Monica Orlandi Paiano

FILOGEOGRAFIA DE DUAS ESPÉCIES DE RHODOPHYTA DA ORDEM BATRACHOSPERMALES NO BRASIL

São José do Rio Preto
2011

MONICA ORLANDI PAIANO

FILOGEOGRAFIA DE DUAS ESPÉCIES DE RHODOPHYTA DA ORDEM BATRACHOSPERMALES NO BRASIL

Dissertação apresentada 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 Jr.

São José do Rio Preto

2011

Paiano, Monica Orlandi.

Filogeografia de duas espécies de Rhodophyta da ordem Batrachospermales no Brasil/ Monica Orlandi Paiano. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
67f. :il. ; 30 cm.

Orientador: Orlando Necchi Júnior

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Botânica. 2. Filogeografia. 3. Alga vermelha - Brasil. I. Necchi Júnior, Orlando. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.273

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

Campus de São José do Rio Preto - UNESP

MONICA ORLANDI PAIANO

FILOGEOGRAFIA DE DUAS ESPÉCIES DE RHODOPHYTA DA ORDEM BATRACHOSPERMALES NO BRASIL

Dissertação apresentada 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 Júnior

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco

UNESP – Assis

Profª. Drª. Valéria Cassano

UFRJ – Rio de Janeiro

São José do Rio Preto

04/novembro/2011

RESUMO

Batrachospermum helminthosum Bory e *Sirodotia delicatula* Skuja são duas espécies da ordem Batrachospermales amplamente distribuídas no Brasil. As variações genéticas intra e interespecífica destas duas espécies foram investigadas com a utilização de dois marcadores mitocondriais, *cox*2-3 (região espaçadora entre os genes que codificam as subunidades 2 e 3 da enzima citocromo *c* oxidase) e região de "barcode" do gene *cox*1 (que codifica a subunidade 1 da enzima citocromo *c* oxidase). Sessenta e três indivíduos de seis localidades foram amostrados para *B. helminthosum*, abrangendo a área do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo (20º24'49"-29º10'44"S). Foram detectados sete haplótipos para a região espaçadora *cox*2-3, com comprimento de 376 pares de base (pb), os quais variaram entre 1 a 9 pb (0,3-2,4%). Estes haplótipos revelaram uma nítida tendência de variação do sul em direção ao norte do país e mostraram padrão essencialmente similar em relação aos haplótipos encontrados para a região de "barcode" do gene *cox*1, que apresentou comprimento de 664 pb e teve uma variação de 3 a 11 pb (0,4 a 1,6%) entre os seis haplótipos encontrados. A variação encontrada para *S. delicatula* foi maior, entre os 115 indivíduos analisados, com sete haplótipos para a região espaçadora *cox*2-3, em 13 localidades amostradas, do estado de São Paulo até Mato Grosso (11º32'20''-23º33'48''S). A divergência entre estes haplótipos foi de 1 a 20 pb (0,3 a 5,4%) também com comprimento de 376 pb. As sequências de *cox*1 apresentaram variação de 1 a 56 pb (0,1 a 8,5%) para os oito haplótipos detectados, com comprimento de 664 pb. Os haplótipos com maior divergência em relação ao ancestral foram os de Mato Grosso e Goiás, mas a variação entre eles foi pequena. Os dados obtidos para ambos os marcadores sugerem que a dispersão da espécie no Brasil teria partido de uma região mais central, no estado de São Paulo, onde está o haplótipo ancestral e outros próximos, e diferenciando-se em duas linhagens diferentes: 1) em direção ao leste do país, representada pelos haplótipos das populações do estado do Espírito Santo, com baixa variação (2 a 4 pb); 2) em direção à região centro-oeste do país, representada pelos haplótipos das populações dos estados de Goiás e Mato Grosso, com divergência muito mais elevada (15 a 16 pb). Comparando-se as duas espécies deste trabalho, *S. delicatula* apresentou maior variação do que *B. helminthosum,* porém o número de

locais amostrados foi duas vezes maior na primeira. Os resultados obtidos corroboraram as duas hipóteses iniciais do trabalho: 1) ambas as espécies apresentaram grande diversidade genética para os dois marcadores com maior divergência inter do que intrapopulacional e as populações mais distantes geograficamente apresentaram maiores divergências entre si; 2) as espécies apresentaram padrões filogeográficos diferentes, relacionados às características distintas de distribuição geográfica das espécies; para *B. helminthosum*, a variação genética foi menor do que em *S. delicatula,* resultado que pode ser atribuído à ocorrência da primeira em regiões de clima temperado a subtropical em contraste com a da segunda (tropical ou subtropical).

Palavras-chave: Filogeografia, Batrachospermales, *cox*2-3, *cox*1, variação intraespecífica.

ABSTRACT

Batrachospermum helminthosum Bory and Sirodotia delicatula Skuja are two widespread species of Batrachospermales in Brazil. Intra- and inter-specific genetic variation of these two species were investigated using two mitochondrial markers - cox2-3 (spacer region between the genes encoding sub-units 2 and 3 of the cytochrome c oxidase enzyme) and the barcode region of the gene cox1 (encoding sub-unity 1 of the cytochrome c oxidase). Sixty-three individuals from six localities were sampled for B. helminthosum comprising a region from Rio Grande do Sul through Espírito Santo (20º24'49"-29º10'44"S). Seven haplotypes were found for the cox2-3 spacer region, with the length of 376 base pairs (bp), which ranged from 1 to 9 bp (0.3-2.4%). These haplotypes revealed a clear trend of variation from the south towards the north of the country and showed an essentially similar pattern of the haplotypes found for the barcode region of cox1, which had 664 bp in length and exhibited a divergence of 3 to 11 pb (0.4 to 1.6%) among the six haplotypes found. The variation found for S. delicatula was relatively higher among the 115 individuals analyzed, with seven haplotypes for the spacer region cox2-3, from 13 localities samples, from States of São Paulo through Mato Grosso (11º32'20''-23º33'48''S). The divergence among these haplotypes ranged from 1 to 20 bp (0.3 a 5.4%) in sequences with 376 bp in length. The cox1 sequences had a variation of 1 to 56 bp (0.1 to 8.5%) for the eight haplotypes found, all with 664 bp in length. The haplotypes with higher divergences in comparison to the ancestral were those from States of Goiás and Mato Grosso, but with a lower variation between them. Results for both markers suggest that the dispersion of this species in Brazil initiated from a central region in São Paulo State, where the ancestral haplotypes and other closely related ones were found, and differentiated in two distinct lineages: 1) towards the eastern of the country, represented by the haplotypes found in populations from Espírito Santo State, with low variation (2 to 4 pb); 2) towards the Midwest of the country, represented by the haplotypes found in populations from States of Goiás and Mato Grosso, with a much higher variation (15 to 16 bp). A comparison of the two species studied showed that S. delicatula had a much higher variation than B. helminthosum,

but the number of populations sampled was twice as higher in the former species. Results corroborated the two initial hypotheses of this study: 1) both species exhibited a wide diversity for both molecular markers, with a higher divergence among than within populations and the more distant populations had the higher divergences; 2) the species had different phylogeographic patterns, related to their distinct geographic distributions; the genetic variation was lower in B. helminthosum than in S. delicatula, which can be ascribed to the occurrence of the former in regions with temperate to subtropical climates, in contrast to the majority distribution in tropical or subtropical areas of the latter.

Keywords: Phylogeography, Batrachospermales, cox2-3, cox1, intraespecific variation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....1
Hipóteses e objetivos.....4
MATERIAL & MÉTODOS.....6
Análises moleculares.....10
Extração de DNA.....10
Amplificação de DNA.....11
Iniciadores.....11
Eletroforese em gel de agarose.....12
Purificação de produto de PCR.....12
Sequenciamento de DNA.....12
Análise de dados.....12
Identificação e alinhamento das sequências geradas.....12
Construção de árvores filogenéticas.....13
RESULTADOS.....14
Variação genética de *Batrachospermum helminthosum*.....14
Variação genética de *Sirodotia delicatula*.....23
DISCUSSÃO.....36
Variação intraespecífica.....36
B. helminthosum.....36
S. delicatula.....38
Variação interespecífica.....40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....42
ANEXOS.....47

INTRODUÇÃO

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, família Batrachospermaceae, o gênero *Batrachospermum* é o mais especioso, com 112 espécies reconhecidas mundialmente (KUMANO, 2002), bem como bastante diverso morfologicamente (ENTWISLE *et al*., 2009). Do ponto de vista sistemático, tem sido demonstrado como parafilético em todos estudos filogenéticos moleculares já realizados (VIS *et al*., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS *et al*., 2005; ENTWISLE *et al*., 2009). No Brasil, 27 espécies foram reconhecidas por NECCHI (1990a), distribuídas em cinco seções do gênero: *Aristata, Batrachospermum, Contorta* (incluindo *Hybrida*) – atualmente elevada para o nível gênero (*Kumanoa*, ENTWISLE *et al*., 2009), *Turfosa* e *Virescentia*.

A seção *Virescentia* (SIRODOT, 1873) corresponde a espécies com aparência esverdeada e verticilos bem desenvolvidos, carposporófitos 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 longos e pedicelados (SHEATH *et al.*, 1994; KUMANO, 2002). NECCHI (1990) reconheceu três espécies deste grupo para o Brasil: *B. helminthosum* Bory*, B. sirodotii* Skuja (tratado como *B. virgatum* Sirodot) e *B. vogesiacum* T. G. Schultz (tratado como *B. flageliforme* Sirodot). SHEATH *et al*. (1994) reexaminaram a sistemática desta seção com base em análises morfométricas e trataram *B. sirodotii* e *B. vogesiacum* como sinônimos de *B. helminthosum*. Entretanto, com base exclusivamente morfológica não há fundamentação suficiente para sustentar essa proposição. As relações filogenéticas entre as espécies da seção *Virescentia*, 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 espécies.

O gênero *Sirodotia* foi proposto por KYLIN (1912) dentro da família Batrachospermaceae. NECCHI & ENTWISLE (1990) reduziram-no a uma seção do gênero *Batrachospermum* baseado no fato de que a principal característica distintiva (presença de filamentos gonimoblásticos indeterminados) é também encontrada na

maioria dos membros da seção *Turfosa,* e o seu reconhecimento no nível genérico tornaria o gênero *Batrachospermum* parafilético. O gênero foi reconhecido em revisão recente da ordem Batrachospermales (ENTWISLE *et al.*, 2009). *Sirodotia* têm sido relativamente bem estudado no Brasil, tanto do ponto de vista taxonômico como ecológico. *Sirodotia delicatula* Skuja (tratada como *Batrachospermum delicatulum* (Skuja) Necchi & Entwisle) é a única espécie reconhecida no Brasil e uma das rodófitas de água doce mais amplamente distribuídas no país.

A análise da variação genética intraespecífica (populacional) permite, entre outras, abordagens filogeográficas importantes para elucidação das estratégias evolutivas e dos limites de variação das espécies. Filogeografia é o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE, 2000). Poucos estudos foram realizados sobre variação genética intraespecífica e com enfoque filogeográfico nas Batrachospermales (VIS *et al*., 2008). Os primeiros trabalhos realizados usaram os espaçadores transcritos internos ITS1-5.8S-ITS2 do DNA nuclear ribossômico (rDNA), o gene *rbc*L (que codifica a subunidade grande da RUBISCO) e o espaçador entre os genes *rbc*L e *rbc*S (que codifica a subunidade pequena da RUBISCO) com ênfase nas implicações sistemáticas (em níveis supra-específicos). Vis & Sheath (1997) utilizaram as sequências da região ITS para analisar se as populações de *B. gelatinosum* (L.) De-Candolle da América do Norte representavam uma entidade taxonômica válida. A biogeografia e a variação genética de populações de *B. helminthosum* Bory da América do Norte também foram analisadas com base em sequências do *rbc*L e da região ITS para várias populações (VIS *et al*., 2001) ou da técnica molecular ISSR (“inter-simple sequence repeat”) dentro de uma única população (HALL & VIS, 2002). Esses estudos demonstraram que a biogeografia desta espécie é complexa e a variação genética não reflete a distância geográfica, com indivíduos geneticamente semelhantes de localidades distantes e vice-versa, tanto dentro como entre populações.

As regiões do DNA utilizadas como marcadores populacionais dos trabalhos citados acima não demonstraram resolução suficiente para elucidar relações biogeográficas complexas, como no caso de *B. helminthosum*. Dados do gene *rbc*L indicaram que esta região do DNA não é suficientemente variável para distinguir populações (VIS *et al*., 2001), enquanto dados de ITS forneceram maior resolução para diferenciar genótipos. Porém, dados para outros grupos de algas (SERRÃO *et*

al., 1999; FAMÀ *et al*., 2000) demonstraram que as cópias do ITS num indivíduo não são todas idênticas, tornando problemática a comparação de sequências. Finalmente, dados de ISSR contêm muita informação sobre a variação genética dentro de populações, mas a grande divergência genética entre populações torna difícil distinguir padrões filogeográficos (HALL & VIS, 2002). Diante deste fato, foi percebida a necessidade de se experimentar o uso de ferramentas moleculares mais eficazes e apropriadas para este tipo de abordagem.

Um marcador molecular que se mostrou muito aplicável no estudo da variação genética dentro de espécies de rodófitas (ZUCCARELLO *et al*., 1999) é a região do DNA mitocondrial que compreende o espaçador entre os genes das subunidades 2 e 3 da enzima citocromo *c* oxidase (*cox2-3*). Esse marcador tem sido utilizado mais recentemente em estudos filogeográficos de espécies de *Batrachospermum* (CHIASSON *et al*., 2003; HOUSE *et al*. 2008, 2010; VIS *et al*., 2008, 2010) e os resultados disponíveis indicaram grande aplicabilidade neste tipo de estudo. Estudos envolvendo “DNA barcoding” têm sido demonstrados de grande potencial para a sistemática em níveis específicos de algas vermelhas (SAUNDERS, 2005; ROBBA *et al*., 2006) e recebido grande atenção recentemente. Sequências da região de “barcode” do gene *cox*1(que codifica a subunidade 1 da enzima citocromo *c* oxidase) tem sido aplicadas como um marcador clássico para estudos dessa natureza com utilização de “primers” e termociclos específicos (SAUNDERS, 2005). Este marcador demonstrou nível de variação suficiente e geralmente apropriado para avaliação de variabilidade genética intraespecífica (SHERWOOD *et al.*, 2008).

House *et al*. (2008) realizaram análise comparativa entre três marcadores moleculares para inferência filogeográfica – região espaçadora *cox2-3* –, *cox1* e UPA (“universal plastid amplicon”) do DNA plastidial. Concluíram que os resultados com base nas sequências de *cox1* são comparáveis aos de *cox2-3* para estudos filogeográficos, visto que os diagramas de associação dos haplótipos foram semelhantes e mostraram os mesmos padrões geográficos. House *et al*. (2010) utilizaram sequências de *cox1* para analisar a variação genética intraespecífica de *B. gelatinosum* na América do Norte, pois a região espaçadora *cox2-3* não amplificou para esta espécie. Vis *et al*. (2008) investigaram os padrões filogeográficos para a espécie *B. macrosporum* nas Américas do Norte e do Sul utilizando sequências da região espaçadora *cox* 2-3, com confirmação posterior dos dados analisando o gene *rbc*L, observando uma pequena variação entre os haplótipos localizados na América

do Norte e uma alta variação entre os haplótipos da América do Sul. Em estudo mais recente, Vis *et al.* (2010) também utilizaram sequências da região espaçadora *cox* 2-3 e do gene *rbc*L para investigar os padrões filogeográficos da espécie *B. arcuatum* em âmbito mundial e foi constatado que a espécie apresenta considerável variação molecular e plasticidade morfológica.

