}$ de largura e $\geq 100 \mu\text{m}$ de altura; $\geq 19 \mu\text{m}$ de comprimento e $\geq 10 \mu\text{m}$ de largura, respectivamente) (Tabelas 6 e 7, Figuras 2 a 13) foram consideravelmente superiores às observadas para os espécimes-tipo ($\leq 37 \mu\text{m}$; $\leq 230 \mu\text{m} \times \leq 130 \mu\text{m}$; $\leq 16,5 \mu\text{m} \times \leq 9,5 \mu\text{m}$, respectivamente) (Tabelas 6 e 7). Os valores observados para as amostras brasileiras situaram-se dentro dos limites reportados por Necchi (1990b). Sheath et al. (1994a) observaram uma amplitude extremamente alta para a maioria desses caracteres nas amostras dos Estados Unidos identificadas como *B. helminthosum*. Os limites de variação reportados abrangem todo o espectro observado para os espécimes do Brasil e para os espécimes-tipo. No entanto, as dimensões dos carpogônios dos espécimes-tipos também foram consideravelmente inferiores às relatadas para os espécimes dos Estados Unidos (Tabelas 6 e 7).

A divergência morfológica observada em importantes caracteres taxonômicos (dimensões dos carpogônios, carposporófitos e carposporângios) nos espécimes-tipo, em comparação com os espécimes deste estudo e com os analisados nos trabalhos revisionários de Necchi (1990b) e Sheath et al. (1994a), indica que se tratam de espécies distintas e podem ser reconhecidas pelo menos três com nítida repartição biogeográfica: Brasil, E.U.A. e Europa. A grande amplitude de variação dos caracteres nas amostras dos E.U.A. sugere a existência de mais de uma espécie, indicação que é corroborada pelas análises com base nas sequências de *rbcL* e *cox1*, em que nota-se a presença de clados com uma distinta separação. A árvore de *rbcL* indica ainda a existência de pelo menos mais um clado adicional para sequências do Japão, além da existência de haplótipo divergente (*B. helminthosum* AB114646), cuja relação com os outros dois clados (Brasil e E.U.A.) não está clara com base nos dados atualmente disponíveis. Em síntese, análises morfológicas e

moleculares de material europeu (espécimes-tipo ou topótipos), de onde foram descritas a maioria das espécies da seção, são necessárias para melhor entendimento das relações filogenéticas dentro da seção *Virescentia*. A ausência de disjunção clara dos caracteres diagnósticos da seção *Virescentia* para distinção das amostras de *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* do Brasil e para os espécimes-tipo sugere que a aplicabilidade destes caracteres não é muito efetiva e a divergência morfológica entre essas três espécies reconhecidas para o Brasil não é suficiente para considerá-las como táxons distintos.

As análises filogenéticas em estudos anteriormente realizados baseados em dados moleculares (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; HANYUDA et al., 2004; VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009) indicaram a seção *Virescentia* como um grupo monofilético com alto suporte, apesar da pouca representatividade de populações e regiões geográficas. Neste estudo ampliamos a representatividade de populações, com a inclusão de amostras do Brasil e corroboramos a hipótese inicial de monofilia da seção.

A variação das sequências para o gene *rbcL* observada entre as amostras brasileiras (0 a 12 pb, 0–1%), tomando-se conjuntamente espécimes de *B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*, foi geralmente inferior a variação intraespecífica observada em outras rodófitas continentais da ordem Batrachospermales. Hanyuda et al. (2004) encontraram variação de 2 a 31 pb (0,2–2,4%) para quatro haplótipos de *B. helminthosum* mais estritamente relacionados do Japão e 37 a 46 pb (2,9–3,6%) para haplótipo atípico. Vis & Sheath (1997) observaram variação de 0 a 24 pb (0–1,9%) em *B. gelatinosum* (L.) De Candolle na América do Norte; Vis & Entwisle (2000) reportaram variação de 0 a 50 pb (0–3,9%) em *B. pseudogelatinosum* Entwisle et Vis na Austrália; Vis et al. (2008) observaram uma variação de 0 a 76 pb (0–6%) entre espécimes de *B. macrosporum* das Américas do Sul e Norte; Vis et al. (2010) analisaram 107 espécimes de *B. arcuatum* coletados na América do Norte, Ásia e Europa e encontraram uma divergência de 0 a 82 pb (0–6,4%).

