

**FILOGENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ESPÉCIES DOS
GÊNEROS DE ALGAS VERMELHAS CONTINENTAIS *KUMANOA*,
PALUDICOLA E *SHEATHIA* (BATRACHOSPERMALES, RHODOPHYTA)**

YASMIN MARIA DA SILVA LOPES CAIRES

MESTRADO

**PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José
do Rio Preto

FILOGENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ESPÉCIES DOS
GÊNEROS DE ALGAS VERMELHAS CONTINENTAIS *KUMANOA*,
***PALUDICOLA* E *SHEATHIA* (BATRACHOSPERMALES, RHODOPHYTA)**

YASMIN MARIA DA SILVA LOPES CAIRES

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade, Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Instituto
de Biociências, Letras e Ciências
Exatas, São José do Rio Preto, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biodiversidade

Área de Concentração:
Sistemática e Evolução

Orientador (a): Prof. Dr. Orlando
Necchi Jr

Coorientadora: Profa. Dra. Nádia
Martins Lemes Da Silva

São José do Rio Preto
Fevereiro de 2026

C136f

Caires, Yasmin

Filogenômica e caracterização genômica de espécies dos gêneros de algas vermelhas continentais Kumanoa, Paludicola e Sheathia (Batrachospermales, Rhodophyta) /

Yasmin Caires. -- São José do Rio Preto, 2025

70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Orlando Necchi Jr

Coorientadora: Nádia Martins Lemes da Silva

1. Sistemática e Evolução. I. Filogenômica e caracterização genômica de espécies dos gêneros de algas vermelhas continentais Kumanoa, Paludicola e Sheathia (Batrachospermales, Rhodophyta)

YASMIN MARIA DA SILVA LOPES CAIRES

**FILOGENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ESPÉCIES DOS
GÊNEROS DE ALGAS VERMELHAS *CONTINENTAIS KUMANOA*, *PALUDICOLA*
E *SHEATHIA* (BATRACHOSPERMALES, RHODOPHYTA)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade.

Área de Concentração: Sistemática e Evolução

Data da defesa: 14/11/2025

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

ORLANDO NECCHI JUNIOR

Data: 17/11/2025 21:12:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Orlando Necchi Jr

UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dra. Mariana Cabral de Oliveira

USP - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto

UFRJ – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Goia de Mattos Lyra

UFRJ – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jefferson Prado

Instituto de Pesquisas Ambientais

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Necchi Jr., minha gratidão pelos ensinamentos, incentivo e orientação, para que pudéssemos concluir este trabalho. A minha coorientadora: Profa. Dra. Nádia Martins Lemes Da Silva pelas contribuições e ensinamentos compartilhados.

Agradeço ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, pelo espaço fornecido e contribuições.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado Proc: 2022/12124-5.

Aos colegas do Laboratório B.E.T.A. (Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas) pelo convívio e auxílio nesse trabalho.

À minha família, em especial, meu esposo William e filho Anthony pela paciência e entusiasmo em todo o processo do trabalho.

RESUMO

As informações atualmente disponíveis da organização genômica das algas vermelhas de água doce da ordem Batrachospermales são esparsas, principalmente, por esse ser o grupo mais diverso em termos de morfologia, caracteres reprodutivos e número de táxons entre as ordens de algas vermelhas exclusivamente de água doce. O estudo realizou análise filogenômica e caracterização genômica de plastomas e mitogenomas de espécies dos gêneros *Kumanoa*, *Paludicola* e *Sheathia*, selecionados por apresentarem maior número de espécies da ordem, filogeneticamente distantes e ampla distribuição geográfica. Os objetivos foram: 1) descrever as características dos genomas plastidiais e mitocondriais de espécies dos três gêneros que constituem clados bem divergentes na filogenia conhecida da ordem; 2) inferir relações filogenéticas com base no conjunto de genes dos genomas desses representantes com os já descritos para outros gêneros; 3) conhecer a diversidade genômica de espécies selecionadas dos três gêneros. As hipóteses testadas foram: 1) o posicionamento filogenético distante entre cada um dos três gêneros será confirmado pelo fato de serem distantes filogeneticamente com base nas informações anteriormente disponíveis; 2) as maiores diferenças serão observadas entre os genomas dos três gêneros do que dentro de cada gênero por serem relativamente distantes filogeneticamente pelos critérios comparativos das características dos genomas organelares. Evidenciamos que nos genomas organelares de todas as Batrachospermales são altamente conservados, sem perdas gênicas relevantes, com poucos rearranjos, seguindo a tendência de outros grupos da classe Florideophyceae. No entanto, algumas características relevantes foram reveladas neste estudo: conjunto de dados dos mitogenomas mostrou que para todos os parâmetros da estrutura genômica houve maior variação entre os gêneros do que dentro de cada um deles corroborando a hipótese de que as maiores diferenças seriam observadas entre os genomas dos três gêneros do que dentro de cada um. Além disso, houve maior proximidade nas médias da estrutura genômica dos gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* do que em *Sheathia*. Destaca-se ocorrência de uma pequena região divergente nas espécies de *Kumanoa*, configurando uma exceção relevante em relação aos demais representantes da ordem podendo representar um marcador genômico de valor taxonômico. Nos plastomas, importante ressaltar ausência do gene *apcF* em todos os táxons sequenciados de Batrachospermales podendo ser interpretada como uma perda em todos representantes da ordem ou alternativamente há possibilidade do gene ter sido transferido para o núcleo, mas há necessidade de maior aprofundamento para avaliar esta possível perda gênica de todos membros da ordem. Entre os três gêneros de interesse deste estudo, não foram encontradas correlações significativas nos parâmetros descritivos da estrutura genômica. Em *Paludicola*, somente o comprimento da região intergênica teve maior amplitude na estrutura do plastoma, mas para demais parâmetros evidenciada menor amplitude em comparação aos outros dois gêneros. Análises filogenéticas baseadas em dados concatenados de

nucleotídeos dos genomas organelares mostrou dois clados dentro das Batrachospermales (denominados grupos 1 e 2), também recuperados em estudos anteriores. Os gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* foram classificados no grupo 1, mas relativamente distantes, enquanto o gênero *Sheathia* foi incluído no grupo 2. Estas análises filogenéticas de membros da ordem Batrachospermales, corroboraram a hipótese do posicionamento filogenético distante dos três gêneros.

Palavras-chave: algas vermelhas de água doce; Batrachospermales; estrutura genômica; filogenômica; mitogenoma; plastoma.

ABSTRACT

Current available information on the genomic organization of the freshwater red algae belonging to the order Batrachospermales remains scarce, largely due to the group remarkable diversity in morphology, reproductive features, and taxonomic richness among the exclusively freshwater red algal orders. In this study, we conducted phylogenomic analyses and genomic characterization of plastid and mitochondrial genomes of species from the genera *Kumanoa*, *Paludicola*, and *Sheathia*, which were selected for their higher number of species in the order, phylogenetic distance, and wide geographic distribution. The aims of this investigation were: 1) to describe the plastid and mitochondrial genome features of species from the three genera, which represent highly divergent clades in the known phylogeny of the order; 2) to infer phylogenetic relationships based on their gene sets in comparison with those already described for other genera; 3) to assess the genomic diversity of selected species from the three genera. The hypotheses tested were: 1) the distant phylogenetic placement of the three genera will be corroborated given their phylogenetic distance based on the known phylogeny of the order; 2) higher differences will be observed among the genomes of the three genera than within each genus, reflecting their relatively distant phylogenetic affinities based on the comparative analyses of organellar genome characteristics. Our results showed that the plastid and mitochondrial genomes of all Batrachospermales are highly conserved, exhibiting no significant gene loss and only few rearrangements, consistent with the other groups of the class Florideophyceae. Nevertheless, some relevant features were revealed. The mitogenome dataset showed that all genomic structure parameters exhibited higher variation among genus than within them. Moreover, the mean genomic structure values of the genera *Kumanoa* and *Paludicola* were closer than those of *Sheathia*. A particular distinct feature was the presence of a small divergent region in the *Kumanoa* species stands out, which was an important within the order that may represent a genomic marker of taxonomic value. A notable finding of this study is the absence of the *apcF* gene in the plastomes of all sequenced taxa of Batrachospermales. The lack could represent a gene loss event shared by all members of the order, or alternatively, suggest that *apcF* was transferred to the nuclear genome. In *Paludicola*, the only parameter showing a wider range was the length of the intergenic region, whereas the ranges for other parameters were lower compared to *Kumanoa* and *Sheathia*. Phylogenetic analyses based on concatenated organellar nucleotide sequences revealed two clades within Batrachospermales (designated as groups 1 and 2), consistent with previous studies. The genera *Kumanoa* and *Paludicola* were classified in group 1, although not as closely related to each other, while *Sheathia* belonged to group 2. These results corroborated the hypothesis of the distant phylogenetic relationship among the three genera within the order Batrachospermales.

Keywords: freshwater red algae, Batrachospermales, genome structure, genomics, mitochondrial genomes, phylogenomics, plastid genome.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	61
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

As algas vermelhas (Rhodophyta) são um grupo diversificado de cerca de 7.276 espécies de eucariotos fotossintéticos, com o primeiro registro fóssil, de 1,2 bilhões de anos, atribuído a *Bangiomorpha pubescens* (Butterfield 2000; Guiry & Guiry 2025). A maioria das algas vermelhas habita ambientes marinhos (95%), sendo que a outra parcela ocorre em água doce ou águas termais ácidas, além de alguns representantes ocuparem florestas tropicais como membros da comunidade aerofítica (Gurgel & Lopez-Bautista 2007; Vis & Necchi 2021). Este filo é composto por sete classes (Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Cyanidiophyceae, Florideophyceae, Phorphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae), sendo que, a maioria das espécies (6.879, Guiry & Guiry 2025) pertence a classe Florideophyceae, a qual está dividida em cinco subclasses: Hildenbrandiophycidae, Nemaliophycidae, Corallinophycidae, Ahnfeltiophycidae e Rhodymeniophycidae (Saunders & Hommersand 2004; Yoon et al. 2006; Yang et al. 2016). Apenas Nemaliophycidae contém ordens compostas por táxons exclusivos de água doce – Balbianiales, Batrachospermales e Thorealess (Lam et al. 2015; Yang et al. 2016; Vis & Necchi 2021). Essas três ordens são relativamente distantes filogeneticamente (Lam et al. 2015), mas as relações filogenéticas entre essas ordens de água doce e outras ordens marinhas de Nemaliophycidade ainda não foram resolvidas.