As duas espécies selecionadas para este estudo estão entre aquelas mais amplamente distribuídas no Brasil (NECCHI, 1990a, 1991) e permitem, portanto, a realização de estudo da variação genética intra e interpopulacional com enfoque filogeográfico. A distribuição dessas espécies no Brasil pode ser assim resumida (conforme NECCHI 1990a, 1991): *B. helminthosum* ocorre 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,19º10'-30º45'S); *Sirodotia delicatula* têm sido registrada principalmente em áreas tropicais e subtropicais, raramente temperadas, das regiões sul, sudeste, centro-oeste e norte (dos estados do Rio Grande do Sul até o Maranhão, 04º08'-30º45'S).

Esta investigação visa a realização da análise da variação genética intra e interpopulacional de *B. helminthosum* e *S. delicatula* no Brasil com ênfase na filogeografia,bem como a comparação com abordagens semelhantes realizadas para as mesmas ou distintas espécies em outras regiões do globo (CHIASSON *et al*., 2003; HOUSE *et al*., 2010; VIS *et al*., 2008, 2010).

Hipóteses e objetivos

Com base nas informações atualmente disponíveis sobre filogeografia de representantes da ordem Batrachospermales, as seguintes hipóteses gerais foram testadas: **1)** as duas espécies apresentarão grande diversidade genética (vários haplótipos para ambos marcadores), com maior divergência inter do que intrapopulacional e, dentre as últimas, populações geograficamente mais distantes apresentarão divergências mais altas entre si; **2)** padrões filogeográficos distintos serão encontrados entre as duas espécies, os quais refletirão as estratégias adaptativas e a história evolutiva presumivelmente diferentes de cada espécie, considerando seus distintos padrões de distribuição geográfica. Para testar estas hipóteses foram propostos os seguintes objetivos gerais: **1)** descrever a variação intra e interpopulacional com base nas sequências de dois marcadores (região espaçadora*cox*2-3 e região de "barcode" do gene *cox*1) das duas espécies de

Rhodophyta da ordem Batrachospermales, amplamente distribuídas no Brasil –*B. helminthosum* (Seção *Virescentia*) e *Sirodotia delicatula*; **2)** analisar os padrões filogeográficos de cada espécie; **3)** comparar os padrões filogeográficos entre essas duas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras das espécies e populações analisadas estão descritas conforme segue: *Batrachospermum helminthosum* (Tabela 1, Figura 1) e *Sirodotia delicatula* (Tabela 2, Figura 2). Espécimes-testemunho de cada população estudada foram incluídos no Herbário SJRP (THIERS, 2011).

Tabela 1. Descrição dos locais de coleta das amostras populacionais de *Batrachospermum helminthosum* analisadas neste trabalho.

Espécie/Código	**Localidade e data da Coleta**	**Extensão do trecho amostrado (m)**
Batrachospermum helminthosum –**A**	RS: Arroio Camisas, Parque Aparados da Serra, 29º10'44''S, 50º08'13"W; 10.vi.2009	11,0
B. helminthosum – **B**	RS: Arroio Perdizes, Parque Aparados da Serra, 29º09'29"S, 50º04'09"W; 10.vi.2009	6,0
B. helminthosum – **C**	PR: Guarapuava, Rio Lageado, Bacia do Rio Marrecas, 25º12'57''S, 51º21'18"W; 26.x.2008	10,0
B. helminthosum– **D**	SP: Paraibúna, Pousada Alto da Serra, 23º33'48''S, 45º27'31''W; 23.ix.2006	10,0
B. helminthosum – **E**	SP: Campos do Jordão, Ducha da Prata, 22º44'17''S, 45º34'10"W; 15.xii. 2009	15,0
B. helminthosum – **F**	ES: Domingos Martins, Pedra Azul,Estrada Rota do Lagarto, 20º24'49"S, 41º02'23"W;05.vii.2009	6,0

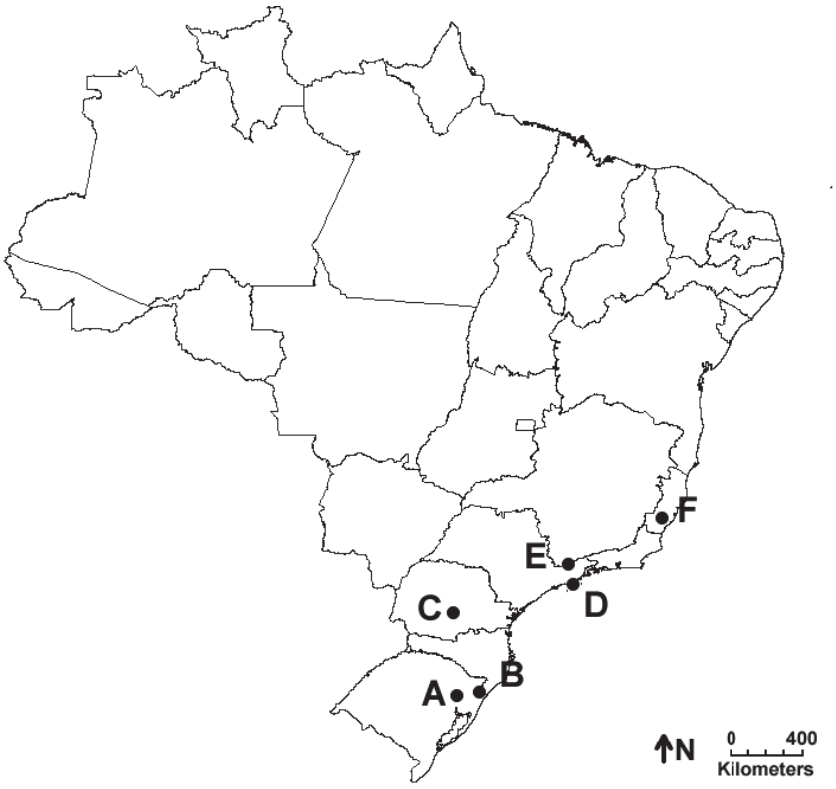


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando as localidades amostradas de *B. helminthosum*. Códigos das localidades conforme Tabela 1.

Tabela 2. Descrição dos locais de coleta das amostras populacionais de *Sirodotia delicatula* analisadas neste trabalho.

Espécie/Código	**Localidade e data da Coleta**	**Extensão do trecho amostrado (m)**
Sirodotia delicatula – **A**	SP: Paraguaçú Paulista, Maracaí, Córrego Km 487-488 (SP-374), 22º33'08"S, 50º48'26"W; 16.xi.2007	17,0
S. delicatula – **B**	SP: Paraibúna, Pousada Alto da Serra, 23º33'48''S, 45º27'31''W; 23.ix.2006	15,0
S. delicatula – **C**	SP: Guapiaçú, próximo da cidade, Córrego Cavenague, 20º47'14"S, 49º13'23"W; 02.vi.2008	7,0
S. delicatula – **D**	SP: Mirassol, Rio S. J. dos Dourados, junto ao pesqueiro Aporé, 20º48'45"S, 49º34'29"W; 25.vi.2008	12,0
S. delicatula – **E**	SP: Américo de Campos, Ribeirão Águas Paradas, 20º17'41"S, 49º46'35"W; 01.vi.2009.	10,0
S. delicatula – **F**	SP: São José do Rio Preto, Córrego da Lagoa, 20º49'00''S, 49º20'00''W; 27.viii.1999	10,0
S. delicatula – **G**	SP: São José do Rio Preto, Córrego Talhadinho, 20º43'00''S, 49º13'00''W; 05.ix.1999	10,0
S. delicatula – **H**	ES: Domingos Martins, Pedra Azul,Estrada Rota do Lagarto, 20º24'49"S, 41º02'23"W; 05.vii.2009	8,0
S. delicatula – **I**	ES: Domingos Martins, Pedra Azul, Rio Jucú (Braço Norte) Rod. 165, Km 137, 20º19'15"S; 41º02'41"W, 04.vii.2009	11,0
S. delicatula – **J**	ES: Afonso Cláudio, Comunidade de Lajinha, próximo Rod. ES-165, 20º15'01"S, 41º03'43"W; 04.vii.2009	7,0

Tabela 2. Continuação

S. delicatula – **K**	GO: Alto Paraíso de Goiás, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, 14º09'58''S, 47º50'39''W; 06.iv.2010	10,0
S. delicatula - **L**	MT: Rio Rosana, BR-163, trecho entre Sinop e Sorriso, 11º57'26''S, 55º31'01''W; 27.ix.2010	10,0
S. delicatula- **M**	MT: Baixada Morena, Rio Roquete, BR-163, sentido Santarém, 11º32'20''S, 55º31,14''W; 19.ix.2010	10,0

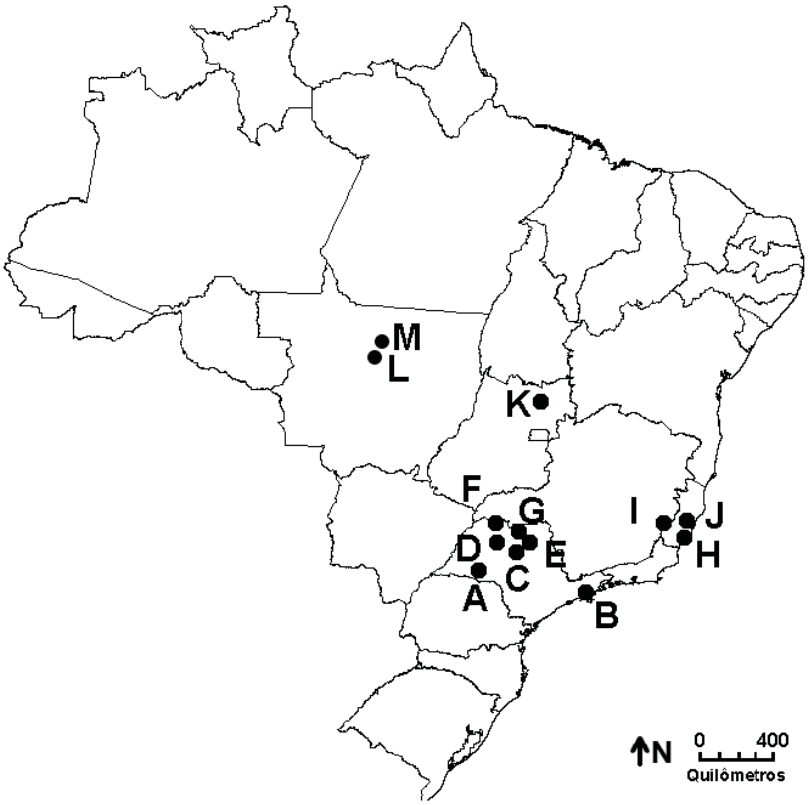


Figura 2. Mapa do Brasil mostrando as localidades amostradas de *S. delicatula*. Códigos das localidades conforme Tabela 2.

Para as análises filogeográficas foram coletados 15 indivíduos de cada população e cada um foi etiquetado e preservado separadamente, para posterior análise molecular. As amostras coletadas foram divididas em duas subamostras: 1) preservada em solução de formaldeído a 4% (NECCHI, 1990a) para identificação e análises morfológicas; 2) secas em sílica-gel para análises moleculares. Neste trabalho foi adotado um conceito "operacional" de população (adaptado de FREELAND, 2005): grupo de indivíduos potencialmente intercruzante pertencente à mesma espécie, que vive dentro de uma área geográfica restrita (neste caso, numa bacia de drenagem). Dos 15 indivíduos, foram selecionados aleatoriamente (por sorteio) 10 para análise (extração, amplificação, quantificação e seqüenciamento). Esta amostragem permite reconhecimento da variabilidade intra-populacional (CHIASSON *et al*., 2003; VIS *et al*., 2008). Os cinco indivíduos restantes foram utilizados no caso de populações que apresentaram problemas (extração ou amplificação) em alguns dos anteriormente selecionados ou para análise nos casos de detecção de grande variação intrapopulacional. Para cada população foi feito um esboço do segmento de rio/riacho amostrado, incluindo-se anotação da extensão do trecho total coletado e distância entre indivíduos. Inicialmente foi analisada a variação genética intraespecífica dos indivíduos de cada população para a região espaçadora cox2-3. Posteriormente, para cada haplótipo encontrado para este marcador, foram selecionados aleatoriamente (por sorteio) três indivíduos para realização das análises para o marcador *cox*1.

Análises moleculares

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^{o}C) e também com o uso do homogeinizador 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^{o}C), modelo MDF-U33V.

Amplificação de DNA - A amplificação dos segmentos específicos de DNA (espaçador mitocondrial *cox2-3* e *cox*1) foi feita pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para as reações de PCR foram utilizados três kits de PCR: "GoTaq® Colorless Master Mix" (Promega, Madison, E.U.A.), com volumes finas de 25 µL ou 50 µL, "puReTaq Ready-to-go PCR beads" (GE HealthCare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), com volume final de 25 µL, e "TopTaq® Master Mix" (Qiagen), com volumes finais de 25 µL ou 50 µL. As misturas fornecidas nos kits contêm: dNTP (desoxinucleosídeos trifosfato), tampão de PCR e *Taq* polimerase. A essas misturas foram adicionados: água bi-destilada e deionizada, "primers" 1 (5') e 2 (3') conforme descritos abaixo e o DNA molde. As reações foram feitas em termocicladores Techgene TC-312 e TC-512 (Techne, Burlington, Reino Unido).

Os programas de temperatura para os ciclos de PCR utilizado para *cox*2-3 e *cox*1 foram os seguintes:

cox2-3 (conforme CHIASSON *et al*., 2003) - 95^{o}C por 1 min e 30 s (desnaturação inicial); 30 a 35 ciclos: 93^{o}C por 30 s (desnaturação); 50^{o}C por 30 s (anelamento dos "primers"); 72^{o}C por 1 min (extensão); 72^{o}C por 10 min (extensão final); 4^{o}C (armazenamento).

cox1 (conforme SAUNDERS, 2005) – 94ºC por 1 min (desnaturação inicial); 5 ciclos: 94^{o}C por 1 min (desnaturação); 50^{o}C por 1min e 30 s (anelamento dos "primers"); 72^{o}C por 1 min e 30 s (extensão); 35 ciclos: 94^{o}C por 1 min (desnaturação); 50^{o}C por 1 min e 30 s (anelamento dos "primers"); 72^{o}C por 1 min (extensão); 72^{o}C por 5 min (extensão final) e 4^{o}C (armazenamento).

Iniciadores ("primers") - a amplificação por PCR dos segmentos inteiros de DNA dos marcadores moleculares foi feita com uso dos iniciadores ("primers") sintéticos 5' e 3', conforme descritos a seguir: *cox1* (GazF1 - 5' TCAACAAATCATAAAGATATTGG -3'e GazR1 - 5' ACTTCTGGATGTCCAAAAAAYCA - 3') (SAUNDERS 2005), e *cox2-3 (*COX2F (5'-GTA CCW TCT TTD RGR RKDAAA TGT GAT GC-3') e COX3R (5'-GGA TCT ACWAGA TGR AAW GGA TGT C-3')) (ZUCCARELLO *et al.,* 1999).

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-borato-EDTA): tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM) (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os géis foram carregados com amostras de DNA e tampão de carga (azul de bromofenol 0,25%, EDTA 50 M e glicerol 30% e água destilada) na proporção de 4:1. As eletroforeses foram feitas sob voltagem de 60 V, com tempo de 45 minutos para *cox*1 e *cox*2-3. Foi usado como marcador de tamanho "1 Kb DNA ladder" (Gibco, Gaithersburg, E.U.A.). As quantificações de DNA amplificado por PCR foram feitas por estimativas visuais por comparação com o marcador. Os géis foram corados com GelRed® (Biotium, Hayward, E.U.A.) e observados sob transiluminador.

Purificação de 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.).