Os limites de variação para a região de “barcode” do gene *cox1* observados entre as amostras brasileiras (2 a 19 pb, 0,3–2,9%) foram geralmente superiores aos limites de variação reportados para rodófitas marinhas. Saunders (2005) observou uma variação intraespecífica para o gene *cox1* de 0 a 2 pb (0–0,2%) e interespecífica de 30 a 90 pb (4,5–13,6%) entre 16 espécies das ordens Ceramiales, Gigartinales e Rhodymeniales. Do mesmo modo, Robba et al. (2006) encontraram variação intraespecífica muito inferior (0–4 pb, 0–0,7%) comparada com a variação interespecífica (28–148 pb, 5,2–27,4%) para representantes de seis ordens de algas vermelhas. Porém, comparando-se com dados de variação intraespecíficas para espécies de rodófitas continentais, nossos dados situaram-se dentro ou abaixo dos limites reportados. House et al. (2010) analisaram 193 indivíduos de *B. gelatinosum* provenientes de 16 localidades ao longo da região leste da América do Norte e observaram a ocorrência de cinco haplótipos com variação intraespecífica de 0 a 2 pb (0–0,2%). Em contraste, Sherwood et al. (2008) reportaram variação intraespecífica de 0 a 67 pb (0–10,1%) para *B. macrosporum*. Em estudo com 70 indivíduos de *B. helminthosum* coletados no leste da América do Norte, House et al. (2008) observaram uma variação de 0 a 44 pb (0–6,6%), mas não foram encontrados caracteres morfológicos que distinguíssem os haplótipos divergentes. Com base nesses dados, os resultados para os dois marcadores moleculares utilizados, associados aos dados morfológicos, sugerem que as amostras brasileiras de *Batrachospermum* da seção *Virescentia* representam uma única espécie (*B. helminthosum*). Sendo assim, as três espécies previamente reconhecidas para o Brasil com base em caracteres morfológicos (*B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*, NECCHI, 1990b) não foram corroboradas pelos dados moleculares, rejeitando a hipótese inicial.

Hanyuda et al. (2004) indicaram a existência de duas linhagens com evidente separação geográfica de *B. helminthosum* com base em sequências de *rbcL*: uma do Japão com quatro haplótipos descritos naquele estudo (com divergência de 2 a 33 pb, 0,1–2,4%);

outra de amostras dos E.U.A. contendo cinco haplótipos com divergência de 45 a 54 pb (3,5–4,2%). Um quinto haplótipo do Japão, com divergência de 37 a 46 pb (2,6–3,3%) em relação aos demais haplótipos, não se agrupou com nenhuma das duas linhagens, o que sugeriram tratar-se de uma espécie distinta. Esses autores sugeriram que várias características taxonômicas utilizadas para separação de espécies na seção *Virescentia* (separação de sexo, origem do ramo carpogonial, presença/ausência de ramificação ou saliências no tricogínio) não são determinadas geneticamente, mas influenciadas por condições ambientais e destituídas, portanto, de valor diagnóstico para identificação de espécies na seção *Virescentia*.

Os dados do presente estudo evidenciaram três clados com distinta separação geográfica, contendo os dois demonstrados anteriormente por Hanyuda et al. (2004) e com a adição de um clado referente às amostras brasileiras. A presença de três clados bem definidos associados a uma divergência relativamente alta nas sequências entre estes grupos geográficos, comparadas à variação dentro de cada grupo, sugere que as amostras do Brasil, Japão e E.U.A. correspondem a, pelo menos, três espécies distintas. No entanto, para melhor elucidar os limites intra e interespecíficos da seção *Virescentia*, identificar com precisão as distintas espécies e definir os critérios diagnósticos para separação das espécies da seção, serão necessários novos estudos com amostras do Brasil, E.U.A., Japão e Europa (principalmente provenientes da região dos espécimes-tipo) para populações dessas e de outras regiões do globo.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos através das análises morfológicas e moleculares de representantes da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* no Brasil, podemos concluir que:

- 1) A seção *Virescentia* corresponde a um grupo monofilético dentro do gênero *Batrachospermum*;
- 2) As três espécies da seção *Virescentia* previamente reconhecidas para o Brasil (*B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*) (NECCHI, 1990b) não apresentaram divergência molecular e morfológica suficientes para serem consideradas espécies distintas. Sendo assim, os representantes brasileiros da seção *Virescentia* correspondem a uma única espécie, provisoriamente identificados como *B. helminthosum*.
- 3) A presença de três clados bem definidos, com nítida repartição geográfica e associados a uma divergência relativamente alta nas sequências entre estes grupos sugere que as amostras do Brasil, Japão e E.U.A. correspondem a, pelo menos, três espécies distintas.

A circunscrição dos espécimes do Brasil, provisoriamente identificados como *B. helminthosum*, pode ser definida pelos seguintes caracteres (considerando-se os dados obtidos neste estudo e os de NECCHI, 1990b): plantas monóicas, dióicas ou polióicas; verticilos doliformes, esféricos, piriformes ou obcônicos e 280–1100 μm de diâmetro; fascículos primários com 7–18 células e fascículos secundários variando de poucos e esparsos a numerosos e somente próximo dos nós ou ao longo de todo internó; carpogônios tipicamente com 40–110 μm de comprimento, tricogínios pedicelados e claviformes; carposporófitos com 200–550 μm de largura e 100–300 μm de altura e filamentos gonimoblásticos com 3–6 células; carposporângios obovóides, piriformes ou elípticos, tipicamente com 19–35 μm de comprimento e 10–24 μm de diâmetro.

6. Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.
- ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, 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, Jan 2004.
- BLANCK, H.; WALLIN, G.; WÄNGBERG, S. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 8, n. 4, p. 339-351, 1984.
- BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 17, p. 6350-6355, April 29, 2008 2008.
- CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 73, n. 3, p. 203-66, Aug 1998.
- CHIASSON, W. B.; MACHESKY, N. M.; VIS, M. L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum*, (Rhodophyta) in North America. **Phycologia**, 2003.
- COMPÈRE, P. Taxonomic and nomenclatural notes on some taxa of the genus *Batrachospermum* (Rhodophyceae). **Belg. J. Bot.**, v. 124, p. 21-6, 1991.
- 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.
- DELWICHE, C. F.; KUHSEL, M.; PALMER, J. D. Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. **Mol. Phylogenet.**, v. 4:1, p. 10-28, 1995.
- DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1462, p. 1905-16, Oct 29 2005.

- 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, 2010/06/01 2010.
- ELORANTA, P.; KWANDRANS, J. Distribution and ecology of freshwater red algae (Rhodophyta) in some central Finnish rivers. **Nordic Journal of Botany**, v. 16, n. 1, p. 107-117, 1996.
- ENTWISLE, T. J.; FOARD, H. J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and emended circumscriptions in sections *Aristata*, *Batrachospermum*, *Turfosa* and *Virescentia*. **Austr. Syst. Bot.**, v. 10, p. 331-80, 1997.
- ENTWISLE, T. J.; FOARD, H. J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and records in sections *Contorta* and *Hybrida*. **Austr. Syst. Bot.**, v. 12, p. 615-33, 1999.
- ENTWISLE, T. J.; VIS, M. L.; CHIASSON, W. B.; NECCHI, O. J.; SHERWOOD, A. R. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. **J. Phycol.**, v. 45, p. 704-15, 2009.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, Mar 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, Mar 1998.
- FLINT, L. H. Studies of fresh-water red Algae. **Am J Bot**, v. 35, n. 7, p. 428-33, Jul 1948.
- FLINT, L. H. Fundamental lengths and masses of fundamental particles. **Nature**, v. 166, n. 4209, p. 30, Jul 1 1950.
- FLOYD, R.; ABEBE, E.; PAPERT, A.; BLAXTER, M. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Mol Ecol**, v. 11, n. 4, p. 839-50, Apr 2002.
- 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, n. 15, p. 7281-5, Jul 19 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.
- GABRIELSON, P. W.; GARBARY, D. J.; SOMMERFELD, M. R.; TOWNSEND, R. A.; TYLER, P. L. **Phylum Rhodophyta**. In: *Handbook of Protoctista: The Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic Microorganisms and Their Descendants Exclusive of Animals, Plants and Fungi*. Jones and Bartlett Pub., Boston, 1990.