Na busca por investigar a filogenia de Nemaliophycidae, Lam et al. (2015) concluíram em sua análise filogenômica de um conjunto de sequências de nove genes compostos por genomas nucleares, plastidiais e mitocondriais, que somente algumas ordens de Nemaliophycidade (Nemaliales, Entwisleiales, Colaconematales, Palmariales e Acrochaetiales) formaram clados consistentes. Em contraste, todas as outras relações entre as ordens tiveram baixo suporte. Nos estudos multigênicos ou filogenômicos de ordens individuais de Nemaliophycidae (Lam et al. 2015; Costa et al. 2016), elucidaram as relações dentro e entre grupos intimamente relacionados. Assim, com os estudos filogenômicos que integram dados genômicos de genomas completos para inferir relações evolutivas em contraste com análises baseadas em poucos genes, a crescente facilidade e a redução do custo do sequenciamento de alto rendimento, tornam os genomas organelares boas ferramentas capazes de inferir as relações filogenéticas, tanto nos níveis taxonômicos mais elevados – filos e classes (Janouškovec et al. 2013; Lee et al. 2015, 2016; Muñoz-Gómez et

al. 2017; Yang et al. 2016), bem como para ordens e famílias (Costa et al. 2016; Diaz-Tapia et al. 2017; Iha et al. 2018; Lee et al. 2018).

O estudo dos genomas organelares, que inclui os plastomas e os mitogenomas, possuem características que facilitam sua investigação: plastomas e mitogenomas estão presentes em várias cópias em cada célula, de modo que os dados do DNA organelar são facilmente obtidos; são predominantemente herdados uniparentalmente; sua estrutura é compacta e; seus genomas altamente conservados (Lam et al. 2015; Yang et al. 2016). Além disso, as sequências dos genomas organelares revelam que são informativos do ponto de vista estrutural - tamanho, conteúdo de GC, perda de genes e sintenia (Leliaert et al. 2016). Os genomas mitocondriais de algas vermelhas apresentam características únicas que os distinguem dos genomas mitocondriais de outros grupos de algas: (1) grande tamanho do genoma -são conhecidos por seu tamanho relativamente grande em comparação com outros grupos de algas, podendo variar de aproximadamente 20.000 a mais de 100.000 pb em tamanho, e são relativamente complexos (Janouškovec et al. 2013; Van Beveren et al. 2022; Yang et al. 2015); (2) conteúdo genético -contêm uma gama diversificada de genes envolvidos em funções celulares essenciais, e o número total de genes varia de 13 a 79 e o número de genes codificadores de proteínas de 9 a 36 (Van Beveren et al. 2022; Yang et al. 2015); (3) presença de íntrons; podem abrigar íntrons, adicionando complexidade à sua estrutura genética (Matsuzaki et al. 2004); o número de íntrons no mtDNA em algas vermelhas é geralmente baixo (1-3), mas pode chegar a algumas dezenas (10-58), especialmente em algumas espécies de Protorhodophytina (Van Beveren et al. 2022).

Em relação aos genomas plastidiais, as algas vermelhas possuem os maiores genomas entre os grupos de algas, variando de 149.987 nt de comprimento em *Cyanidioschyzon merolae* (Cyanidiophyceae) a 259.000 nt em *Porphyridium sordidum* (Porphyridiophyceae), mas com intervalos estreitos (175.000-194.000 nt) em Florideophyceae (Lee et al. 2016). O número de genes codificantes em algas vermelhas também é o maior entre os grupos de algas (184-235; Lee et al. 2016). Os genomas plastidiais de algas vermelhas não apenas apresentam o maior conteúdo genético entre os eucariotos com cloroplasto primário (Archaeplastida), mas seus genomas também são os mais conservados (Janouskovec et al. 2013; Lee et al. 2016). A única exceção conhecida é o cloroplasto do aloparasita *Choreocolax polysiphoniae*, que perdeu todas as vias fotossintéticas e seu tamanho foi reduzido para 90.000 nt (Salomaki

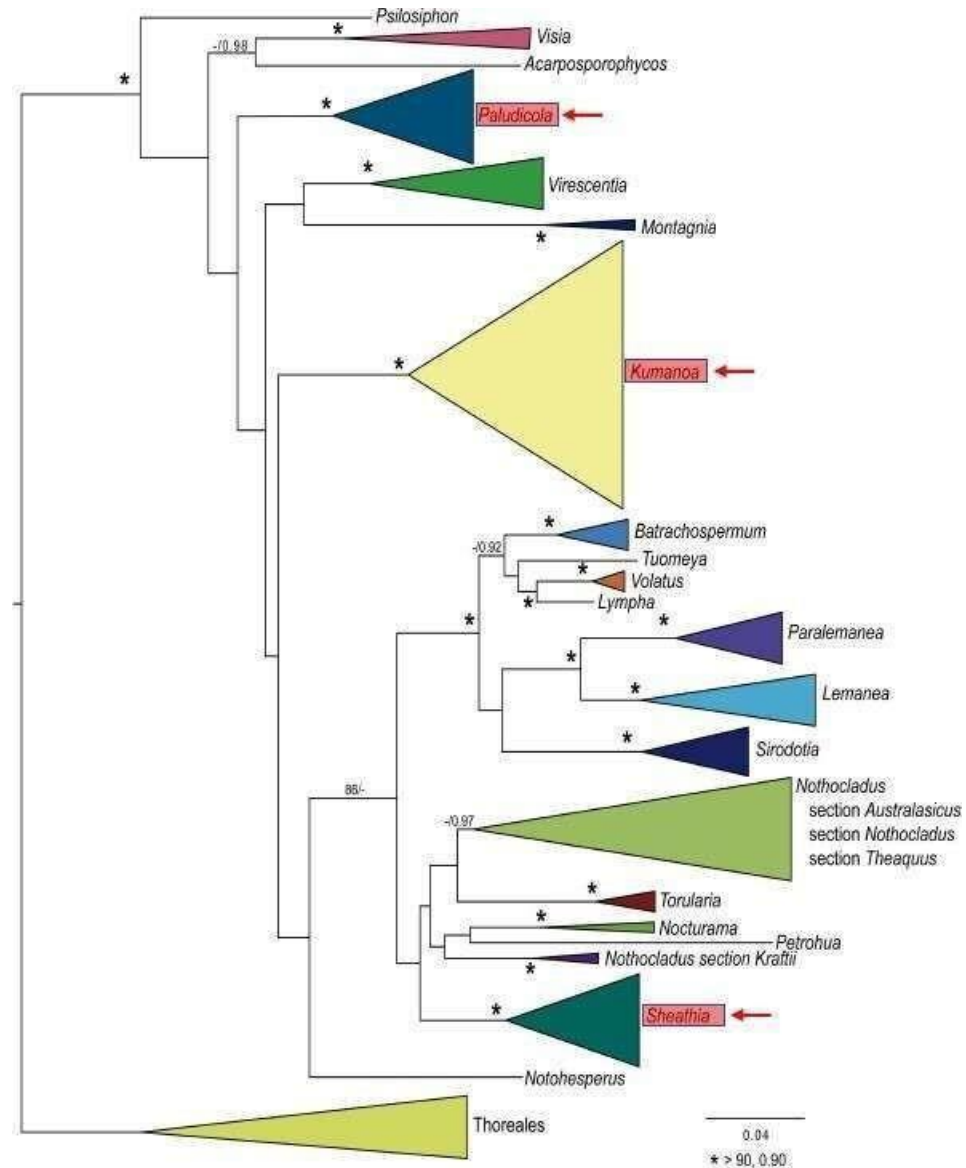
et al. 2015).

Reconstruir a história evolutiva mais ampla desses genomas em Nemaliophycidae tem sido desafiador devido à amostragem insuficiente de táxons (Van Beveren et al. 2022), principalmente na ordem Batrachospermales que embora seja bem sustentada em todas as análises filogenéticas (Entwisle et al. 2009; Lam et al. 2016; Vis & Necchi 2021), a classificação infraordinal ainda não está bem resolvida. Além disso, Batrachospermales destaca-se como o grupo mais diverso em termos de morfologia, caracteres reprodutivos e número de táxons dentro de Nemaliophycidae (Kumano 2002; Entwisle et al. 2009; Lam et al. 2015; Vis & Necchi 2021). A ordem contém pouco mais de dois terços de todas as espécies de algas vermelhas continentais (Vis & Necchi 2021) e é caracterizada pela seguinte combinação de caracteres morfo-reprodutivos (Pueschel & Cole 1982; Garbary & Gabrielson 1990; Kumano 2002; Entwisle et al. 2009; Vis & Necchi 2022): 1) talo heterótrico, uniaxial, gelatinoso ou cartilaginoso; 2) células axiais com crescimento determinado dos filamentos assimilatórios laterais; 3) “pit plugs” com duas camadas com uma camada externa em forma de cúpula expandida; 4) ausência de tetrasporângios, com meiose em células vegetativas diplóides que dão origem a eixos haplóides (meiose somática); 5) cloroplastos discóides múltiplos sem pirenoides e; 6) distribuição exclusivamente em água doce. Este conjunto de caracteres morfológicos está bem definido (Vis & Necchi 2022), mas pouco se sabe sobre os genomas organelares da ordem.