Sequenciamento de DNA - As amostras foram sequenciadas completamente nas direções 3' e 5' para o espaçador *cox2-3* e para o gene *cox*1 no sequenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, E.U.A.) e uso do kit "Big Dye Terminator", versão 3.0 (Applied Biosystems). Para análise das sequências de bases foi utilizado o software BioEdit, versão 6.0, (HALL, 1999, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html).

Análise dos dados

Identificação e alinhamento das sequências geradas - as sequências (inteiras ou fragmentos) geradas pelo sequenciador automático foram carregadas diretamente no software BioEdit (HALL, 1999, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html). A qualidade das sequências foi verificada através da checagem dos arquivos phd, gerados pelo programa Phred (EWIN *et al.,* 1998a, 1998b), que analisa arquivos de sequenciamento e atribui valores de qualidade para cada base (numa escala de 0 a 60). Foram utilizadas apenas as posições com valores de qualidade iguais ou superiores a 30, mas frequentemente as sequências apresentaram valores

superiores a 40 na maior parte. Em casos de sequências de baixa qualidade (prevalência de valores ≤ 30), as amostras foram ressequenciadas e se a má qualidade persistisse o sequenciamento foi feito com novos produtos de PCR.

Cada sequência foi alinhada individualmente para obter-se a sequência de consenso de cada indivíduo para cada população analisada. Cada sequência completa (consenso) foi comparada com aquelas 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 e armazenadas no "GenBank". Finalmente as sequências consenso de todos os indivíduos para todas as populações foram agrupadas numa única matriz de dados montada com uso do programa BioEdit.

Construção de árvores filogenéticas - Para a análise filogeográfica, as genealogias dos haplótipos (geração dos diagramas em rede) foram inferidas pelo método de estimativa do cladograma (TEMPLETON *et al*. 1992) através do software TCS 1.13 (CLEMENT *et al*., 2000). As matrizes com as sequências consenso dos haplótipos de cada espécie foram exportadas no formato PHYLIP no software DnaSP "DNA Sequence Polymorphism" (ROZAS *et al*., 2010), para executar as análises no software TCS.

Foram construídas árvores de distância pela técnica de "neighboor-joining" (NJ) com uso do modelo Kimura 2 parâmetros para estimativa da distância genética (SCHNEIDER, 2003) com base na matriz de sequências dos haplótipos de cada espécie. Como grupo externo foi incluída a sequência mais próxima disponível no GenBank através do programa BLAST. As análises foram rodadas no programa PAUP 4.0b 8 ("Phylogenetic Analysis Using Parsimony") (SWOFFORD, 2003)com uso do pacote MacIntosh Genetic Data Environment (Mac GDE, Steven Smith) versão 2.4. Os táxons *B. helminthosum* (HQ412542) e *S. huillensis* (EU636739) foram usados como grupos externos nas análises de distância genética de *B. helminthosum* e *S. delicatula*, respectivamente.

RESULTADOS

Variação genética intra-específica de *Batrachospermum helminthosum*

Entre os 63 indivíduos de *B. helminthosum* analisados, foram encontrados sete haplótipos para a região espaçadora *cox2-3* em seis localidades (Tabela 3, Figura 1).

No conjunto, as sequências dos haplótipos 1 a 7 apresentaram 376 pares de bases (pb) e a diferença entre eles variou de 1 a 9 pb (0,3 a 2,4%), com 10 posições variáveis (Tabelas 3 a 5, Anexo 1). O haplótipo 1 divergiu dos haplótipos 2 e 3 em apenas uma posição, e dos haplótipos 4 a 7 em duas (haplótipo 4), quatro (haplótipo 5), cinco (haplótipo 6) e seis posições (haplótipo 7); os haplótipos 6 e 7 divergiram entre si em 2 pb (Tabelas 4 e 5). As localidades B e C apresentaram o mesmo haplótipo (2), enquanto as localidades A e E apresentaram dois haplótipos cada (haplótipos 1 e 3, 6 e 7, respectivamente; Tabela 5). As localidades D e F apresentaram apenas um haplótipo cada uma (4 e 5, respectivamente; Tabela 5). O haplótipo 2 se revelou o mais frequente tanto em número de indivíduos (24) como de localidades (duas).

O diagrama em rede dos haplótipos para os 63 indivíduos analisados de *B. helminthosum* (Figura 3) revelou o haplótipo 1 como provável ancestral dos 63 indivíduos. O haplótipo 2 encontrado nas localidades B e C conectou-se apenas com o ancestral, do qual diferiu em 1 pb. O haplótipo 3 também diferiu em 1 pb do ancestral, sendo que ambos foram encontrados na mesma localidade. O haplótipo 4 da localidade D diferiu do 1 em 2 pb e pareceu ser o elo entre o ancestral e os haplótipos mais distantes (6 e 7), mas esses tiveram apenas 1 pb de diferença entre si. Houve uma nítida tendência de variação do sul (localidades A e B) em direção ao norte (localidade F). Os haplótipos menos divergentes e mais estreitamente conectados (1 a 4) situaram-se geograficamente mais próximos (localidades A, B, C e D).

A árvore de distância (NJ) das sequências de *cox* 2-3 (Figura 4) revelou a formação de dois grupos: 1) com os haplótipos 1 a 5; 2) com os haplótipos 6 e 7. No primeiro grupo houve a formação de dois grupos menores: haplótipos 1 e 2; haplótipos 4 e 5. Esses resultados evidenciaram claramente as distâncias genéticas entre os haplótipos e foram essencialmente congruentes com os do diagrama em rede dos haplótipos desta espécie.

Tabela 3. Origem geográfica, número de indivíduos (n) de cada localidade e freqüência absoluta dos haplótipos da região espaçadora *cox*2-3 de *B. helminthosum* no Brasil. Códigos das localidades conforme Tabela 1 e Figura 1.

		Haplótipos						
Localidade	**n**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
A	11	07		04				
B	10		10					
C	14		14					
D	09				09			
E	10						04	06
F	09					09		
Total	63	07	24	04	09	09	04	06

Tabela 4. Haplótipos de *B. helminthosum* definidos por 10 posições variáveis de nucleotídeos em 376 pb da região espaçadora *cox*2-3. A seqüência para o haplótipo 1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos apenas para aquelas quediferem do haplótipo 1.

	Posições									
Haplótipos	**154**	**169**	**178**	**217**	**219**	**221**	**325**	**342**	**347**	**352**
1	T	A	C	A	C	C	A	A	T	T
2									A	
3						T				
4	C							C		
5				G	T		T	C		
6	C	G				T		C		C
7	C	G	T			T		T		C

Tabela 5. Matriz de divergência não corrigida para os haplótipos das sequências de *cox*2-3 de *B. helminthosum*. A porção superior representa o número de pares de bases divergentes e a porção inferior representa a percentagem de diferença entre os haplótipos.

Haplótipos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	-	1	1	2	4	5	6
2	0,3	-	2	3	5	6	7
3	0,3	0,6	-	3	5	4	5
4	0,6	0,8	0,8	-	4	3	5
5	1,1	1,4	1,4	1,1	-	7	9
6	1,4	1,6	1,1	0,8	1,9	-	2
7	1,6	1,9	1,4	1,4	2,4	0,6	-

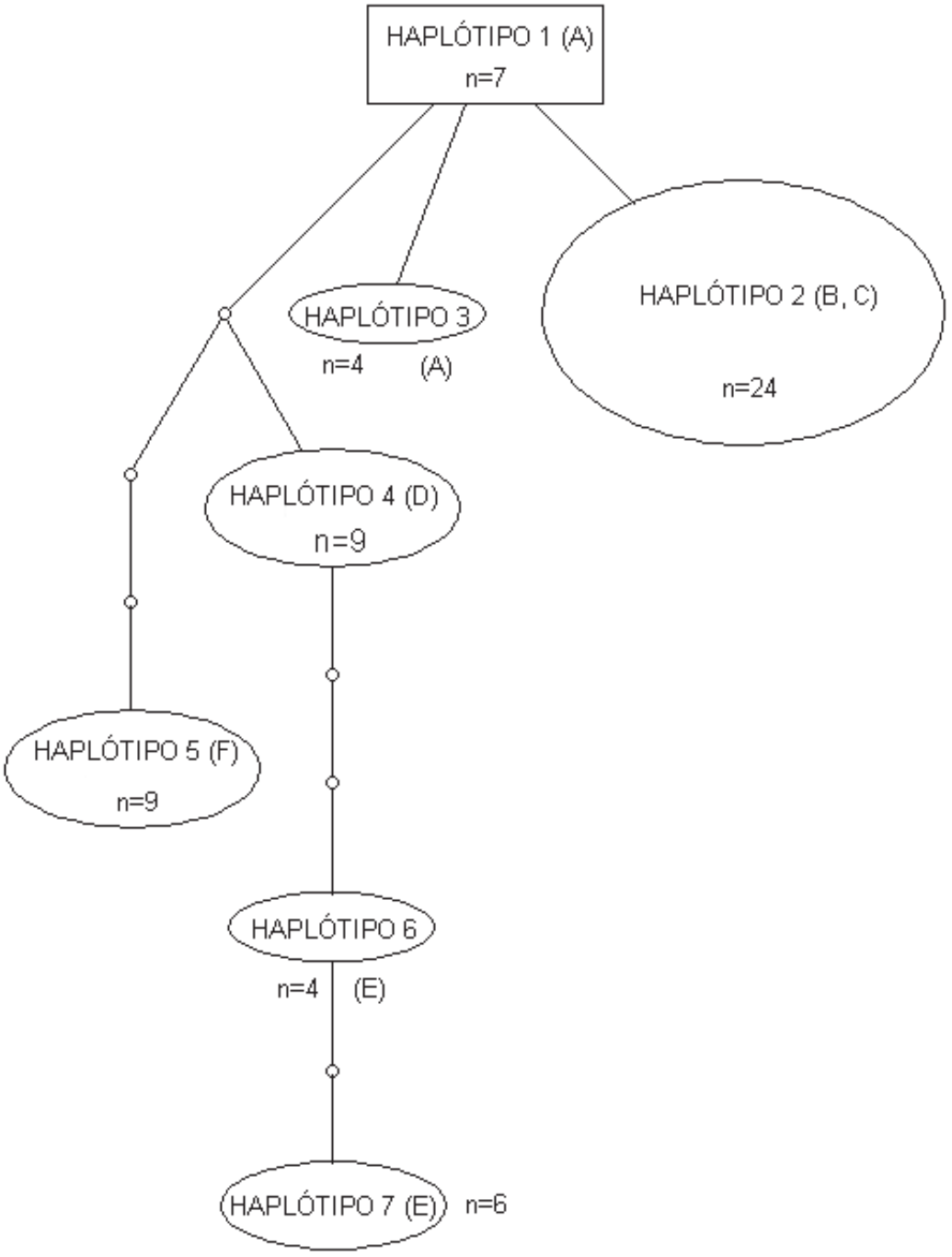


Figura 3. Diagrama em rede dos haplótipos de *B. helminthosum* para *cox*2-3. Cada linha indica um passo mutacional; círculos indicam intermediários perdidos; n= número de indivíduos idênticos. O retângulo indica o provável ancestral entre os haplótipos analisados. Códigos das localidades conforme Tabela 1 e Figura 1.

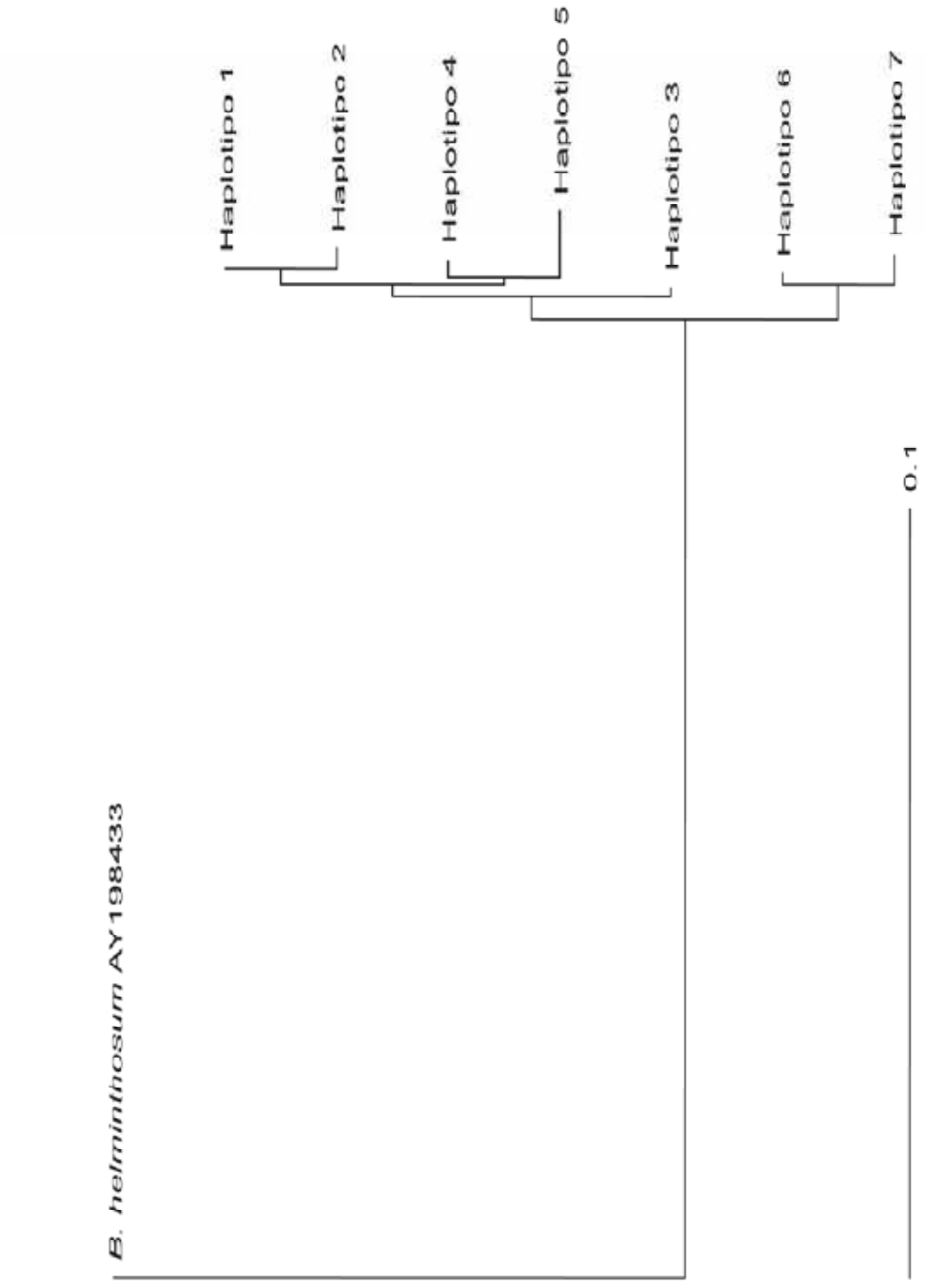


Figura 4. Árvore de distância (NJ) derivada das análises de distância dos haplótipos de *cox*2-3 de *Batrachospermum helminthosum* e táxon usado como grupo externo com número de acesso do GenBank. As designações dos haplótipos são mostradas na tabela 1.

Para as seis localidades amostradas, foram encontrados seis haplótipos em 23 indivíduos para a região de “barcode” do gene *cox*1 (Tabela 6, Figura 1), com sequências de 664 pb (Anexo 2). A diferença entre as sequências variou de 3 a 11 pb (0,4 a 1,6%), com 20 posições variáveis (Tabelas 7 e 8). O haplótipo 1 foi encontrado em todos os indivíduos amostrados na localidade A e em dois dos três indivíduos da localidade B (Tabela 6). Os haplótipos 1 e 2 apresentaram a menor divergência, diferindo entre si em 3 apenas posições, enquanto o haplótipo 1 variou em 11 pb dos haplótipos 4 e 6 (Tabelas 7 e 8). O haplótipo 5 correspondeu a dois haplótipos (6 e 7, Tabela 3) da região espaçadora *cox*2-3, encontrados na localidade E (Campos do Jordão - SP), divergindo em 6 pb dos haplótipos 2 a 4 (Tabela 8). Os haplótipos 3 a 6 foram encontrados em apenas uma localidade cada um (Tabela 6).