- GARBARY, D. J.; GABRIELSON, P. W. **Taxonomy and evolution. In *Biology of the Red Algae***. Cambridge University Press, New York,, 1990.
- 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. e7483, 2009.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Prentice-Hall, New Jersey, 2009.
- GURGEL, C. F. D.; LOPEZ-BAUTISTA, J. **Red algae, In: Encyclopedia of Life Sciences**. Wiley, Chichester, UK, 2007.
- HALL, M. M.; VIS, M. L. Genetic variation in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) among and within stream reaches using intersimple sequence repeat molecular markers. **Phycol. Res.**, p. 50:155–62, 2002.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Ac. Symp. Ser.** , v. 41, p. 95-98, 1999.
- 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.
- 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.
- HEBERT, P. D.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 41, p. 14812-7, Oct 12 2004a.
- HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e312, Oct 2004b.
- 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, 2010/09/03 2010.
- HUBERT, N.; MEYER, C. P.; BRUGGEMANN, H. J.; GUERIN, F.; KOMENO, R. J.; ESPIAU, B.; CAUSSE, R.; WILLIAMS, J. T.; PLANES, S. Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e28987, 2012.

- HYLANDER, C. J. **The Algae of Connecticut**. 245 p. incl. XXVIII pl. Ph. D Yale University, Hartford,. 1928.
- ISRAELSON, G. **The freshwater Florideae of Sweden**. Uppsala,: A.-b. Lundequistska bokhandeln, 1942. 135 p.
- KAPRAUN, D. F.; BRALY, K. S.; FRESHWATER, D. W. Nuclear DNA content variation in the freshwater red algal orders Batrachospermales and Thoreaales. **Phycologia**, v. 46, p. 54–62, 2007.
- KUMANO, S. Freshwater red algae of the world. **Bristol, Biopress Ltd**, p. 375 p, 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.** , p. 47: 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, Jun 2007.
- LOPEZ-BAUTISTA, J. M. **Red algal genomics: A synopsis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**. Springer; 1st Edition, 2010. 526.
- LUMBSCH, H. T.; LEAVITT, S. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 59-72, 2011/09/01 2011.
- MCFADDEN, G. I. Plastids and protein targeting. **J Eukaryot Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 339-46, Jul-Aug 1999.
- MORI, M. Studies of the genus *Batrachospermum* in Japan. **Jap. J. Bot**, v. 20, p. 461–84, 1975.
- MOUL, E. T.; BUELL, H. F. Algae of the Pine Barrens. In: FORMAN, R. T. T. (Ed.). **Pine Barrens: Ecosystem and Landscape**: Academic Press, New York, 1979. p.425-40.
- 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, Aug 2001.
- NECCHI, O. J. Evaluation of numeric taxonomic characters in brazilian species of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermales). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 50, n. 3, 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. J.; BRANCO, C. C. Z.; BRANCO, L. H. Z. Distribution of Rhodophyta in streams from São Paulo State, southeastern Brazil. **Algol. Stud.** , p. 97: 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. J.; VIS, M. L. **Monograph of the genus *Kumanoa* (Rhodophyta, Batrachospermales)**. Stuttgart: J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 2012. 79 p. ISBN 9783443600433 (pbk.)0067-8112 ;
- 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** p. 35: 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, Apr 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, Nov 2012.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, January 1, 1998 1998.
- PUESCHEL, C. M.; COLE, K. M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. **Am. J. Bot.**, v. 69, p. 703–20, 1982.
- 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.
- 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. 1101–108, 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, Jul 26 2005.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-4, Aug 12 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 9780879695774. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=9mO2Fx0CuEYC> >.

- SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. **Phil. Trans. Roy. Soc. B** v. 360, p. 1879–88, 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, Oct 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.** 3ª edição. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003.
- SCHUMACHER, G. J.; WHITFORD, L. A. Additions to the fresh-water algae in North Carolina. **J. Elisha Mitchell Sci. Soc.**, p. 77:274-80, 1961.
- SHEATH, R.; BURKHOLDER, J. Characteristics of softwater streams in Rhode Island II. Composition and seasonal dynamics of macroalgal communities. **Hydrobiologia**, v. 128, n. 2, p. 109-118, 1985/09/01 1985.
- SHEATH, R. G. **The biology of freshwater red algae. In Progress in Phycological Research.** Biopress, Bristol, 1984.
- SHEATH, R. G. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. In: WEHR, J. D. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Red Algae:** Elsevier Science, 2003. p.197–224. ISBN 9780127415505.
- SHEATH, R. G.; HAMBROOK, J. A. Mechanical adaptations to flow in freshwater red algae. **Journal of Phycology**, v. 24, n. 1, p. 107-111, 1988.
- 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., 1990. p.455–476.
- SHEATH, R. G.; MORISON, M. O.; COLE, K. M.; VANALSTYNE, K. L. A new species of freshwater Rhodophyta, *Batrachospermum carpocontortum*. **Phycologia**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 1986/09/01 1986.
- SHEATH, R. G.; MÜLLER, K. M.; COLBO, M. H.; COLE, K. M. Incorporation of freshwater Rhodophyta into the cases of *Chironomid larvae* (Chironomidae, Diptera) from North America. **Journal of Phycology**, v. 32, n. 6, p. 949-952, 1996.
- SHEATH, R. G.; MÜLLER, K. M.; LARSON, D. J.; COLE, K. M. Incorporation of freshwater Rhodophyta into the cases of caddisflies (trichoptera) from North America. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 6, p. 889-896, 1995.

- SHEATH, R. G.; VIS, M. L. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 7. Section *Hybrida*. **Phycologia**, v. 34, p. 431-38, 1995.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 1. Section *Contorta*. . **J. Phycol.**, v. 28, p. 237-46, 1992.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 2. Chromosome numbers. **J. Phycol.**, p. 32:304-6, 1993a.
- 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. 719-25, 1993b.
- 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. 108-17, 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. 404-14, 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. 872-84, 1994c.
- SHERWOOD, A. R.; VIS, M. L.; ENTWISLE, T. J.; NECCHI, O. J.; 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. 269-79, 2008.
- SIRODOT, S. Nouvelle classification des algues d'eau douce du genre *Batrachospermum*: développement; generations alternantes. **C. R. Acad. Sci., Paris**, v. 76, p. 1216-20, 1873.
- SIRODOT, S. **Les Batrachospermes, Organisation, fonctions, Développement, Classifications**. Librairie de Académie de Médecine, Paris, 1884.
- SMITH, M. A.; RODRIGUEZ, J. J.; WHITFIELD, J. B.; DEANS, A. R.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 34, p. 12359-64, Aug 26 2008.
- 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, March 7, 2006 2006.
- STARMACH, K. **Phaeophyta – Brunatnice, Rhodophyta – Krasnorosty**. In: starmach, K. & sieminska, J. (eds): Flora słodkowodna Polski 14: 1–445 pp., Polska Akad. Nauk, Warszawa & Krakow., 1977.
- STARMACH, K. Some taxa of freshwater red algae (Rhodophyta) from cuba. **Frag. Flor. Geobot.**, p. 31-32:473-94, 1986-1987.
- 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, 2012. Disponível em: < <http://sweetgum.nybg.org/ih/> >.
- VIS, M. L.; CAMERON HODGE, J.; NECCHI, O. J. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. **Journal of Phycology**, 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. 441-46, 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. 1175-182, 2000.
- 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, 2010/11/02 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. J.; 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. 341-50, 1998.

- VIS, M. L.; SHEATH, R. G. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 9. Section *Batrachospermum*: description of five new species. **Phycologia**, v. 35, p. 124-34, 1996.
- 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.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8a. Section *Batrachospermum*: *Batrachospermum gelatinosum*. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996a.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8b. Section *Batrachospermum*: previously described species. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996b.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; ENTWISLE, T. J. Morphometric analysis of *Batrachospermum* section *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) type specimens. **Eur. J. Phycol.**, v. 30, p. 35-55, 1995.
- YOON, H. S.; HACKETT, J. D.; PINTO, G.; BHATTACHARYA, D. The single, ancient origin of chromist plastids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15507-12, Nov 26 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.