Dados sobre mitogenomas para membros de Batrachospermales são escassos. A única investigação específica para o grupo foi realizada por Paiano et al. (2018), que sequenciou genomas de seis membros da ordem Batrachospermales. Os outros estudos que relataram mitogenomas para o grupo relataram apenas um membro como parte de estudos de genoma organelar (Nan et al. 2017; Wolf et al. 2017). Até o momento, 14 mitogenomas de membros da ordem estão disponíveis no GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology Information, Sayers et al. 2020). Nos plastomas de membros de Batrachospermales, estudos indicam que esses são grandes, densos em genes (alto conteúdo gênico para o tamanho do genoma e regiões intergênicas curtas) e altamente conservados (Paiano et al. 2017). Porém, 19 genomas plastidiais de Batrachospermales foram sequenciados atualmente (Outubro de 2025). Este estudo faz parte de um projeto maior que investiga genomas organelares de Batrachospermales que inclui número maior de táxons de rodófitas de água doce

da ordem. Neste projeto, investigamos três gêneros que destacam-se por representar clados distantes na filogenia do grupo, apresentarem distribuição geográfica ampla e conterem grande número de espécies em relação aos demais da ordem, sendo eles: *Kumanoa*, *Paludicola* e *Sheathia* (Figura 1 -Tabela 1).

Figura 1. Árvore filogenética resultante da Análise Baiana baseada com base em sequências do gene *rbcL* mostrando as relações entre os gêneros atualmente reconhecidos na ordem Batrachospermales destacando os três gêneros que serão abordados neste estudo



Fonte: Vis & Necchi 2021 modificada

Tabela 1. Distribuição geográfica dos gêneros de Batrachospermales (modificada de Vis & Necchi 2021) destacando os três gêneros que serão abordados neste trabalho.

Distribuição geográfica dos gêneros da ordem Batrachospermales						
Gênero	África	Ásia	Australásia	Europa	América do Norte	América do Sul
<i>Acarposporophycos</i>						X
<i>Batrachospermum</i>		X		X	X	
<i>Genadendalia</i>	X					
<i>Kumanoa</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Lemanea</i>		X		X	X	
<i>Lympha</i>					X	
<i>Montagnia</i>	X	X			X	X
<i>Nocturama</i>	X		X			X
<i>Nothocladus</i>	X		X			
<i>Notohesperus</i>			X			
<i>Paludicola</i>		X		X	X	X
<i>Paralemanea</i>	X	X		X	X	X
<i>Petrohua</i>						X
<i>Psilosiphon</i>			X			
<i>Sheathia</i>	X	X	X	X	X	
<i>Sirodotia</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Torularia</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Tuomeya</i>					X	
<i>Virescentia</i>		X		X	X	X
<i>Visia</i>	X	X	X			X
<i>Volatus</i>				X	X	
TOTAL	10	11	9	10	13	11

Kumanoa foi proposto inicialmente para espécies previamente classificadas nas seções *Contorta* Skuja e *Hybrida* De Toni do gênero *Batrachospermum*, baseado em dados morfológicos e moleculares (Entwistle et al. 2009). Vis et al. (2012) conduziram uma análise filogenética usando marcadores como *rbcL*, *cox1* e *UPA* revelaram que *Kumanoa* forma um clado bem sustentado, distinto de *Batrachospermum*, e propuseram novas espécies. O estudo revelou que era necessário reconhecer *Kumanoa* num nível genérico infra-ordinal, separando diversas linhagens de *Batrachospermum*. O gênero é caracterizado por ter ramos carpogoniais bem diferenciados dos fascículos,

espiralados ou curvos, raramente retos; carposporófitos axiais, inseridos centralmente nos verticilos; e filamentos gonimoblásticos de um tipo, desenvolvendo-se radialmente do carpogônio fecundado (Figura 2). As três espécies do gênero *Volatus* compartilham a presença de ramos carpogoniais curvos, torcidos ou espiralados e podem ser interpretados erroneamente como *Kumanoa*, particularmente as espécies com ramos carpogoniais curvos ou levemente espiralados. Eles podem ser distinguidos de *Kumanoa* apenas com dados de sequências de DNA. As espécies de *Kumanoa* ocorrem em uma ampla gama de condições ambientais, principalmente em águas não poluídas, com pH levemente ácido a levemente alcalino, baixo a alto teor de íons, moderadamente a bem arejadas e de fluxo lento a rápido; em substratos rochosos, troncos de árvores, substratos artificiais ou epífitas em macrófitas, em segmentos de riachos abertos a sombreados (Vis & Necchi 2021). Atualmente, 41 espécies são reconhecidas para o gênero e seus representantes foram relatados principalmente em regiões tropicais ou subtropicais, menos frequentemente em regiões temperadas da África, Ásia, Australásia, Europa, América do Norte e do Sul (Tabela 1) (Vis & Necchi 2021). Estudos moleculares têm sido conduzidos até o momento baseados em sequências nos genes *rbcL*, *SSU*, *UPA* e *COI-5P*, os quais têm confirmado o gênero como um grupo monofilético dentro de Batrachospermales (Entwistle et al. 2009; Necchi et al. 2010; Vis & Necchi 2012). No entanto, as relações interespecíficas são pouco conhecidas com somente 6 mitogenomas e 7 plastomas sequenciados até o momento.

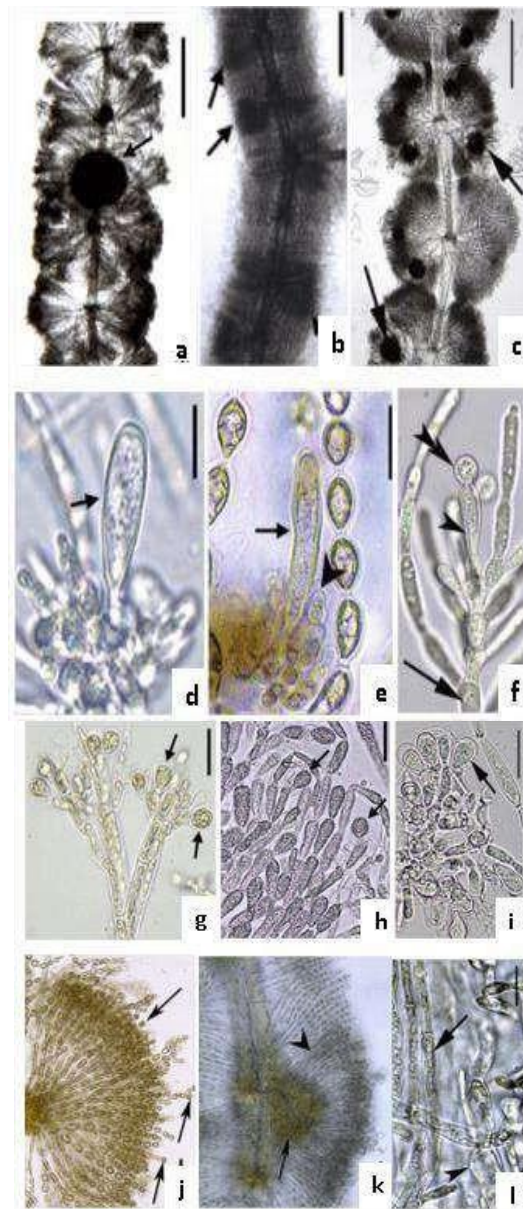
O gênero *Paludicola* foi proposto para abrigar as espécies da antiga seção *Turfosa* (Vis et al. 2020). Desde o primeiro estudo filogenético da ordem Batrachospermales, *Batrachospermum* demonstrou ser parafilético. Posteriormente, seções do gênero foram investigadas usando sequências de DNA e morfologia a fim de propor novos gêneros e delinear espécies. A seção *Turfosa* de *Batrachospermum* foi a última seção com múltiplas espécies ainda a serem examinadas. Análises filogenéticas usando sequências *rbcL* e *COI-5P* mostraram que esta seção é um clado bem suportado, distinto da seção *Batrachospermum* e seus gêneros segregados. A seção *Turfosa* é elevada à categoria genérica como *Paludicola* (Vis & Necchi 2020). É caracterizado por ter carpogônio com tricogínio sésil ou raramente pedicelado e clavado; e filamentos gonimoblásticos de dois tipos: ramificados radialmente,

dispostos densamente ou frouxamente, determinados com células elipsoidais, cilíndricas ou em forma de barril; e difusos e indeterminados com células cilíndricas, prostradas, crescendo de forma difusa ao redor dos fascículos ou dos filamentos rizoidais (Figura 2). As espécies de *Paludicola* ocorrem tipicamente em águas com pH ácido a levemente ácido, cor amarela a marrom escura, menos frequentemente em águas claras, baixo teor de íons, temperaturas baixas a moderadas (7-15°C, menos frequentemente acima de 20°C) e águas paradas a moderadamente correntes, lagoas ou nascentes, aderidas a macrófitas ou substratos rochosos, em segmentos de riachos abertos ou parcialmente sombreados (Vis & Necchi 2021). Os representantes do gênero foram relatados em regiões temperadas ou subtropicais, menos frequentemente em regiões tropicais, da Ásia, Europa, América do Norte e do Sul (Tabela 1). Apresenta atualmente 15 espécies que dentre as relações filogenéticas entre as espécies a partir das análises de sequências *rbcL* com base nos dados relatados por Vis et al. (2020) mostrou sete espécies formando clados distintos - *P. communis*, *P. groenbladii*, *P. keratophyta*, *P. leafensis*, *P. orthosticha*, *P. periploca* e *P. turfosa* (Vis & Necchi 2021). Entretanto, suas relações intraespecíficas ainda são pouco conhecidas com somente 3 mitogenomas e 3 plastomas sequenciados até o momento.