O diagrama em rede dos haplótipos para os 23 indivíduos analisados de *B. helminthosum* (Figura 5) revelou o haplótipo 1, das localidades A e B, como provável ancestral. Os haplótipos 4 e 6 das localidades D e F apresentaram 11 pb de diferença em relação ao provável ancestral. O haplótipo 2, também da localidade B diferiu em apenas três pb do haplótipo 1. O haplótipo 3, da localidade C, apresentou sete pb de diferença do provável ancestral, enquanto o haplótipo 5, da localidade E, divergiu em seis pb dos haplótipos 2, 3, 4 e 6. Nesse diagrama fica evidente a variação do sul em direção ao norte do país, com os haplótipos menos divergentes (1, 2 e 3) sendo geograficamente mais próximos (populações do RS e PR, respectivamente), corroborando o resultado encontrado para as análises da região espaçadora *cox*2-3.

A árvore de distância das sequências de *cox*1 (Figura 6) revelou a formação de dois grupos: 1) com os haplótipos 1 e 2; 2) com os haplótipos 4 a 6. O haplótipo 3 foi o mais distante em relação aos demais e posicionou-se isoladamente na árvore. As distâncias genéticas entre os haplótipos foram claramente evidenciadas nesta análise e os resultados congruentes com os do diagrama em rede dos haplótipos desta espécie.

Tabela 6. Origem geográfica, número de indivíduos (n) de cada localidade e freqüência absoluta dos haplótipos da região espaçadora *cox*1 de *B. helminthosum* no Brasil. Códigos das localidades conforme Tabela 1 e Figura 1.

		Haplótipos					
Localidade	**n**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	05	05					
B	03	02	01				
C	03			03			
D	03				03		
E	06					06	
F	03						03
Total	23	07	01	03	03	06	03

Tabela 7. Haplótipos de *B. helminthosum* definidos por 20 posições variáveis de nucleotídeos em 664 pb da região espaçadora *cox*1. A seqüência para o haplótipo 1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos apenas para aquelas quediferem do haplótipo 1.

	Haplótipos					
Posições	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
55	T					C
67	T	C		C	C	C
76	A	G	G	G	G	G
85	A					G
114	A	C		C		
121	T					C
223	A		G			
244	A			G		
250	A			G		
379	A		G			
382	T		C	C	C	C
496	C			T		
542	C			T		
544	T		T	T	T	T
545	C		T			
559	C		T	T	T	T
613	C					T
616	T			C	C	C
628	G				A	
631	T					G

Tabela 8. Matriz de divergência não corrigida para os haplótipos das sequências de *cox*1 de *B. helminthosum*. A porção superior representa o número de pares de bases divergentes e a porção inferior representa a percentagem de diferença entre os haplótipos.

Haplótipos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1	-	3	7	11	7	11
2	0,4	-	8	8	6	9
3	1,1	1,2	-	10	6	10
4	1,6	1,2	1,5	-	6	10
5	1,1	0,9	0,9	0,9	-	6
6	1,6	1,3	1,5	1,5	0,9	-

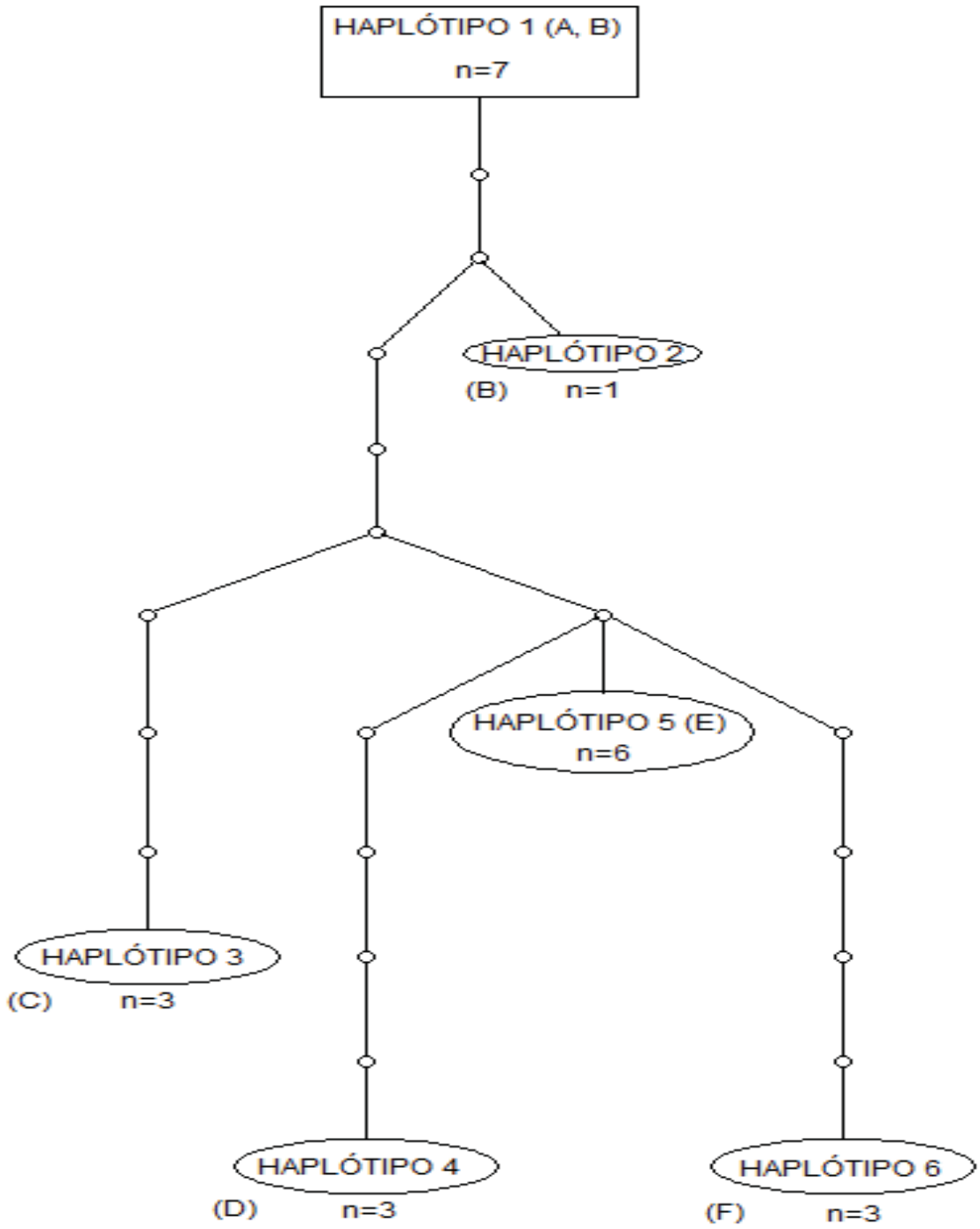


Figura 5. Diagrama em rede dos haplótipos de *B. helminthosum* para *cox*1. Cada linha indica um passo mutacional; círculos indicam intermediários perdidos; n= número de indivíduos idênticos. O retângulo indica o provável ancestral entre os haplótipos analisados. Códigos das localidades conforme Tabela 1 e Figura 1.

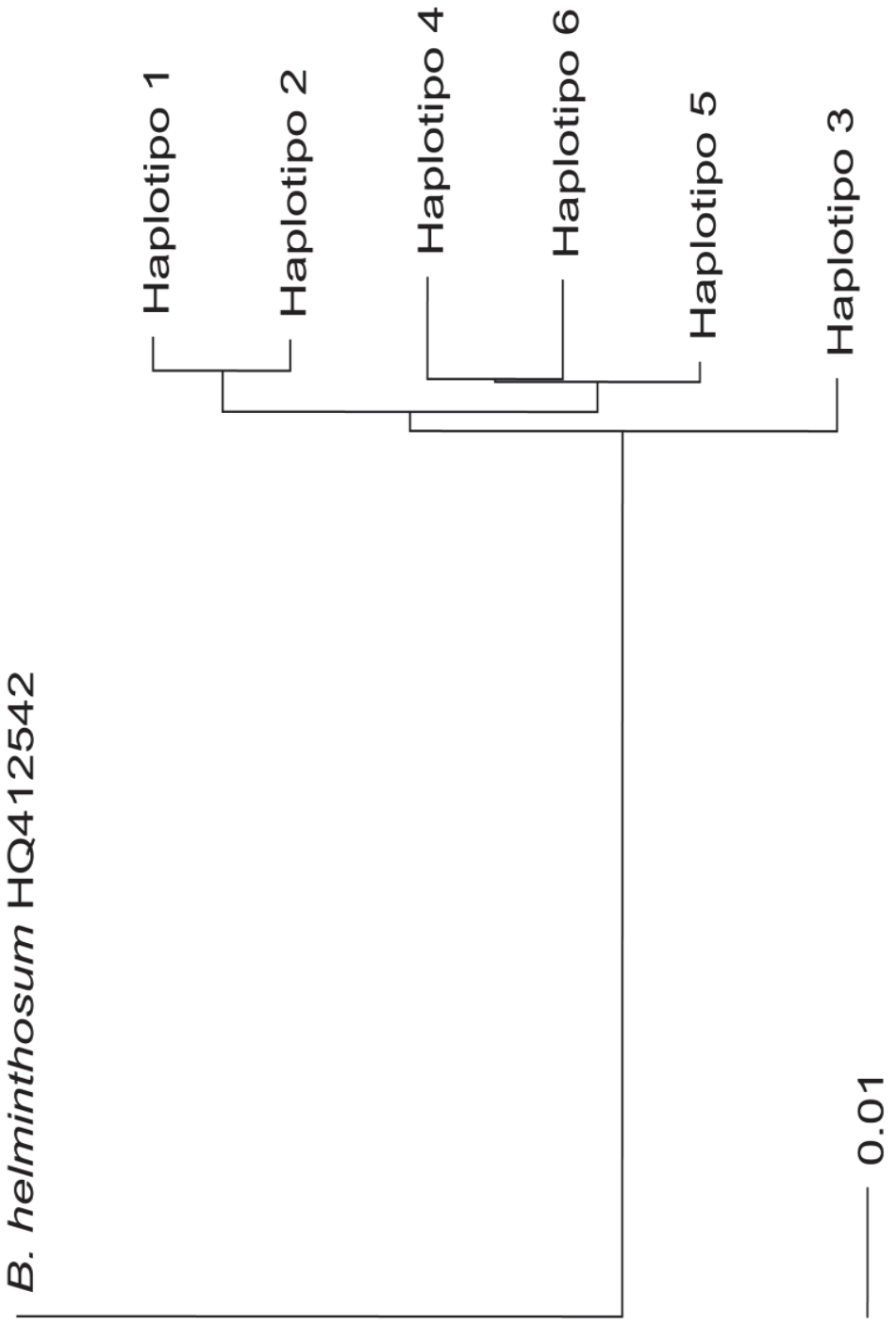


Figura 6. Árvore de distância (NJ) das análises dos haplótipos de *cox*1 de *Batrachospermum helminthosum* e táxon usado como grupo externo com número de acesso do GenBank. As designações dos haplótipos são mostradas na tabela 1.

Variação genética intra-específica de *Sirodotia delicatula*

Entre os 115 indivíduos de *S. delicatula* analisados, foram encontrados sete haplótipos para a região espaçadora *cox2-3* em 13 localidades (Tabela 9, Figura 2), cujas sequências apresentaram 376 pb (Anexo 3).

A diferença entre as sequências variou de 1 a 20 pb (0,3 a 5,4%), com 20 posições variáveis (Tabelas 10 e 11). O haplótipo 1 representou todos os indivíduos amostrados de seis localidades (A, B, C, E, F e G) e também um dos 11 indivíduos da localidade H. Os haplótipos 1 e 2 diferiram entre si em apenas 1 posição, assim como os haplótipos 3 e 4 e também 6 e 7. Os haplótipos 2 e 3 apresentaram diferença de 3 pb. Os haplótipos 6 e 7 divergiram em 15 e 16 posições, respectivamente, em relação ao haplótipo 1. As localidades K e M apresentaram o mesmo haplótipo (6), enquanto todos os outros haplótipos, exceto o haplótipo 1, foram encontrados em apenas uma localidade. A localidade H apresentou dois haplótipos, enquanto em todas as demais ocorreu apenas um. O haplótipo 1 foi predominante tanto em número de indivíduos (49) como de localidades de ocorrência (sete, A-C, E-H) (Tabela 9).

O diagrama em rede dos haplótipos para os 115 indivíduos analisados de *S. delicatula* (Figura 7) revelou o haplótipo 1 como provável ancestral. O haplótipo 2 da localidade D conectou-se apenas com o ancestral, do qual diferiu em 1 pb. O haplótipo 4 da localidade J diferiu do 1 por 2 pb e pareceu ser o elo entre o haplótipo 1 e os haplótipos 3 e 5. Os haplótipos 6 e 7 diferiram entre si por 1 pb, mas apresentaram 15 pb de diferença em relação ao ancestral e situaram-se bem distante de todos os demais. Algumas tendências puderam ser evidenciadas nesta análise: 1) as localidades do estado de São Paulo mostraram-se como região central, de onde derivaram os demais haplótipos; 2) a variação dos haplótipos parece ter ocorrido em duas “rotas”, uma em direção ao estado do ES (localidades H a J), com divergência relativamente baixa em relação ao ancestral (2 a 4 pb); outra em direção à região centro-oeste (estados de MT e GO, localidades K a M) com divergência bem maior (15 a 16 pb).

A árvore de distância (NJ) das sequências de *cox*2-3 (Figura 8) mostrou a formação de dois grupos: um contendo os haplótipos 1 a 5 e dentro deste dois grupos menores (haplótipos 1 e 2, 3 a 5); outro contendo os haplótipos 6 e 7 dos estados de MT e GO). Os resultados desta análise evidenciaram claramente as

distâncias genéticas entre os haplótipos e foram essencialmente congruentes com os do diagrama em rede dos haplótipos desta espécie.

Tabela 9. Origem geográfica, número de indivíduos (n) de cada localidade e freqüência absoluta dos haplótipos da região espaçadora *cox*2-3 de *S. delicatula* no Brasil. Códigos das localidades conforme Tabela 2 e Figura 5.

		Haplótipos						
Localidades	**N**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
A	05	05						
B	05	05						
C	10	10						
D	11		11					
E	14	14						
F	07	07						
G	07	07						
H	11	01		10				
I	09					09		
J	10				10			
K	10						10	
L	07							07
M	09						09	
Total	115	49	11	10	10	09	19	07

Tabela 10. Haplótipos de *S. delicatula* definidos por 20 posições variáveis de nucleotídeos em 376 pb da região espaçadora *cox2-3*. A sequência para o haplótipo 1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos apenas para aquelas que diferem do haplótipo 1.

	Haplótipos						
Posições	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
45	T					G	G
84	G					T	T
99	C					T	T
138	T					C	C
189	T					C	C
195	A					T	T
252	C					T	T
254	T					C	C
261	G					A	A
269	G		C	C	C		
272	C					T	T
292	C					T	T
299	T						G
311	G					A	A
312	C		T	T	T		
315	C					T	T
331	C					T	T
344	T					C	C
350	T			G	A		
354	A	C			C		

Tabela 11. Matriz de divergência não corrigida para os haplótipos das sequências de *cox*2-3 de *S. delicatula*. A porção superior representa o número de pares de bases divergentes e a porção inferior representa a percentagem de diferença entre os haplótipos.