O gênero *Sheathia* foi estabelecido para incluir as espécies que anteriormente eram posicionadas na seção Helminthoidea (Salomaki et al. 2014). Eles usaram análises de *rbcL*, *COI*, -5P e rDNA *ITS*, junto com características morfológicas como heterocorticação, para demonstrar que certas espécies antes incluídas em *Batrachospermum* formavam um grupo monofilético. Assim, propuseram o novo gênero *Sheathia*, incluindo várias espécies heterocorticais como *S. boryana*, *S. involuta*, *S. americana* e outras descritas como novas espécies. Estudos posteriores como Necchi et al. (2019) mostraram a grande diversidade críptica dentro de *Sheathia arcuata*, especialmente em populações da Índia e Nepal, revelando vários clados independentes identificados com base em *rbcL* e morfologia, reforçando ainda mais a delimitação infra-ordinal do gênero. Este gênero tem características morfológicas muito próximas de *Batrachospermum*, embora um conjunto de sete espécies pode ser distinguido dessas pela presença de heterocorticação: filamentos corticais compostos de células cilíndricas e bulbosas (Figura 2), no entanto, outras 10 espécies de *Sheathia* não têm esse caráter e só podem ser distinguidas de espécies de *Batrachospermum* com base em dados de

sequência de DNA. Tem ampla ocorrência de características ambientais e as espécies podem ser coletadas em riachos de regiões temperadas e tropicais do mundo. Algumas espécies têm sido frequentemente relatadas em riachos e nascentes alcalinos na América do Norte, China e Europa. Espécimes pertencentes a este gênero têm sido frequentemente coletados apenas como estágio "Chantransia" sem gametófitos em localidades da África, China, Ilhas Havaianas, Indonésia e Europa. Na América do Norte, espécimes atribuíveis a este gênero foram coletados em riachos com ampla variância de dados ambientais, incluindo velocidade média da corrente de 11 a 97 cm s⁻¹, temperatura da água de 3 a 24 °C, pH de 5,5 a 8,5, 20 a 890 µS cm⁻¹. Na Europa, espécies de *Sheathia* (*S. arcuata*, *S. boryana*, *S. confusa* e *S. exigua*) foram coletadas em riachos e nascentes com temperatura moderada (14-16 °C) e águas levemente alcalinas a alcalinas (pH 6,7-8,0, 120-715 µS cm⁻¹). Na Ásia, *Sheathia longipedicellata* foi relatada em águas com temperatura moderada (11,5-15 °C) e levemente alcalinas (pH 6,5- 7,2). Atualmente são reconhecidas no gênero 19 espécies, relatadas em todos os continentes, exceto América do Sul (Tabela 1) (Vis & Necchi 2021). Alguns estudos mostraram algumas relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Sheathia* a partir de análises das sequências de *rbcl* (Salomaki et al. 2014), porém, ainda existem questões nesse grupo a serem resolvidas sendo que apenas 4 mitogenomas e 4 plastomas foram sequenciados até o momento.

Figura 2: (a-c) Carposporófito: **(a)** *Kumanoa* sp. verticilos bem desenvolvidos com carposporófito denso (seta); **(b)** *Paludicola* sp. verticilos bem desenvolvidos e comprimidos com carposporófitos soltos (setas); **(c)** *Sheathia* sp. verticilos esféricos com carposporófito esférico e pedunculado (setas). **(d-f)** Ramo carpogonial: **(d)** *Kumanoa* sp. ramo carpogonial jovem e torcido (setas); **(e)** *Paludicola* sp. carpogônias maduras com tricogínios clavados (seta) e ramo carpogonial (ponta de seta); **(f)** *Sheathia* sp. ramo carpogonial com células indiferenciadas das células do fascículo (seta) e carpogônio com tricogina clavada (ponta de seta) e espermacio aderido (ponta de seta dupla). **(g-i)** Carposporângio: **(g)** *Kumanoa* sp. filamentos de gonimoblastos com carposporângios (setas); **(h)** *Paludicola* sp. filamentos de gonimoblastos com carposporângios (setas); **(i)** *Sheathia* sp. carposporófito com carposporângios obovoidais (setas). **(j-l)** Caracteres definidos: **(j)** *Paludicola* sp. Carposporófitos hemisféricos apresentando filamentos densos na base (seta) e filamentos de gonimoblastos multicelulares radiais com carposporângios nas pontas (pontas de seta); **(k)** *Paludicola* sp. carposporófito composto por um nó de células na base (seta) com filamentos de gonimoblastos frouxamente dispostos (ponta de seta); **(l)** *Sheathia* sp. heterocorticação do eixo principal com células cilíndricas (seta) e células bulbosas (ponta de seta).



Fonte: (a-i) Vis & Necchi (2021); (j-l) Vis et. al (2020).

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo em andamento intitulado “Filogenômica e caracterização genômica de algas vermelhas continentais da ordem Batrachospermales (Rhodophyta) – Processo FAPESP 2020/11064-3) que inclui número maior de táxons de rodófitas de água doce da ordem Batrachospermales. Ele contempla os seguintes aspectos: (a) descrever as características dos genomas plastidiais de três gêneros (*Kumanoa*, *Paludicola* e *Sheathia*), que constituem clados bem distantes na filogenia do grupo, alta riqueza de espécies e ampla distribuição geográfica na ordem a fim de esclarecer a classificação dentro da ordem; b) inferir as relações filogenéticas entre esses membros e comparar com as características dos genomas de outros grupos de algas vermelhas. Este trabalho permitiu testar as seguintes hipóteses:

Hipótese 1

Os dados gerados a partir das análises filogenômicas com base nos novos genomas e dos já sequenciados de outros membros da ordem Batrachospermales demonstrarão posicionamento filogenético distante entre cada um dos três gêneros.

Hipótese 2

Os resultados das características genômicas indicarão que as maiores diferenças serão observadas entre os genomas dos três gêneros do que dentro de cada gênero. Para testar esta hipótese, serão utilizados os seguintes critérios comparativos (conforme relacionado em Paiano et al. 2017): tamanho do genoma (pb); teores de GC (%), número total de genes; números de genes codificantes; RNA tRNA / rRNA; comprimento total do gene (pb); % do genoma (genes); comprimento da região intergênica (pb).

Objetivos

Para testar estas hipóteses, os seguintes objetivos foram propostos: 1) conhecer a diversidade genômica de espécies selecionadas dos três gêneros pela descrição das características dos genomas plastidiais e mitocondriais de espécies dos três gêneros; 2) inferir as relações filogenéticas com base no conjunto de genes dos genomas desses representantes com os já descritos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram sequenciados plastomas e mitogenomas de oito espécies de três gêneros representativos da ampla variedade de caracteres vegetativos e reprodutivos de Batrachospermales (Tabela 2). As amostras foram dessecadas em sílica gel para extração do DNA genômico. Outra parte das mesmas amostras foi preservada em formaldeído a 4% para identificação taxonômica, que foi baseada em caracteres diagnósticos atuais usando literatura recente (Kumano 2002; Entwistle et al. 2009; Vis & Necchi 2012; Vis & Necchi 2021).

Tabela 2. Espécies, informações das espécies e números de acesso do GenBank para o genoma mitocondrial e plastidial gerados no presente estudo.

Espécies	Herbário voucher	Localidade	Latitude, Longitude	Coletor	Data da coleta	Número de acesso GenBank Genoma mitocondrial	Número de acesso GenBank Genoma plastidial
<i>Kumano capensis</i>	SJRP- Algae 32607	‘Chapada dos Veadeiros’ National Park, Alto Paraíso de Goiás, Goiás State, Brasil (PNCV 10)	14°03'06.6"S, 47°30'45.8"W	L.H.Z. Branco	iv.2010	PV112101	PV564056
<i>K. equisetoides</i>	SJRP- Algae 32608	Igarapé Acará, ‘Adolfo Ducke’ Forest Reserve, Manaus, Amazonas State, Brasil (AM 8)	02°34'14.16"S, 59°34'12.36"W	O. Necchi Jr., M.L. Vis., J.C. Hodge	19.viii.2 004	PV156527	PX516260

<i>K. procarpa</i>	SJRP- Algae 32600	'Lagoa das Ninféias', Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil	23°38'21.70"S, 46°37'10.73"W	O. Necchi Jr, J. Prado	25.iv.20 23	PV156524	PX109641
<i>Paludicola aquanigra</i>	SJRP- Algae 32596	Trilha para a parte alta da Cachoeira da Fumaça, Parque Nacional da Chapada Diamantina, Palmeiras, Bahia, Brasil	12°36'14"S, 41°27'59"W	O. Necchi Jr, C.C. Necchi	02.vii.20 18	PV156528	PX373573
<i>P. communis</i>	BHO A- 0368	Sterling Lake, New York, USA	41°12'52.9"N, 74°15'15.8"W	J.D.Hall	13.xi.2010	PV156529	PX373574
<i>P. diamantinensis</i>	SJRP- Algae 32597	Córrego Riachinho, Vale do Capão, Palmeiras, Bahia, Brasil	12°34'20"S, 41°30'53"W	O. Necchi Jr, C.C.Necchi	02.vii.20 18	PV156525	PX421651

<i>Sheathia dispersa</i>	SJRP- Algae 32578	Distrito nº 5, Khayer Khola, Província nº 1, Zona Koshi, Distrito de Morang, Municipio de Sundarharaicha, Nepal	26°41'24.8'' N, 87°19'18.1'' E	O. Necchi Jr, J.A. West, E.K. Ganesan, S.K. Rai	21ii.2018	PV156526	PX516258
<i>S. involuta</i>	BHO A- 1966	Fluxo de água sem nome do Lago Myosotis a montante das Cataratas de Rensselaerville, Reserva Huyck, Nova York, EUA	42°30'54.3''S, 74°08'38.7''W	M.L. Vis, R.M. Crowell, G.A. Lindsey, M. French	17.v.20 23	PV156530	PX516259

Extração e quantificação de DNA

O DNA total (genômico) de cada amostra foi extraído por maceração das algas com nitrogênio líquido com auxílio de pistilo. O material obtido foi submetido à extração com uso de kit comercial MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen) conforme protocolo descrito pelo fabricante e obtenção de melhores resultados na quantidade, concentração e pureza do DNA. Em seguida, as amostras foram quantificadas no fluorômetro Qubit® com o uso do kit Quant-it® ds DNA HS (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.) e a pureza (A260 / 280 nm) verificada por leitura em espectrofotômetro para microvolumes L Tek, modelo INNO-N antes do armazenamento a -20°C.