HAPLÓTIPO	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	-	1	2	2	4	15	16
2	0,3	-	3	3	3	16	17
3	0,6	1,1	-	1	2	18	19
4	0,6	0,8	0,3	-	2	17	18
5	1,1	0,8	0,6	0,6	-	19	20
6	4,0	4,3	4,8	4,6	5,1	-	1
7	4,3	4,6	5,1	4,8	5,4	0,3	-

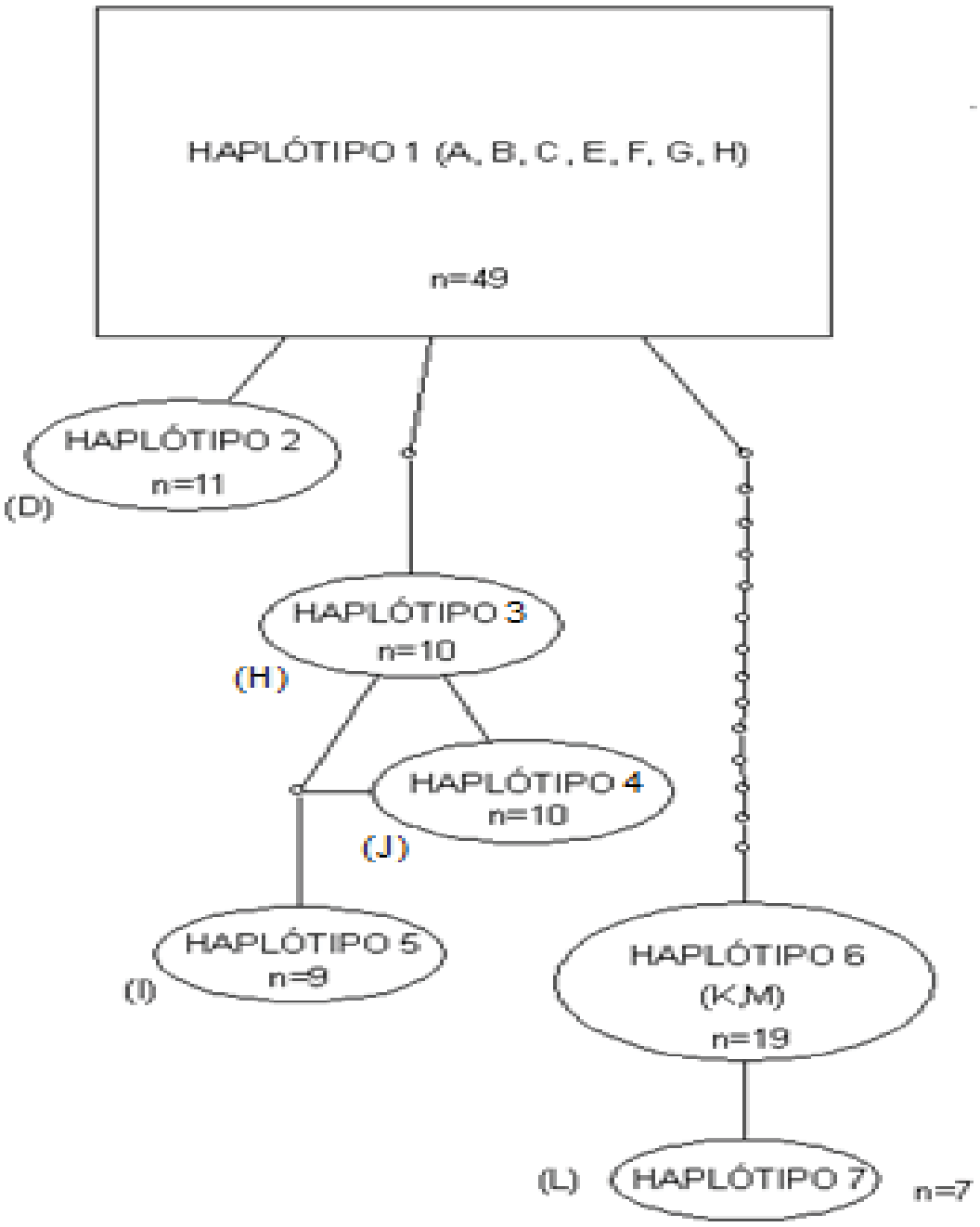


Figura 7. Diagrama em rede dos haplótipos de *S. delicatula* para *cox*2-3. Cada linha indica um passo mutacional; círculos pequenos indicam 1intermediário perdido; n= número de indivíduos idênticos. O retângulo indica o provável ancestral entre os haplótipos analisados. Códigos das localidades conforme Tabela 2 e Figura 2.

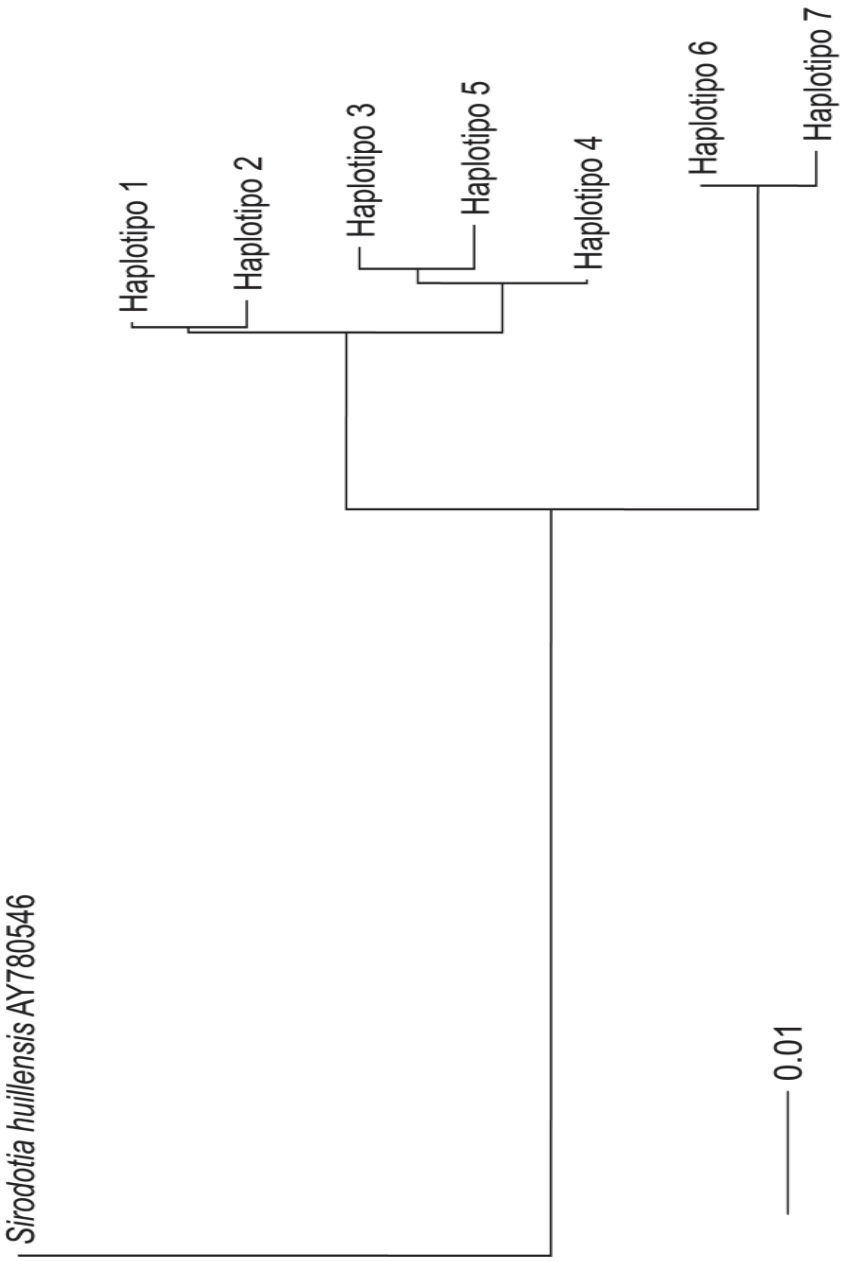


Figura 8. Árvore de distância (NJ) das análises dos haplótipos de *cox*2-3 de *Sirodotia delicatula* e táxon usado como grupo externo com número de acesso do GenBank. As designações dos haplótipos são mostradas na tabela 2.

Para os 29 indivíduos analisados, foram encontrados oito haplótipos para a região de “barcode” do gene *cox*1 nas 13 localidades amostradas (Tabela 12, Figura 2). As sequências dos haplótipos 1 a 8 apresentaram 664 pb e a divergência entre esses haplótipos foi de 1 a 56 pb (0,1 a 8,5%), com 73 posições variáveis (Tabelas 13 e 14, Anexo 4). Os haplótipos 2 a 5 diferiram do haplótipo 1 em apenas uma posição e dos haplótipos 6 a 8 em 48 (haplótipo 6), 55 (haplótipo 7) e 54 (haplótipo 8) pb . As localidades A, C, E e J apresentaram o mesmo haplótipo (1), sendo que em C e E foram encontrados ainda dois outros haplótipos (2 e 3; respectivamente) (Tabela 12). O haplótipo 5 foi encontrado em duas localidades (H e I), enquanto as demais localidades apresentaram apenas um haplótipo. Os haplótipos 7 e 8 divergiram do haplótipo 1 em (55 e 54 pb) mas entre eles a divergência foi de apenas um a um pb.

O diagrama em rede dos haplótipos gerado para os 29 indivíduos (Figura 9) revelou o haplótipo 1 como provável ancestral. Os haplótipos 2 a 5 conectaram-se apenas com o haplótipo 1, mas sem conexão entre eles. Os haplótipos 3 e 4 parecem ser o elo entre o provável ancestral e os haplótipos 6 a 8. Os haplótipos 6 a 8 foram nitidamente divergentes em relação a todos os demais; os haplótipos 7 e 8 conectaram-se entre si, ao passo que o haplótipo 6 apresentou conexão distante com intermediário perdido ao longo dessa linha de variação. No diagrama observa-se que os haplótipos com menor divergência situaram-se geograficamente mais próximos, e também uma tendência de variação em direção à região centro-oeste com haplótipos altamente divergentes.

A árvore de distância (NJ) das sequências de *cox*1 (Figura 10) mostrou a formação de dois grupos: um contendo os haplótipos 1 a 5; outro contendo os haplótipos 6 a 8 dos estados de MT e GO); dentro desse último houve a formação de um grupo menor, com os haplótipos 7 e 8. Os resultados desta análise evidenciaram claramente as distâncias genéticas entre os haplótipos e foram essencialmente congruentes com os do diagrama em rede dos haplótipos desta espécie.

Tabela 12. Origem geográfica, número de indivíduos (n) de cada localidade e freqüência absoluta dos haplótipos da região espaçadora *cox*1 de *S. delicatula* no Brasil. Códigos das localidades conforme Tabela 2 e Figura 5.

		Haplótipos							
Localidades	**n**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A	02	02							
C	03	01	02						
D	03				03				
E	03	02		01					
H	03					03			
I	03					03			
J	03	03							
K	03						03		
L	03							03	
M	03								03
Total	35	08	02	01	03	06	03	03	03

Tabela 13. Haplótipos de *S. delicatula* definidos por 73 posições variáveis de nucleotídeos em 664 pb da região espaçadora *cox*1. A seqüência para o haplótipo 1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos apenas para aquelas quediferem do haplótipo 1.

	Haplótipos																						
Haplótipos	**13**	**16**	**25**	**37**	**43**	**46**	**49**	**55**	**58**	**59**	**94**	**101**	**106**	**116**	**118**	**121**	**124**	**128**	**133**	**136**	**151**	**169**	**175**
1	G	C	A	G	T	T	T	G	T	C	T	C	T	T	A	T	T	C	A	T	A	A	T
2																							
3																		T					
4																							
5	A																						
6		T	G	A		C		A	C	T	C		C			C	C	T	T		G	G	G
7		T	G	A	C	C	C	A				T		C	G		C	T	T	A	G	G	G
8		T	G	A	C	C	C	A				T			G		C	T	T		G	G	G

Tabela 13. Continuação.

	Haplótipos																					
Haplótipos	**178**	**184**	**208**	**211**	**214**	**220**	**229**	**239**	**259**	**271**	**274**	**304**	**307**	**322**	**334**	**337**	**340**	**341**	**349**	**352**
1	C	C	A	T	C	T	A	G	T	A	G	T	A	C	T	G	A	G	A	C
2																		A		
3																				
4																				
5																				
6	T		G	G	T	C	G	T	C	G	A		G			A	G			T
7		T	T	A	T		G	T			A	C	G	G	C	A			G	T
8		T	T	A	T		G	T			A	C	G	G	C	A			G	T

Tabela 13. Continuação.

	Haplótipos																			
Haplótipos	**358**	**370**	**385**	**388**	**392**	**406**	**412**	**415**	**421**	**434**	**439**	**442**	**469**	**484**	**496**	**523**	**538**	**541**	**544**	**547**
1	C	T	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	C	C	T	T	T	A	T	C
2																				
3																				
4																				
5																				
6	T	C	T		T	T		A		T		A		T		C			A	T
7	T		T	T	T		T	A	T	T	C	A	T	T	C		C	G	A	T
8	T		T	T	T		T	A	T	T	C	A	T	T	C		C	G	A	T

Tabela 13. Continuação.

	Haplótipos									
Haplótipos	**556**	**559**	**568**	**571**	**580**	**587**	**598**	**616**	**628**	**652**
1	T	G	C	C	A	C	G	C	T	T
2										
3										
4		A								
5										
6		A	T	A	G		A	T	C	
7	C	A		A		T	A	T	C	C
8	C	A		A		T	A	T	C	C

Tabela 14. Matriz de divergência não corrigida para os haplótipos das sequências de *cox*1 de *S. delicatula*. A porção superior representa o número de pares de bases divergentes e a porção inferior representa a percentagem de diferença entre os haplótipos.

HAPLÓTIPO	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	1	1	1	1	48	55	54
2	0,1	-	2	2	2	49	56	55
3	0,1	0,3	-	2	2	47	54	53
4	0,1	0,3	0,3	-	2	47	54	53
5	0,1	0,3	0,3	0,3	-	49	56	55
6	7,2	7,4	7,1	7,1	7,4	-	41	40
7	8,3	8,5	8,1	8,1	8,5	6,2	-	1
8	8,1	8,3	8,0	8,0	8,3	6,0	0,1	-

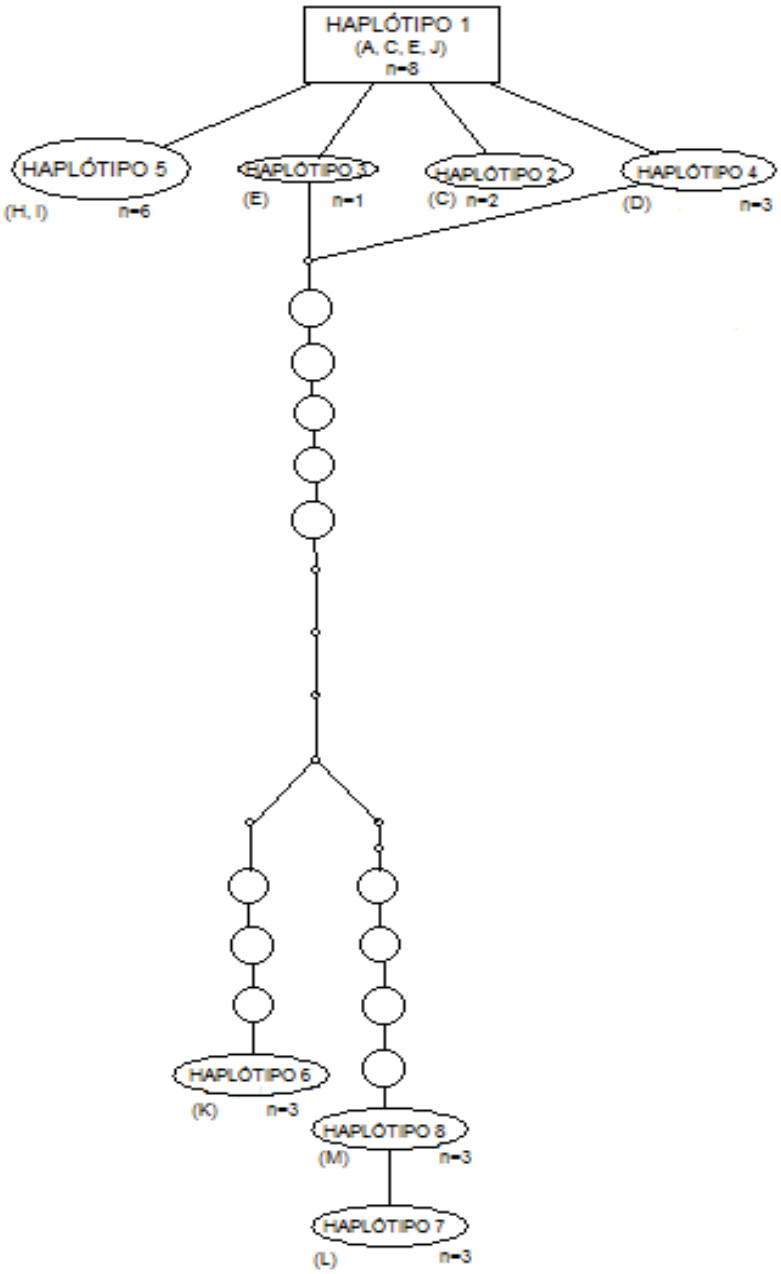


Figura 9. Diagrama em rede dos haplótipos de *S. delicatula* para *cox*1. Cada linha indica um passo mutacional; círculos pequenos indicam 1 intermediário perdido; círculos grandes indicam 5 intermediários perdidos;n= número de indivíduos idênticos. O retângulo indica o provável ancestral entre os haplótipos analisados. Códigos das localidades conforme Tabela 2 e Figura 5.

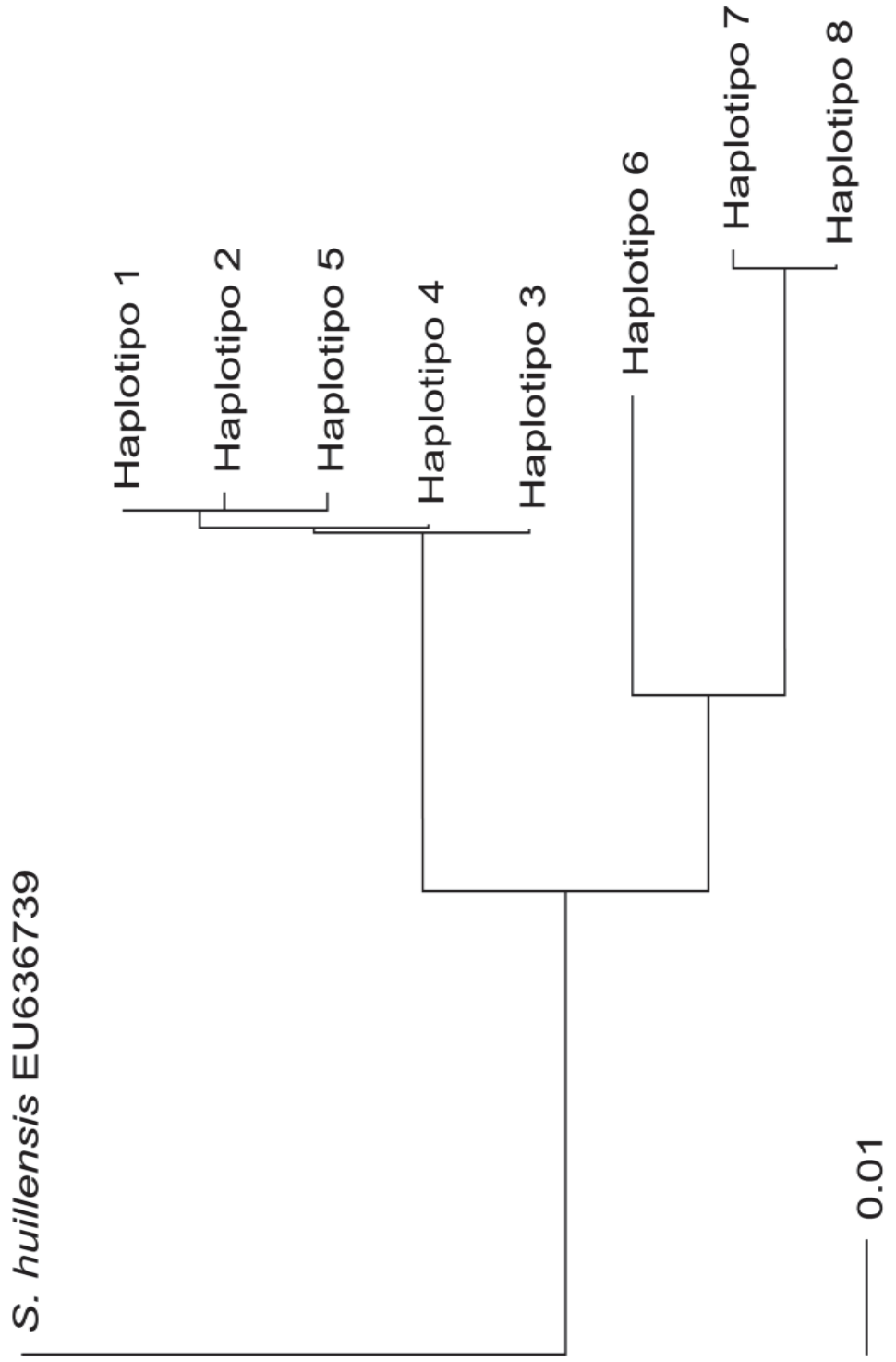


Figura 10. Árvore de distância (NJ) das análises dos haplótipos de *cox*1 de *Sirodotia delicatula* e táxon usado como grupo externo com número de acesso do GenBank. As designações dos haplótipos são mostradas na tabela 2.

DISCUSSÃO

Variação intraespecífica

B. helminthosum

O comprimento (376 pb) das sequências da região espaçadora *cox* 2-3 em *B. helminthosum* situou-se dentro da faixa relatada para as ordens de rodófitas (320 a 450 pb) (ZUCARELLO *et al*., 1999). Esse comprimento é um pouco maior que o observado em estudo para a mesma espécie na América do Norte, com 370 a 371 pb (CHIASSON *et al*., 2003), menor em relação a *B. arcuatum* para várias regiões do mundo (374 a 395 pb, VIS *et al.,* 2010), idêntico ao de *S. delicatula* (NECCHI & VIS, 2005) e maior que o de *B. macrosporum* para os haplótipos das Américas do Norte e do Sul (334 a 348 pb, VIS *et al*., 2008). Os sete haplótipos detectados em *B. helminthosum* apresentaram variação ≤ 2,4% (1 a 9 pb), a qual foi consideravelmente menor que a observada para a espécie na América do Norte (≤ 6,5%,1 a 24 pb, CHIASSON *et al.*, 2003). Apesar da ampla extensão geográfica abrangida nesse estudo (Rio Grande do Sul ao Espírito Santo), a menor variação entre os haplótipos pode estar relacionada ao número de populações amostradas (seis), sendo que na América do Norte 13 localidades foram amostradas.

A variação dos haplótipos de *B. macrosporum* da América do Sul (≤ 11,9%, 0 a 48 pb) VIS *et al*. (2008), foi muito maior em relação à de *B. helminthosum*, sendo que a distância entre os pontos amostrados foi maior, incluindo localidades do estado de São Paulo ao sul até Guiana Francesa ao norte.Em contrapartida, os haplótipos de *B. macrosporum* da América do Norte apresentaram uma variação muito menor (≤ 1,8 % 1 a 7 pb). É provável que a menor variação dos haplótipos da América do Norte tenha sido resultado da colonização de um hábitat apropriado a partir de um refúgio, dada a história geológica dessas áreas e também o padrão zoogeográfico semelhante observado em algumas espécies de outros organismos aquáticos, como peixes (VIS *et al*., 2008). A região amazônica na América do Sul é um centro de diversidade e talvez tenha servido de refúgio durante a última glaciação, assim como fonte de populações para colonizar outras regiões das Américas do Norte e do Sul (VIS *et al*., 2008).

Para a região de “barcode” do gene *cox*1, foram detectados seis haplótipos nos 23 indivíduos analisados, com variação de ≤ 1,6% (3 a 11 pb) e o comprimento

foi semelhante a outros estudos realizados com esse marcador para *B. helminthosum* (664 pb) (HOUSE *et al*., 2008, SHERWOOD *et al*., 2008, RUENESS, 2010) e também para *B. gelatinosum* (HOUSE *et al*., 2008). Rueness (2010) analisou quatro indivíduos da espécie em duas localidades da Noruega, os quais apresentaram a mesma composição nucleotídica. House *et al*. (2008) e Sherwood *et al.* (2008) analisaram 82 indivíduos da espécie na América do Norte, em 15 localidades diferentes, e encontraram 16 haplótipos para *cox*1, variando entre 0 a 44 pb (6,6%). No mesmo trabalho, Sherwood *et al*.(2008) analisaram 23 sequências de *B. macrosporum* para *cox*1, entre indivíduos da América do Norte e do Sul. As 17 sequências analisadas da América do Norte revelaram um clado bem definido (divergência de até 7 pb), enquanto as seis sequências da América do Sul se separaram em três linhagens diferentes (divergência de até 48 pb). A divergência encontrada neste estudo foi relativamente bem mais baixa quando comparada aos resultados daqueles trabalhos, com variação até quatro vezes maior.

Outro estudo intra-específico recente, utilizando a região “de barcode” do gene *cox*1 para *B. gelatinosum* na América do Norte, revelou a existência de cinco haplótipos (HOUSE *et al.*, 2010). Surpreendentemente, dos 193 indivíduos analisados, 175 apresentaram mesmo haplótipo, considerando-se a distribuição geográfica das localidades amostradas bastante abrangente, englobando desde a Nova Inglaterra ao sul (clima temperado), até a Ilha de Baffin ao norte (clima ártico). *B. helminthosum* ocorre no Brasil em regiões com clima predominantemente temperado ou subtropical, semelhante à distribuição na América do Norte, o que pode explicar o padrão encontrado de baixa variação. Esses resultados são congruentes aos obtidos em estudo realizado para a mesma espécie na América do Norte (CHIASSON *et al*., 2003), que mesmo com 54 indivíduos amostrados em uma única localidade (Ohio), foram identificados somente dois haplótipos de *cox*2-3 diferindo em 3 pb. Em contraponto, outra população (Tennessee) apresentou quatro haplótipos, ou seja, o dobro em relação às demais localidades amostradas, além de maior divergência entre os haplótipos (2 a 24 pb). Para explicar tal divergência, foram sugeridas duas possibilidades: 1) ocorrência de numerosos eventos de colonização; 2) a população pode ser mais antiga que as outras, com o local servindo de refúgio durante a última glaciação, assim como observado em espécies de plantas vasculares.

S. delicatula

Os haplótipos da região espaçadora *cox*2-3 de *S. delicatula* tiveram o mesmo tamanho daquele reportado em estudo anterior (18 indivíduos de três populações, NECCHI & VIS, 2005), com comprimento de 376 pb para todos os 115 indivíduos analisados para ao região espaçadora *cox*2-3. O haplótipo determinado como ancestral teve também a mesma composição nucleotídica do único haplótipo encontrado naquela investigação. Comparados ao haplótipo de *S. huillensis* (373 pb, AY780546, NECCHI & VIS, 2005) foram apenas 3 pb mais longos. Porém, em comparação com os haplótipos de outras espécies o comprimento das sequências foi relativamente diferente: *B. macrosporum* (334 a 348 pb) (VIS *et al*., 2008) e *B. helminthosum* da América do Norte (370 a 371 pb) (CHIASSON *et al*., 2003), foram 28 a 42 e 5 a 6 pb maiores, respectivamente. Em relação às sequências dos haplótipos encontrados para *B. arcuatum* se apresentou dentro da faixa de variação (374 a 395 pb) (VIS *et al.*, 2010).

Os sete haplótipos encontrados divergiram em ≤ 5,4% (1 a 20 pb) e apresentaram duas linhagens distintas: uma com os haplótipos encontrados no Espírito Santo, e outra com os haplótipos de Mato Grosso e Goiás. Essa variação pode ser comparada à observada em estudo para *B. helminthosum* na América do Norte, que apresentou variação de 0,3 a 6,5% (1 a 24 pb) para os 13 haplótipos encontrados para a região espaçadora *cox*2-3 (CHIASSON *et al*., 2003). Esses também mostraram duas linhagens diferentes, onde os haplótipos mais semelhantes geneticamente predominaram na maior parte das localidades amostradas para a espécie. Os autores sugeriram que o agrupamento desses haplótipos talvez tenha ocorrido através da dispersão por pequenas aves, mecanismo que também pode ser aplicado para explicar o padrão observado para *S. delicatula*. Entretanto, mecanismos de dispersão de espécies amplamente distribuídas de rodófitas continentais, particularmente representantes da ordem Batrachospermales, não foram estudados (SHEATH & HAMBROOK 1990). Geralmente as inferências para explicar padrões filogeográficos em espécies de *Batrachospermum* são feitas de forma especulativa (VIS *et al*., 2008; HOUSE *et al*., 2010) baseadas em mecanismos gerais para explicar distribuição e dispersão de outros grupos de organismos aquáticos.

Os dados das sequências de *cox*2-3 sugerem que a dispersão da espécie no Brasil teria partido de uma região mais central (estado de São Paulo, onde situa-se o haplótipo ancestral e outros próximos) e diferenciado-se em duas linhagens distintas: 1) numa região em direção ao leste do país, representada pelos haplótipos das populações do estado do Espírito Santo, com baixa variação (2 a 4 pb); 2) em direção à região centro-oeste do país, representada pelos haplótipos dos estados do Mato Grosso e de Goiás, com divergência muito mais elevada (15 e 16 pb). Em relação à segunda linhagem, constatou-se divergência elevada do provável ancestral, sugerindo a existência de intermediários nesse intervalo. Esses podem ser existentes e novas amostragens em riachos ao longo dessas extensões geográficas poderão confirmar a ocorrência de alguns desses haplótipos intermediários; outra possibilidade é que esses intermediários tenham sido extintos.

Considerando-se a região de "barcode" do gene *cox*1, os oito haplótipos encontrados apresentaram comprimento igual ao relatado para outras espécies de Batrachospermales (664 pb) (HOUSE *et al*., 2008, SHERWOOD *et al*., 2008, HOUSE *et al.,* 2010, RUENESS, 2010). Em trabalho de Sherwood *et al*. (2008), onde 65 indivíduos de várias espécies da ordem Batrachospermales foram analisados intraespecificamente, foi encontrada variação ≤10,1% (0 a 67 pb). Dentre as espécies analisadas foi incluída *S. huillensis*, utilizada como grupo externo em nossas análises. A divergência encontrada em *S. delicatula* (≤ 8,5%, 1 a 56 pb) é extremamente alta quando comparada à variação reportada para *B. gelatinosum* na América do Norte (≤ 0,6%, 1 a 4 pb, HOUSE *et al.*, 2010). A baixa divergência apresentada por essa espécie para os cinco haplótipos é altamente contrastante comparada a variação de *S. delicatula* encontrada neste trabalho. Esses resultados sugerem que as espécies em questão não compartilham estratégias adaptativas e histórias evolutivas semelhantes, e também podem ter sido afetadas de maneira diferente pela última glaciação e eventos de recolonização.