Amplificação de segmentos específicos por PCR

As amostras coletadas foram verificadas quanto à identidade por meio das sequências de *rbcL* e/ou COI-5P com maior número de sequências na base de dados. Para isso, a amplificação de segmentos específicos de DNA foi realizada através da técnica de PCR. Para as reações de PCR foram utilizados kits de PCR, todos para volume total de 25 µL a 50 µL: “PCR Taq High Fidelity Pol Master Mix 2x” (Cellco, São Carlos, Brazil) e “PCR GoldTaq Hot Start Multiplex Master Mix 2X” (Cellco). As reações de PCR foram processadas em termocicladores Techne Prime (Techne, Burlington, Reino Unido). Os primers utilizados foram os seguintes (no sentido 5' → 3'):

rbcL (conforme Vis et al. 1998; Salomaki et al. 2014)

- F160 - CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC - 20 nucleotídeos
- F650 - ATT AAC TCT CAA CCA TTT ATG CG - 23 nucleotídeos
- R897.n - CGT GAG TAT GTT GAA TTA CCA GC - 23 nucleotídeos
- *rbcL* R - ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC - 20 nucleotídeos

COI-5P (conforme Saunders & Moore 2013; Le Gall & Saunders 2010)

- GWSFn - TCA ACA AAT CAY AAA GAT ATY GG - 23 nucleotídeos
- GWSRnNew - GGR TTCCRAARAAYACRAA - 19 nucleotídeos

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

- ***rbcL*** (conforme Vis et al. 1998; Salomaki et al. 2014) – 95°C por 2 min (desnaturação inicial); 30 a 35 ciclos: 93°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min (anelamento); 72°C por 4 min (extensão); 72°C por 6 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

- **COI-5P** (conforme Saunders & Moore 2013; Le Gall & Saunders 2010) – 94°C por 5 min (desnaturação inicial); 35 ciclos: 94°C por 30 segundos (desnaturação); 45°C por 1 min (anelamento); 72°C por 2 min (extensão); 72°C por 7 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose

Para a quantificação visual por eletroforese, o gel (1%) foi preparado com a diluição de agarose em solução-tampão TBE (tris-borato-EDTA): tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM (Sambrook & Russell 2001). Para a cuba pequena utilizou-se 23 mg de agarose em 30 mL da solução-tampão. Cada poço do gel foi carregado com 2 µL da amostra de DNA, 2 µL de tampão de carregamento (Loading Buffer) e 1 µL de GelRed® (Biotium, Hayward, E.U.A.). A diluição de GelRed® foi feita com uso de 1 µL da solução estoque em 500 µL de água ultrapura. As eletroforeses de produtos PCR foram conduzidas sob 60V durante 60 a 75 min (rbcl) ou 45 a 60 min (COI-5P) e para eletroforeses de DNA genômico foram conduzidas sob 80V durante 75 a 90 min. Como marcador de tamanho foi utilizado 3Kb Mid Range DNA ladder (Cellco, São Carlos, Brasil).

Purificação e quantificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com uso dos kits de purificação: “NucleoSpin® Extract II” (MN, Macherey-Nagel) e “ExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup” (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, E.U.A.), 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 HS (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.).

Sequenciamento genômico das amostras

O material foi enviado para o Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LacTAD), onde foram montadas as bibliotecas e realizado o sequenciamento genômico de alto desempenho em uma plataforma Illumina NextSeq 2000 (Illumina, San Diego, EUA) com 2 x 150 pb de extremidades pareadas e cobertura de 10 milhões de “reads”.

Análises pré-montagem: Testes de qualidade e Trimagem das leituras

O desenvolvimento do trabalho de bioinformática foi realizado,

majoritariamente, por meio de linha de comando, utilizando-se programas *open source* no ambiente computacional GridUnesp.

a. Testes de integridade e qualidade das leituras: Os arquivos de leitura (“reads”) provenientes do sequenciador Illumina (illumina paired-end) foram primeiramente testados com o programa FastQC (v0.12.1; Andrews 2016), que realiza uma série de análises de qualidade das leituras brutas (qualidade das bases, padrões de AT e CG, quantidade de reads, presença de adaptadores etc), com o intuito de verificar se os dados possuem viabilidade para a continuidade das próximas etapas de montagem dos genomas.

b. Trimagem das leituras: Após a realização dos testes de qualidade, as leituras passaram por um processo de retirada dos adaptadores Illumina e, além disso, conforme a necessidade (verificada na etapa anterior), foram removidos partes das bases das leituras, em que a qualidade não estava adequada para a realização das montagens dos genomas. Essa etapa foi realizada com o programa Trimmomatic v0.39 (Bolger et al. 2014), para remover adaptadores e leituras de baixa qualidade, com os seguintes parâmetros: ILLUMINACLIP: adapters.fa: 2:30:10; SLIDINGWINDOW: 4:20; MINLEN: 36. Após o aparaamento, as leituras limpas foram usadas para a montagem do genoma de novo.

Montagem dos genomas e sintonia

As leituras trimadas foram, então, utilizadas para a etapa de montagem *de novo* dos genomas, utilizando diferentes algoritmos, tanto para atender as especificidades dos genomas dos diferentes organismos, quanto para comparação e validação das montagens. Primeiramente, a montagem foi realizada com o programa SPAdes versão 3.15.5 (Nurk et al. 2017; Pribelski et al. 2020) e os scaffolds originados foram blastados contra o banco de dados NCBI de genomas plastidiais/mitocondriais de algas do mesmo gênero ou, quando não existente, de gêneros próximos, para a separação dos scaffolds correspondentes aos plastídios/mitocondrias. Além do programa mencionado, outros dois programas foram utilizados: NOVOPlasty versão 4.3.1 (Dierckxsens et al. 2017) e GetOrganelle versão 1.5.1c (Jin et al. 2020). Esses dois últimos programas, diferentemente do SPAdes (Dierckxsens et al. 2017), utilizam seeds de plastomas de organismos taxonomicamente próximos para iniciar o processo de montagem. Ainda, para cada um dos programas, foram testados diferentes parâmetros (p.ex. k-mer, quantidade de iteração etc), a

fim de se obter a montagem com a melhor qualidade possível. As montagens devidadas do SPAdes e GetOrganelle foram manualmente inspecionadas utilizando-se o programa Bandage versão 0.8.1 (Wick et al. 2015). A anotação dos genomas foram realizadas por MFannot (Beck e Lang 2010), os tRNAs foram identificados com o anotador tRNAscan-SE versão 2.0.7 no GeSeq com parâmetros padrão (Chan & Lowe 2019) e os mapas foram gerados com OGDRAW versão 1.3.1 (Greiner et al. 2019). Todas as anotações foram cuidadosamente revisadas e corrigidas manualmente no Geneious Prime 2023.2 (<http://www.geneious.com>).

A sintenia entre genomas foi investigada por meio do alinhamento de todo o genoma com o algoritmo ProgressiveMauve versão 2.4.0 (Darling et al. 2010) usando pesos de sementes calculados automaticamente e cálculo automatizado de pontuações de bloco colinear local (LCB).

Análises filogenômicas

Nas análises filogenômicas para os mitogenomas, um total de 31 táxons de Batrachospermales e um táxon de grupo externo (*Thorea hispida* KY083066) foram utilizados nas análises filogenéticas. Para nove táxons, os dados foram recuperados do GenBank e 22 deles compuseram os genomas recém-sequenciados. Dezesete genes codificantes presentes em todos os 32 táxons (atp4, atp8, atp9, cob, cox1, cox2, cox3, nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, sdh2, sdh4 e rpl16) foram utilizados nas análises, que foram concatenadas manualmente no Geneious e alinhadas no nível de nucleotídeos usando o MUSCLE (Edgar, 2004). O alinhamento final foi de 14.084 posições nt de comprimento. A árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) inferida a partir dos nucleotídeos foi obtida com o RAxML versão 8 (Stamatakis, 2014), utilizando os seguintes parâmetros: 1.000 bootstraps. Todas as análises foram realizadas utilizando os recursos computacionais do Centro de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Em relação aos plastomas, um total de 39 táxons de Batrachospermales e um táxon de grupo externo (*Thorea hispida* KY083065) foram utilizados nas análises filogenéticas. Para 10 táxons, os dados foram recuperados do GenBank e 28 deles compunham os genomas recém-sequenciados. 132 genes codificantes presentes em todos os 39 táxons foram utilizados nas análises, os quais foram concatenados usando AMAS (Alignment

Manipulation and Summary; Borowiec, 2016). O alinhamento final teve 75.761 posições nt de comprimento. O modelo de melhor ajuste foi determinado para o alinhamento concatenado usando o ModelFinder no IQ-Tree versão 2.3.5 (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Uma árvore de máxima verossimilhança com 1.000 bootstraps (Hoang et al., 2018) foi gerada para o alinhamento concatenado particionado por gene e códon na IQTree usando os respectivos modelos (Minh et al., 2020).

A correlação entre as características genômicas foi calculada pelo coeficiente de Pearson (Zar 2010).