Variação interespecífica

As comparações feitas com base na variação genética das duas espécies desse trabalho para a região espaçadora *cox*2-3 e para região de “barcode” do gene *cox*1 revelou *S. delicatula* como a espécie com maior divergência, com variação de 0,3 a 5,4% (1 a 20 pb) para a região espaçadora cox2-3 e 0,1 a 8,5% (1 a 56 pb) para *cox*1. Já *B. helminthosum* apresentou uma variação bem menor para ambos os marcadores: para a região espaçadora *cox*2-3 diferiu 0,3 a 2,4% (1 a 9 pb) e 0,4 a 1,6% (3 a 11 pb) para *cox*1. A variação genética de *B. macrosporum* na América do Sul foi muito mais elevada comparada a *S. delicatula* (11,9%, 41 pb para sequências de cox2-3, VIS *et al*., 2008) e as localidades onde ambas as espécies foram amostradas consistiram de regiões com clima predominantemente tropical. Esses dados permitem supor que a variação genética para espécies de ocorrência em clima predominantemente tropical seja mais elevada.

Estudos com outras espécies com mesmo padrão de distribuição permitirão avaliar se trata-se de uma tendência para espécies de distribuição tropical. *Sirodotia delicatula* também foi a espécie que apresentou o maior número de localidades amostradas, assim como distribuição geográfica mais ampla, o que pode explicar a maior divergência em relação a outra espécie analisada neste estudo. Porém, trabalhos realizados na América do Norte, que também abrangeram grandes áreas geográficas, como *B. gelatinosum* (HOUSE *et al*., 2010) e *B. helminthosum* (CHIASSON *et al.*, 2003), revelaram diferentes padrões. *B. gelatinosum* apresentou variação genética relativamente baixa no continente norte-americano. A baixa variação para essa espécie pode ser explicada pelo fato de que um riacho é inicialmente colonizado por apenas alguns indivíduos e a diversidade genética é provavelmente limitada por eventos de colonização, que são raros e aleatórios (NECCHI & VIS, 2005), o que pode também explicar a baixa variação de *B. helminthosum* neste estudo.

Os resultados obtidos corroboraram uma das hipóteses iniciais, de que ambas as espécies apresentam grande diversidade genética para os dois marcadores com maior divergência inter do que intrapopulacional e que as populações mais distantes geograficamente apresentariam maiores divergências entre si, padrão que se coaduna com os dados obtidos para *B. helminthosum* e *S. delicatula.* Divergências interespecíficas são geralmente mais elevadas que em níveis intraespecíficos. Em

estudo realizado por Sherwood *et al*. (2008) para a ordem Batrachospermales, a divergência intraespecífica encontrada foi ≤ 6,6% (0 a 44 pb) para *B. helminthosum*, e ≤ 10,1% (0 a 67 pb) para *B. macrosporum*. Já em abordagem interespecífica deste estudo, nove espécies de *Batrachospermum* da seção *Contorta* foram analisadas para a região de "barcode" do gene *cox*1, e as divergências entre as espécies foi de 3,2 a 13,1%, 21 a 87 pb. Essa maior variação tanto para *B. macrosporum* como para *S. delicatula*, ambas amostradas na América do Sul, pode ser explicada talvez pelo fato de as localidades amostradas*,* são de clima predominantemente tropical, além da ampla distribuição geográfica.

A segunda hipótese deste trabalho também pôde ser confirmada, visto que as espécies apresentaram padrões filogeográficos diferentes, relacionados a distribuição geográfica distinta das espécies. Para *B. helminthosum*, a variação genética foi menor quando comparada a *S. delicatula,* sendo que esse resultado pode ser explicado pela ocorrência em clima temperado ao subtropical, bem como de um menor número de localidades amostradas (seis para *B. helminthosum* e 13 para *S. delicatula*).

As análises da variação intraespecífica das sequências da região espaçadora *cox*2-3 e da região de "barcode" *cox*1, considerando-se tanto os diagramas em rede dos haplótipos como as árvores de distância, foram congruentes em ambas as espécies. Esses resultados corroboram as conclusões de House *et al.* (2008) de que os resultados com base nas sequências de *cox1* são comparáveis aos de *cox2-3* para estudos filogeográficos, visto que os diagramas de associação dos haplótipos foram semelhantes e mostraram os mesmos padrões geográficos. Além disso, indicam que os dois marcadores podem ser usados de maneira confiável para inferir padrões filogeográficos em espécies de Batrachospermales.

A partir dos resultados obtidos, pode-se supor que amostragens em extensões geográficas mais amplas tenderão a revelar variações genéticas intraespecíficas maiores para as duas espécies estudadas nesse trabalho. Além disso, abordagens futuras em extensões continentais ou intercontinentais serão relevantes para melhor entendimento dos padrões filogeográficos em espécies de Batrachospermales.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., WARREN, G., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., v. 215, p. 403-410, 1990.

AVISE, J.C. Phylogeography: the history and formation of species. Cambrige, Cambridge Univ. Press. 447,2000.

CHIASSON, W.B., MACHESKY, N.J. & VIS, M.L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta) in North America. Phycologia, v. 42, p. 654-660, 2003.

CLEMENT, M., POSADA, D. & CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol., v. 9, p. 1657-1659, 2000.

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

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. & GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Research 8:175-185, 1998a.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. & GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Research 8:186-194, 1998b.

FAMÀ, P., OLSEN, J.L., STAM, W.T. &PROCACCINI,G..High levels of intra- and inter-individual polymorphism in the rDNA ITS1 of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta).Eur. J. Phycol., v. 35, p. 349-356, 2000.

FREELAND, J.R. Molecular Ecology. Chichester, John Wiley & Sons.388 p. 2005.

HALL, M.M. & VIS, M.L. Genetic variation in *Batrachospermum helminthosum*(Batrachospermales, Rhodophyta) among and within stream reaches using inter simple sequence repeat molecular markers. Phycolog. Res., v.50, p. 155-162, 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.

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. Phycol. Res., v. 56, 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, p.501-507, 2010.

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

KYLIN, S. Studien über die Schwedischen Arten der Gattungen *Batrachospermum* Roth und *Sirodotia* nov. gen. *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups.* Ser. IV, 3: 1-40, 1912.

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

NECCHI, O. Jr. & ENTWISLE, T. J. A reappraisal of generic and subgeneric classification in the Batrachospermaceae (Rhodophyta). Phycologia 29:478–88. 1990.

NECCHI, O. Jr. The Section *Sirodotia* of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermaceae) in Brazil.Algol.Stud.,v. 62, p. 17-30, 1991.

NECCHI, O. Jr. Microhabitat and plant structure of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) populations in four streams of São Paulo State, southeastern Brazil. Phycolog. Res., v. 45, p. 39-45, 1997.

NECCHI, O. Jr. & VIS, M.L. Reproductive ecology of the freshwater red alga *Batrachospermumdelicatulum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in three tropical streams. Phycolog. Res., v. 53, p. 194-200, 2005.

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

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

ROZAS, J.,SÁNCHEZ-DEL BARRIO, J. C., MESSENGER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, v.5.2010.

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

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.

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

SERRÃO, E., ALICE, L.A. & BRAWLEY,S.H. Evolution of the Fucaceae (Phaeophyceae) inferred from nrDNA-ITS. J. Phycol., v. 35, p. 382-394, 1999.

SHEATH, R.G. & HAMBROOK, J.A. Freshwater ecology. In: The biology of the red algae (Ed. by K.M. Cole & R.G. Sheath), Cambridge University Press, New York, p. 455–476, 1990.

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

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

SIRODOT, S. 1873. Nouvelle classification des algues d"eau douce du genre *Batrachospermum*: développement; generations alternantes. **C.R. Acad. Sci. Paris** 76: 1216-20.

SWOFFORD, D.L. PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods).Version 4.Sunderland, Sinauer Associates, 2003.

TEMPLETON, A.R., CRANDALL, K.A. & SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. Genetics, v. 132, p. 619-633, 1992.

THIERS, B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium.2011. http://sweetgum.nybg.org/ih/

VIS, M.L. & SHEATH, R.G. Biogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America in North America based on molecular and morphological data. J. Phycol., v. 33, p. 520-526, 1997.

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

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

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, v. 40, p. 2-9, 2001.

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

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

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

ZUCCARELLO, G.C., BURGER, G., WEST, J.A., & KING, R.J. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. Mol. Ecol.,v.8,p. 1443-1447, 1999.

ANEXOS

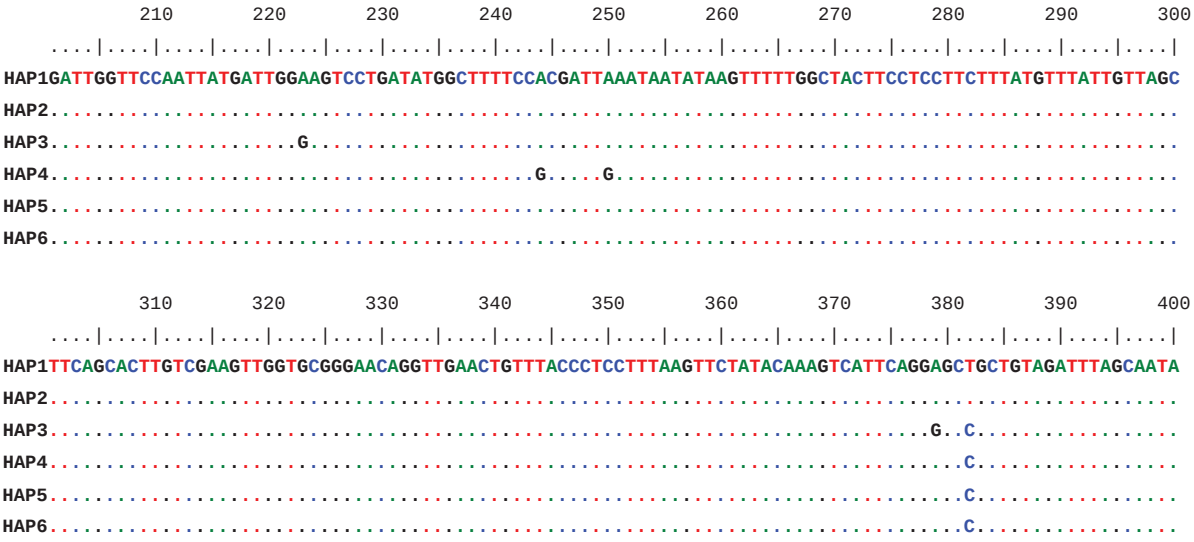
Anexo 1. Seqüências de bases para *cox*2-3 de *B. helminthosum*. Os quatro nucleotídeos estão representados por suas iniciais (A-Adenina; C-Citosina; G-Guanina; T-Timina). Pontos (.) referem-se a nucleotídeos idênticos aos da seqüência guia.

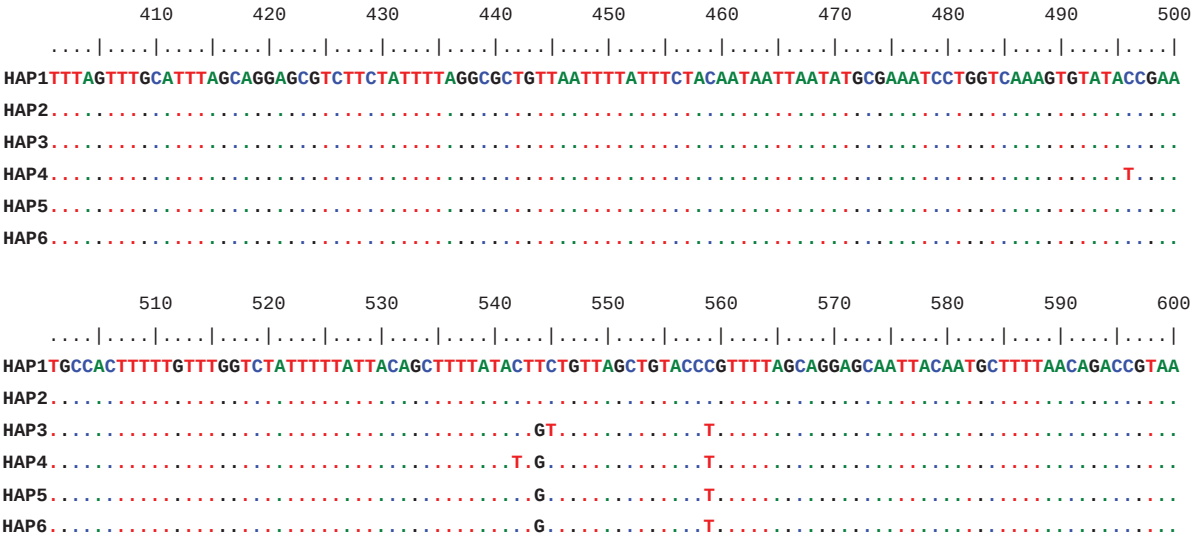
```
             10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1TATACCAGGTCGTTTAAACCAGGTTTCAATATTTATTAAACGAGAAGGTTTATATTTTGGACAATGTAGTGAACTTTGTGGTATTAATCATGGATTCATG
HAP2.....................................................................................................
HAP3.....................................................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5.....................................................................................................
HAP6.....................................................................................................
HAP7.....................................................................................................

            110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1CCAATTGTAGTTGAAGCAGTTTCTCTTCCAAATTATATAACTTGAGTTTATAATAAATTAAGTGATTAATTATGAGACTGTCTTTAATTCAAATTTTAAT
HAP2.....................................................................................................
HAP3.....................................................................................................
HAP4..........................................C..........................................................
HAP5.....................................................................................................
HAP6..........................................C.............G...........................................
HAP7..........................................C.............G.........T.................................
```

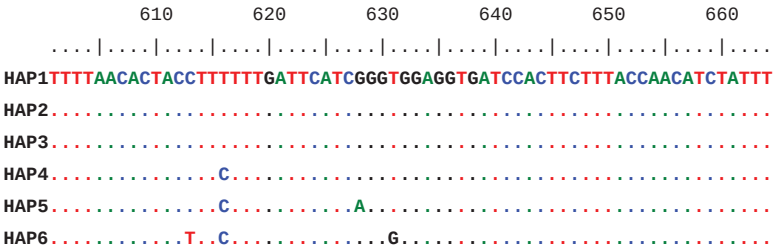
```
            210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1ACTTATAATTTTATTTATCGCTGTATTTTGAGTTAAACCTTTTTCTTTAAATATTTTTATAAATAAAATTAAACAGCTATTAAAAAATAAATAAAGAAGA
HAP2.....................................................................................................
HAP3.................T.....................................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5.............G.T.....................................................................................
HAP6.................T.....................................................................................
HAP7.................T.....................................................................................

            310       320       330       340       350       360       370
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
HAP1TTACAAAGTTTTTATATCAAAAATAAAATTATAATAAAATGAATTATTTAGTAAAAGTTTTAAAAATCTACCCAAC
HAP2.....................................A.....................................
HAP3.....................................................................
HAP4.................................C.....................................
HAP5.................T.............C.....................................
HAP6.................................C.....C.....................
HAP7.................................T.....C.....................
```

Anexo 2. Seqüências de bases para *cox*1 de *B. helminthosum*. Os quatro nucleotídeos estão representados por suas iniciais (A-Adenina; C-Citosina; G-Guanina; T-Timina). Pontos (.) referem-se a nucleotídeos idênticos aos da seqüência guia.

```
             10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1AACTTTGTATTTAATTTTTGGTACTTTTTCAGGAGTATTAGGTGGATGTATGTCTATTTTAATTCGTATGGAATTATCGCAACCAGGTAACCATTTACTA
HAP2.....................................................................C.........G....................
HAP3.....................................................................C.........G....................
HAP4.....................................................................C.........G....................
HAP5.....................................................................C.........G....................
HAP6.....................................................C...........C.........G........G..............

            110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1TTGGGTAACCATCAAGTATATAATGTATTAATTACAGCTCATGGTTTTTTAATGGTTTTTTTTATGGTTATGCCTATACTTATAGGAGGTTTTGGTAATT
HAP2............C.....................................................................................
HAP3.....................................................................................
HAP4............C.....................................................................................
HAP5.....................................................................................
HAP6................C....................................................................................
```