4. RESULTADOS

4.1. ESTRUTURA DO GENOMA

Os 16 genomas organelares gerados neste estudo foram totalmente montados, anotados e todos mapeados como moléculas circulares (Figura 3 e 4). Nos mitogenomas dos táxons de Batrachospermales em geral (Tabela 3), o tamanho variou de 22.863 pb em *Montagnia australis* a 29.785 pb em *Paralemanea sp.* (26.103 ± 1885 , média geral $\pm$ desvio padrão para os táxons de Batrachospermales) destacando que os maiores genomas foram observados nas três espécies de *Paralemanea*, que também apresentaram regiões intergênicas maiores. O conteúdo de GC variou de 26,8% em *Montagnia australis* a 32,4% em *Paralemanea sp.* ($29,7\% \pm 1,5$). O número de genes variou de 39 em *M. australis* a 49 em *Paralemanea blumii* ($45,2 \pm 2,8$), enquanto o número de genes codificantes de proteínas variou de 22 em 3 espécies (*L. borealis*, *M. australis* e *Psilosiphon scoparius*) a 27 em *Batrachospermum qujingense* ($23,9 \pm 1,3$). O conteúdo de tRNA e rRNA foi semelhante na maioria das espécies (10) com 20 tRNA e 2 rRNA. Os comprimentos gênicos entre os mitogenomas variaram de 21.027 pb em *M. australis* a 27.078 pb em *P. blumii* ($23.425 \pm 1,5$). O comprimento da região intergênica foi altamente variável dentre os critérios comparativos, variando de 1,252 pb em *Sirodotia delicatuliformis* NC039407 a 5,168 pb em *Nocturama novamundensis* ($2,646 \pm 9,5$). Em todas as espécies, a maioria dos genes codificantes tinha entre 500 e 1.000 pb de comprimento, com os genes *nad4*, *nad5* e *cox1* (genes que codificam complexos da cadeia respiratória) atingindo aproximadamente 2.000 pb (Tabela 3).

Dentre os três gêneros foco deste estudo, os mitogenomas das

espécies de *Kumanoa* variou no tamanho dos genomas de 24.997 pb *Kumanoa capensis* a 25.862 em *Kumanoa ambigua* MG787095 ($25.221 \pm 366,5$). O conteúdo de GC variou de 28,4% em *Kumanoa mahlacensis* NC039406 a 29,2% em *Kumanoa capensis* ($28,4 \pm 0,8$). O número de genes variou somente em *Kumanoa ambigua* MG787095 com 41 enquanto as outras espécies com 45 ($44,2 \pm 1,7$), enquanto o número de genes codificantes de proteínas variou somente em *Kumanoa ambigua* MG787095 com 22 enquanto as outras espécies com 23 ($22,8 \pm 0,4$). O conteúdo de tRNA variou somente em *Kumanoa ambigua* MG787095 com 16, as outras espécies com 19, e sobre o rRNA, não houve variação, todas com 3 rRNA. Os comprimentos gênicos tiveram maior variação de 21.433 pb em *Kumanoa capensis* a 23.034 pb em *Kumanoa mahlacensis* NC039406 (21.939 ± 644). A variação do comprimento da região intergênica foi de 2.012 pb em *Kumanoa mahlacensis* NC039406 a 3.855 pb em *Kumanoa ambigua* MG787095 (3.253 ± 715) (Tabela 4).

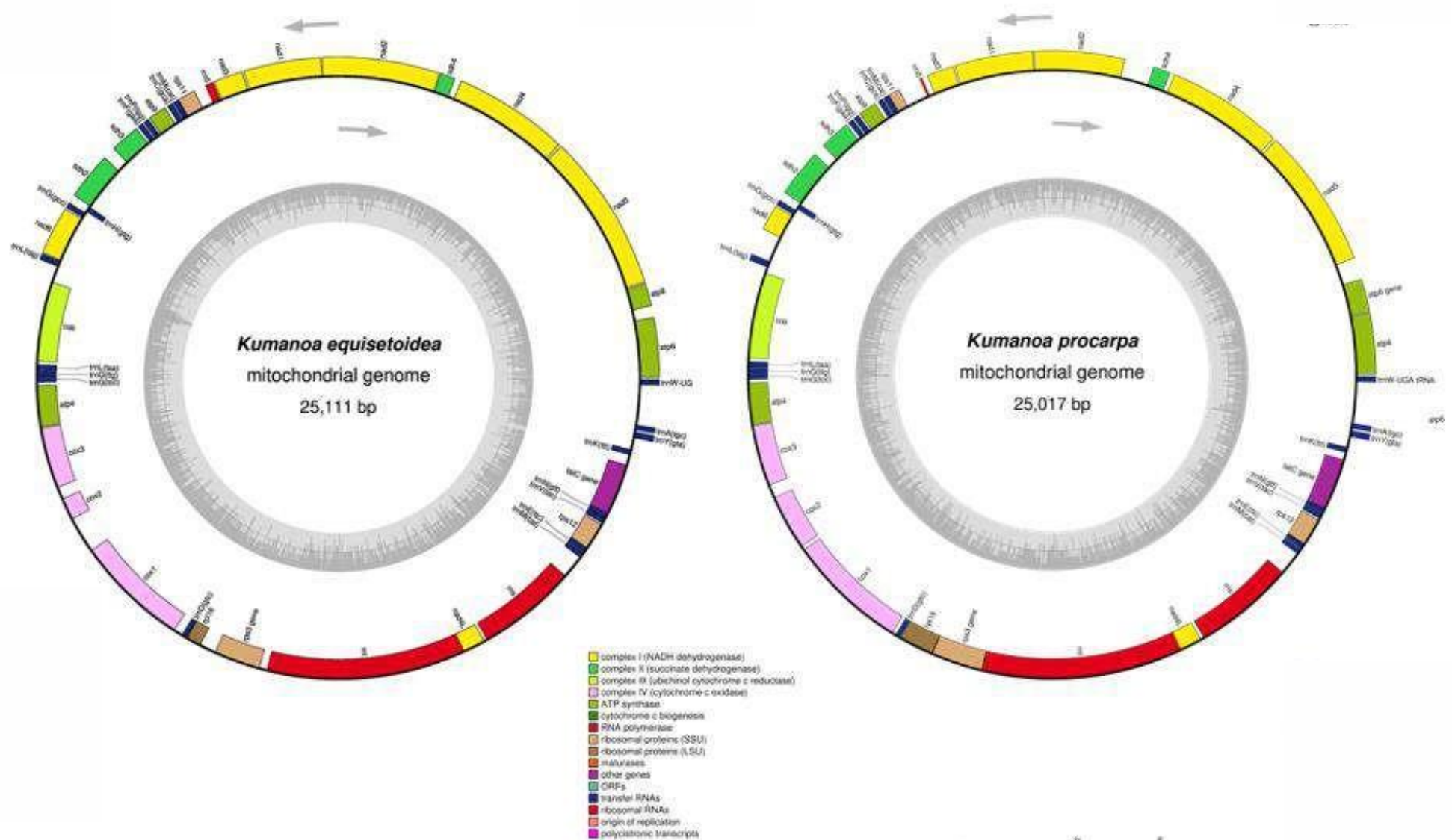
No gênero *Paludicola*, o tamanho dos genomas teve maior variação de 24.828 pb em *P. diamantinensis* a 26.017 pb em *P. communis* (25.220 ± 690). O conteúdo de GC variou de 25,3% em *P. diamantinensis* a 26,8% em *Paludicola aquanigra* (26 ± 1). Das três espécies, *P. diamantinensis* teve 1 gene a menos que as outras duas espécies com 45 genes, enquanto que no número de genes codificantes de proteínas não houve variação, todas as espécies com 23. O conteúdo de tRNA variou de 18 em *P. communis* a 19 nas outras duas espécies; e sobre o rRNA, não houve variação, todas com 3 rRNA. Os comprimentos gênicos variaram de 22.370 pb em *P. diamantinensis* a 22.483 pb em *Paludicola aquanigra* ($22.426 \pm 56,5$). A variação do comprimento da região intergênica foi de 2.307 pb em *Paludicola aquanigra* a 3.567 pb em *P. communis* (2.769 ± 693) (Tabela 4).

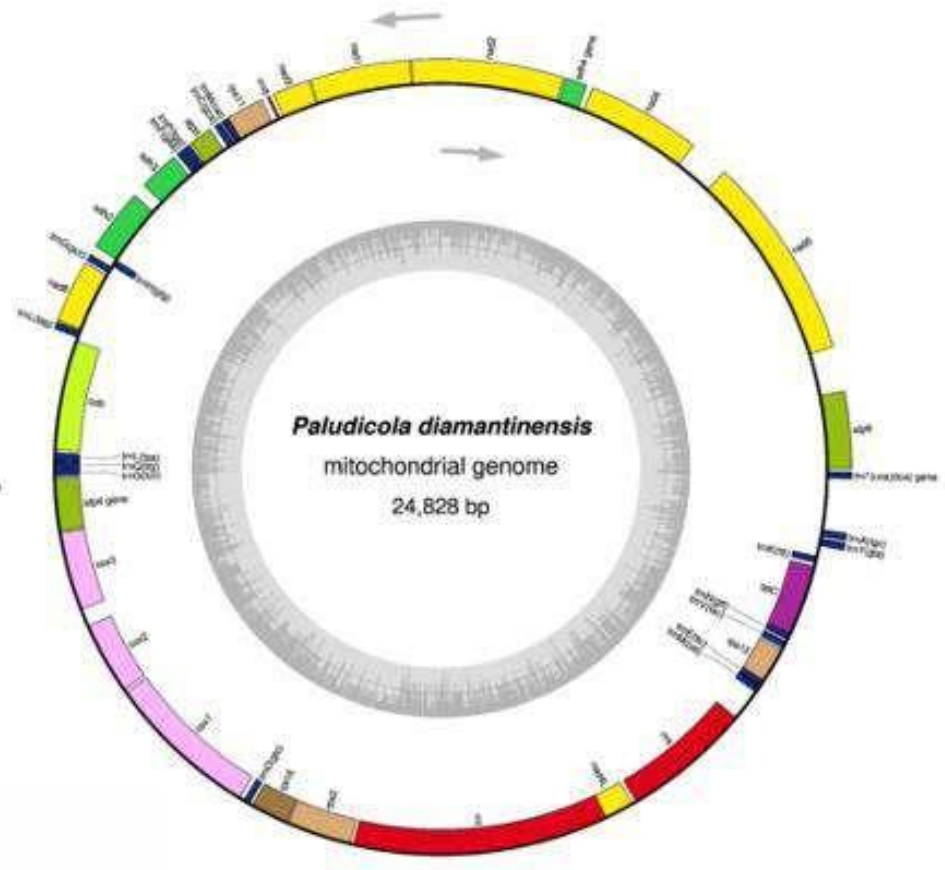
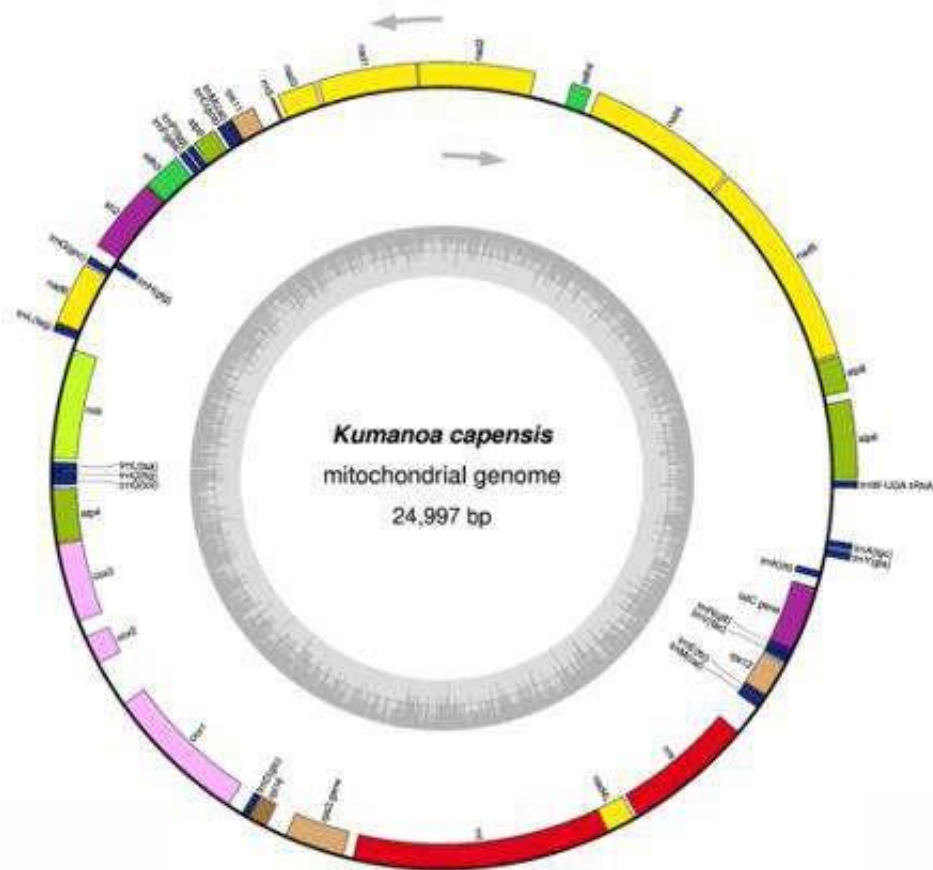
Em *Sheathia*, o tamanho dos genomas variou de 25.036 pb em *Sheathia dispersa* MG787098 a 25.122 em *S. involuta* (25.079 ± 35). O conteúdo de GC variou de 28,4% em *Sheathia dispersa* MG787098 a 29,7% em *Sheathia pedicellata* NC_035349 ($28,7 \pm 0,9$). O número total de genes variou de 46 em *Sheathia pedicellata* NC_035349 a 48 em *S. dispersa* ($47 \pm 0,8$), enquanto no número de genes codificantes somente duas espécies tinham 25, enquanto as outras duas 24. O conteúdo de tRNA e rRNA variou somente em *Sheathia pedicellata* NC_035349 com 19 tRNA e 2 rRNA, as outras espécies com 20 tRNA e 3 rRNA. Os comprimentos gênicos variaram

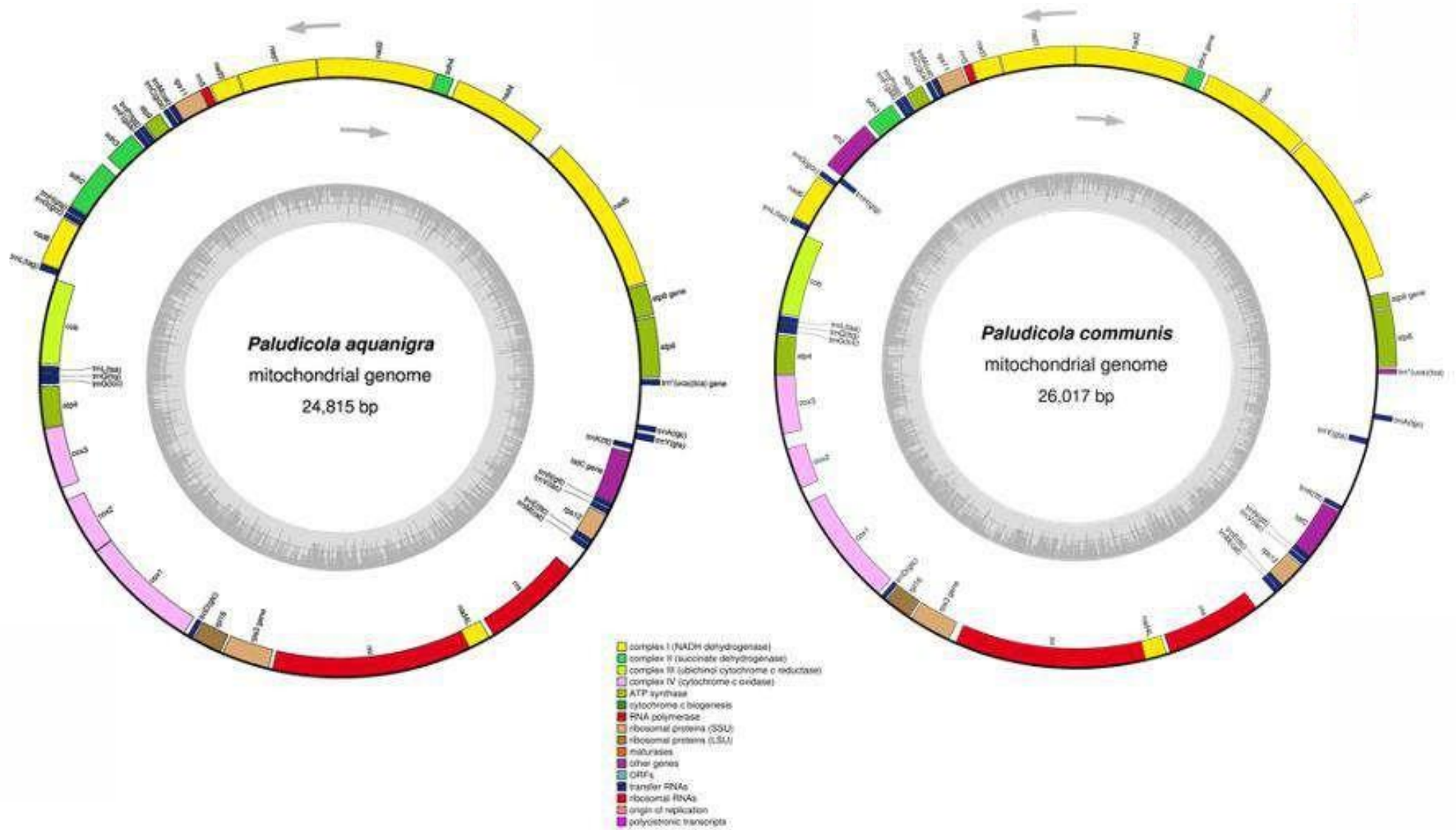
de 22.396 pb em *S. involuta* a 23.736 pb em *Sheathia pedicellata* NC_035349 (23.216 ± 618). A variação do comprimento da região intergênica foi de 1.349 pb em *Sheathia pedicellata* NC_035349 a 2.714 pb em *S. involuta* (1.847 ± 644) (Tabela 4).