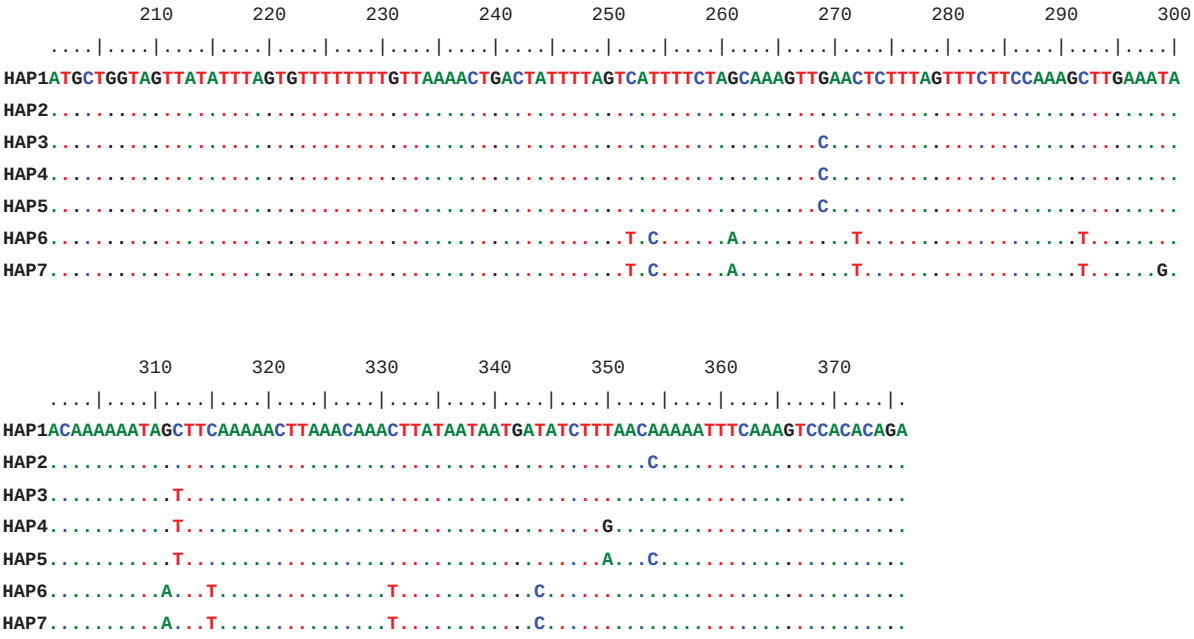

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
HAP1GATTGGTTCCAATTATGATTGGAAGTCCTGATATGGCTTTTCCACGATTAAATAATATAAGTTTTTGGCTACTTCCTCCTTCTTTATGTTTATTGTTAGC
HAP2
HAP3 G
HAP4 G G
HAP5
HAP6
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
HAP1TTCAGCACTTGTCGAAGTTGGTGCGGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTAAGTTCTATACAAAGTCATTCAGGAGCTGCTGTAGATTTAGCAATA
HAP2
HAP3 G C
HAP4 C
HAP5 C
HAP6 C


410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
HAP1 TTTAGTTTGCATTTAGCAGGAGCGTCTTCTATTTTAGGCGCTGTTAATTTTATTTCTACAATAATTAATATGCGAAATCCTGGTCAAAGTGTATACCGAA
HAP2
HAP3
HAP4 T
HAP5
HAP6
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
HAP1 TGCCACTTTTTGTTTGGTCTATTTTTATTACAGCTTTTATACTTCTGTTAGCTGTACCCGTTTTAGCAGGAGCAATTACAATGCTTTTAACAGACCGTAA
HAP2
HAP3 GT T
HAP4 T G T
HAP5 G T
HAP6 G T


610 620 630 640 650 660
HAP1 TTTTAACACTACCTTTTTTGATTCATCGGGTGGAGGTGATCCACTTCTTTACCAACATCTATTT
HAP2 .....
HAP3 .....
HAP4 .....C.....
HAP5 .....C.....A.....
HAP6 .....T..C.....G.....

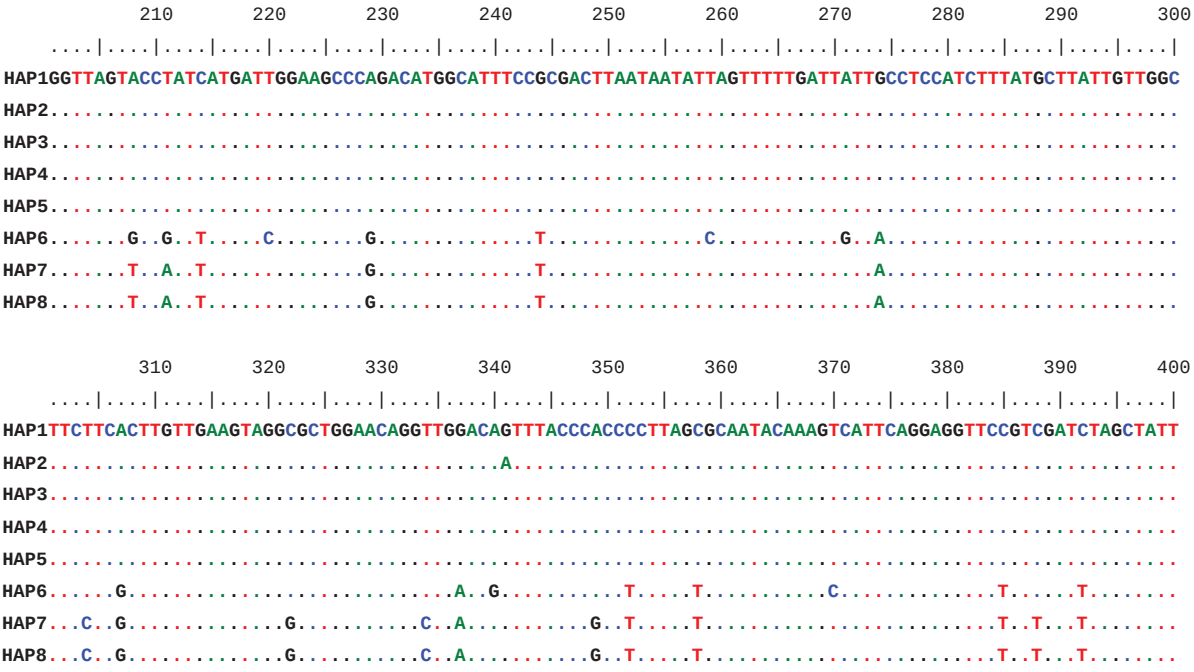
Anexo 3. Seqüências de bases para *cox*2-3 de *S. delicatula*. Os quatro nucleotídeos estão representados por suas iniciais (A-Adenina; C-Citosina; G-Guanina; T-Timina). Pontos (.) referem-se a nucleotídeos idênticos aos da seqüência guia.

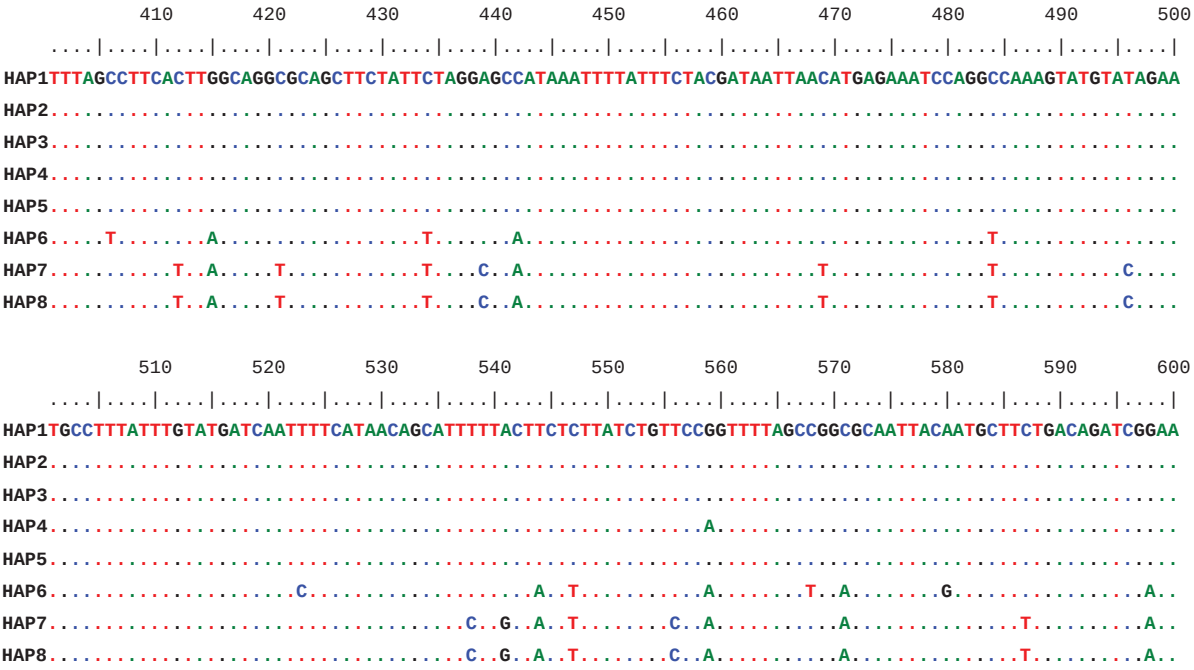
```
             10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1GCTGTCCCTGGTCGTTTAAATCAAACTTCCATGTTTGTAAAACGTGAAGGTTTATATTATGGTCAATGTAGCGAAATATGTGGGATAAATCATGGTTTCA
HAP2.....................................................................................................
HAP3.....................................................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5.....................................................................................................
HAP6.....................................G.....................................T.............T.
HAP7.....................................G.....................................T.............T.
HAP8
            110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1TGCCTATAGTAGTTGAAGCTGTAGCTTTACCAAATTATGTAACTTGAATTTATAATAAATTGTATACTCAATAATGCGTCTTTCTATATTCCAAATTTTA
HAP2.....................................................................................................
HAP3.....................................................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5.....................................................................................................
HAP6.....................................C.....................................C.....T.....
HAP7.....................................C.....................................C.....T.....
```

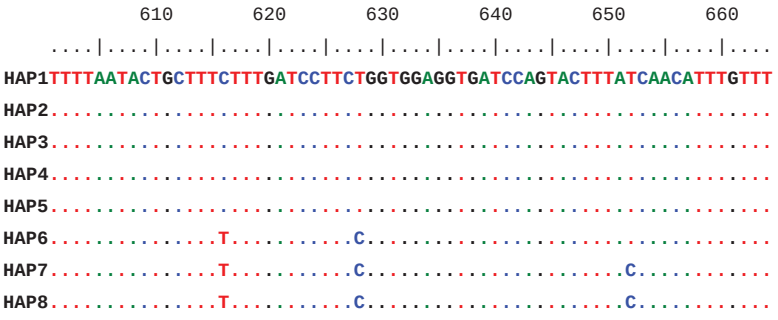

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
HAP1ATGCTGGTAGTTATATTTAGTGTTTTTTTTGTTAAAACTGACTATTTTAGTCATTTTCTAGCAAAGTTGAACTCTTTAGTTTCTTCCAAAGCTTGAAATA
HAP2
HAP3 C
HAP4 C
HAP5 C
HAP6 T C A T T C
HAP7 T C A T T G
310 320 330 340 350 360 370
HAP1ACAAAAAATAGCTTCAAAAACTTAAACAAACTTATAATAATGATATCTTTAACAAAAATTTCAAAGTCCACACAGA
HAP2 C
HAP3 T
HAP4 T G
HAP5 T A C
HAP6 A T T C
HAP7 A T T C

Anexo 4. Seqüências de bases para *cox*1 de *S. delicatula*. Os quatro nucleotídeos estão representados por suas iniciais (A-Adenina; C-Citosina; G-Guanina; T-Timina). Pontos (.) referem-se a nucleotídeos idênticos aos da seqüência guia.

```
            10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1CACTTTATACTTGATCTTTGGTACATTTTCTGGAGTGCTTGGTGGTTGTATGTCGCTTCTAATTAGAATGGAATTAATGCAACCAGGTAATCATTTTTTG
HAP2.....................................................................................................
HAP3.....................................................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5...........A.........................................................................................
HAP6..............T........G...........A........C........A..CT.....................................C......
HAP7..............T........G...........A.....C..C..C.....A.....................................
HAP8..............T........G...........A.....C..C..C.....A.....................................

            110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
HAP1CTGGGTAATCATCAGTTATATAATGTGCTAATAACTGCACATGCATTTTTAATGATTTTTTTTATGGTAATGCCTATCATGATCGGTGGGTTTGGTAACT
HAP2.....................................................................................................
HAP3.........................T...........................................................................
HAP4.....................................................................................................
HAP5.....................................................................................................
HAP6.....C.............C......T...T..A.............G.....................G..T.....................
HAP7T............C.G.....C...T....T.................G.................G.....G........T.................
HAP8T..............G.....C...T....T.................G.................G.....G........T.................
```


210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
HAP1 GGTTAGTACCTATCATGATTGGAAGCCCAGACATGGCATTTCCGCGACTTAATAATATTAGTTTTTGATTATTGCCTCCATCTTTATGCTTATTGTTGGC
HAP2 .....
HAP3 .....
HAP4 .....
HAP5 .....
HAP6 ......G..G..T.....C........G..............T..............C...........G..A.....
HAP7 ......T..A..T..............G..............T.............................A.....
HAP8 ......T..A..T..............G..............T.............................A.....
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
HAP1 TTCTTCACTTGTTGAAGTAGGCGCTGGAACAGGTTGGACAGTTTACCCACCCCTTAGCGCAATACAAAGTCATTCAGGAGGTTCCGTCGATCTAGCTATT
HAP2 ....A.....
HAP3 .....
HAP4 .....
HAP5 .....
HAP6 ......G.............................A..G...........T.....T...........C..............T......T........
HAP7 ...C..G..............G...........C..A...........G..T.....T.....................T..T...T........
HAP8 ...C..G..............G...........C..A...........G..T.....T.....................T..T...T........


410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
HAP1 TTTAGCCTTCACTTGGCAGGCGCAGCTTCTATTCTAGGAGCCATAAATTTTATTTCTACGATAATTAACATGAGAAATCCAGGCCAAAGTATGTATAGAA
HAP2 ....
HAP3 ....
HAP4 ....
HAP5 ....
HAP6 .....T.....A.....T.....A.....T.....
HAP7 .....T..A.....T.....T....C..A.....T.....T.....C....
HAP8 .....T..A.....T.....T....C..A.....T.....T.....C....
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
HAP1 TGCCTTTATTTGTATGATCAATTTTCATAACAGCATTTTTACTTCTCTTATCTGTTCCGGTTTTAGCCGGCGCAATTACAATGCTTCTGACAGATCGGAA
HAP2 ....
HAP3 ....
HAP4 .....A.....
HAP5 ....
HAP6 .....C.....A..T.....A.....T..A.....G.....A..
HAP7 .....C..G..A..T.....C..A.....A.....T.....A..
HAP8 .....C..G..A..T.....C..A.....A.....T.....A..


610 620 630 640 650 660
HAP1 TTTTAATACTGCTTTCTTTGATCCTTCTGGTGGAGGTGATCCAGTACTTTATCAACATTTGTTT
HAP2 ...
HAP3 ...
HAP4 ...
HAP5 ...
HAP6 ...T.....C...
HAP7 ...T.....C.....C...
HAP8 ...T.....C.....C...