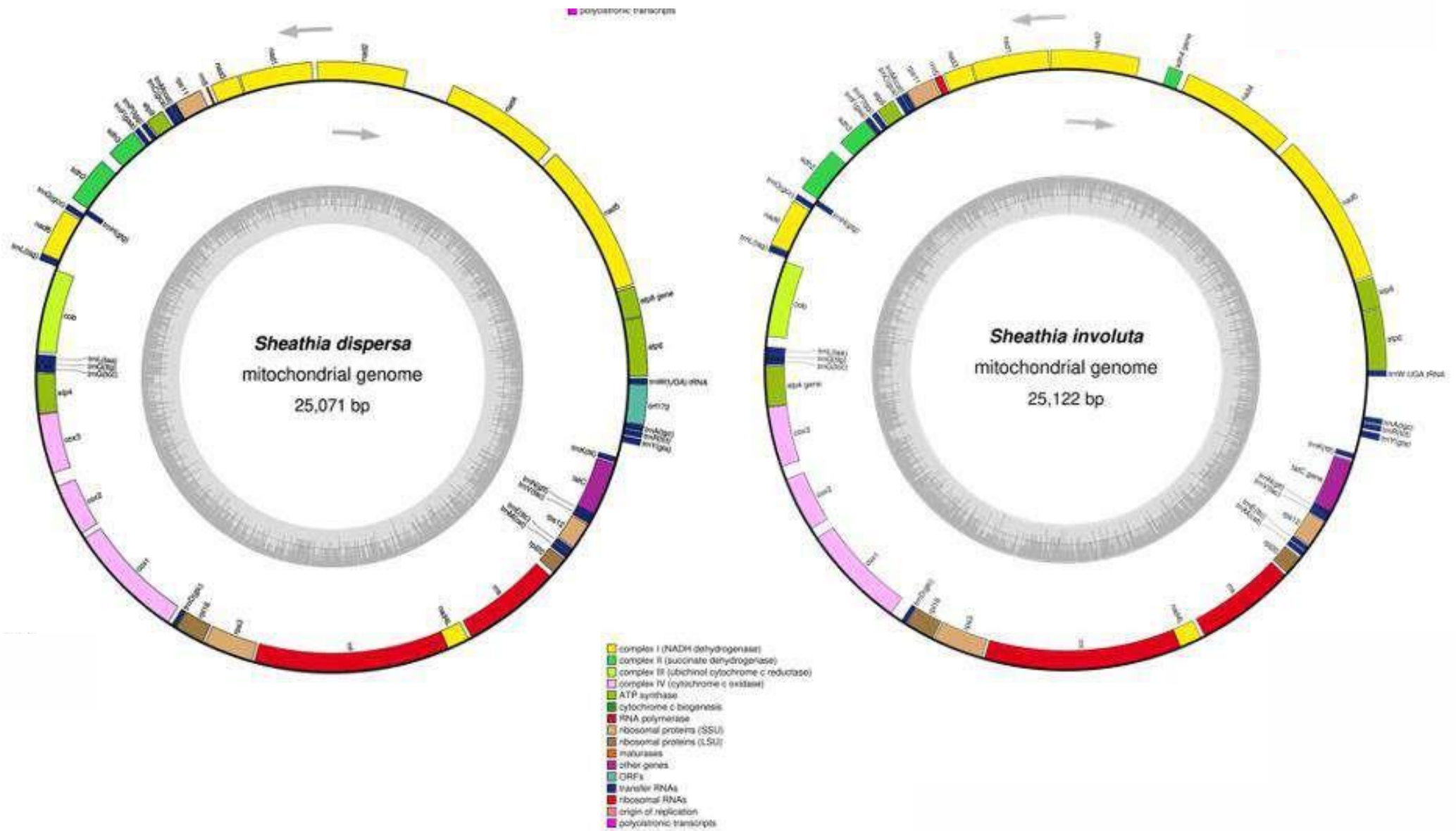
O teste de correlação de Pearson aplicado a todas as características dos genomas plastidiais (valores de cada parâmetro do genoma para todos os táxons, conforme descrito nas Tabelas 3-4), não revelou correlações significativas entre elas.

Figura 3. Mapa dos genomas plastidiais sequenciados de Batrachospermales neste estudo.









Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Acerca dos plastomas de Batrachospermales, (Tabela 5), o tamanho dos genomas foi de 171.682 pb em *Virescentia viride-brasiliensis* MG252484 a ≥ 189.825 pb em *Lympha mucosa* MN509464 ($185.210 \pm 3,9$). O conteúdo de GC variou de 28,1% em *M. macrospora* MG252483 a 31% em *Paralemanea* sp. ($29,3 \pm 1,0$). O número de genes variou de 209 em *Virescentia viride-brasiliensis* MG252484 a 239 em *Nothocladus theaquis* ($226,3 \pm 5,5$), enquanto o número de genes codificantes de proteínas variou de 188 em *Notohesperus serendipidus* a 201 em 6 espécies (*Batrachospermum gelatinosum*, *B. naiadis*, *B. qujingense* MN905507, *Paralemanea blumii*, *Paralemanea grandis* e *S. suecica* ($197,2 \pm 4,4$). O conteúdo de tRNA e rRNA foi semelhante em algumas espécies (10 – 12) com 32 tRNA e 6 rRNA. Os comprimentos gênicos entre os plastomas tiveram a maior variação, de 135.740 pb em *Virescentia viride-brasiliensis* MG252484 a 161.912 pb em *Paralemanea blumii* ($153.204 \pm 7,8$). O comprimento da região intergênica variou de 25.591 pb em *Paralemanea blumii* a 47.591 pb em *Sirodotia delicatuliformis* MG252489 (31.800 ± 5.000).

Nos plastomas dos três gêneros foco deste estudo, em *Kumanoa*, o tamanho do genoma variou de 181.368 pb em *K. mahlacensis* MG252486 a 184.368 em *K. procarpa* ($183.551 \pm 1,0$). O conteúdo de GC variou de 28,2% em *Kumanoa ambigua* MG787095 a 29,8% em *K. mahlacensis* MG252486 ($29,1 \pm 0,6$). O número total de genes variou de 226 em *K. mahlacensis* MG252486 a 235 em *Kumanoa capensis* ($231 \pm 3,6$), enquanto que o número de genes codificantes variou de 199 em *K. mahlacensis* MG252486 a 201 em duas espécies (*Kumanoa ambigua* MG252485 e *Kumanoa americana* KX284725K) ($200 \pm 0,69$). O conteúdo de tRNA variou de 30 em *K. mahlacensis* MK641509 a 32 em *Kumanoa capensis*, e sobre o rRNA, somente *K. mahlacensis* MG252486 com 2 rRNA, as outras espécies (6), todas com 3 rRNA. Os comprimentos gênicos variaram de 148.432 pb em *Kumanoa ambigua* MG252485 a 158.144 pb em *Kumanoa capensis* (155.221 ± 3870). O comprimento da região intergênica variou de 25.712 pb em *K. equisetoides* a 34.265 pb em *Kumanoa ambigua* MG252485 (28.020 ± 3120) (Tabela 6).

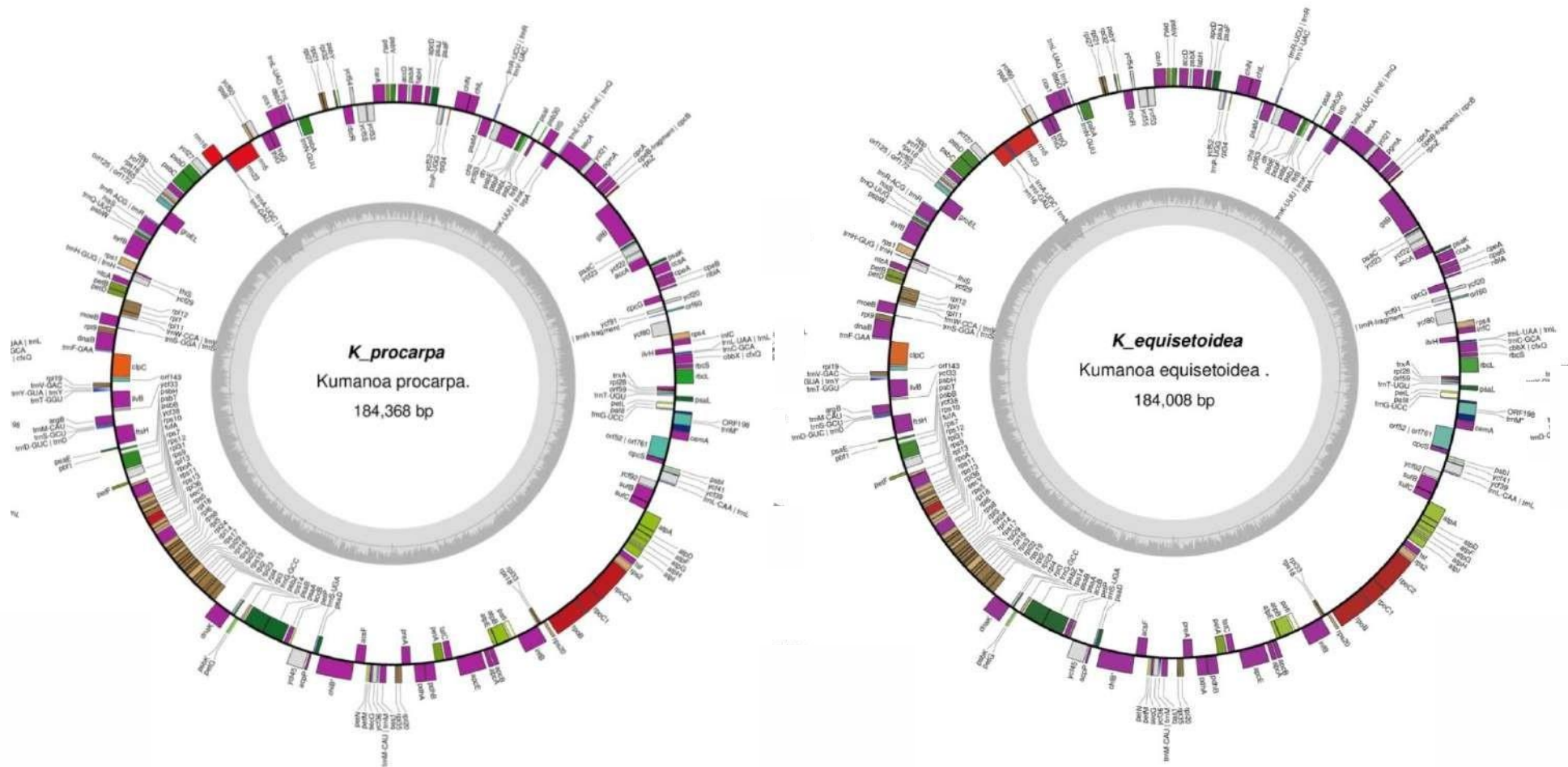
No gênero *Paludicola*, os plastomas variaram no tamanho de 179.217 pb *Paludicola aquanigra* a 183.091 em *P. communis* ($181.320 \pm 1,9$), O

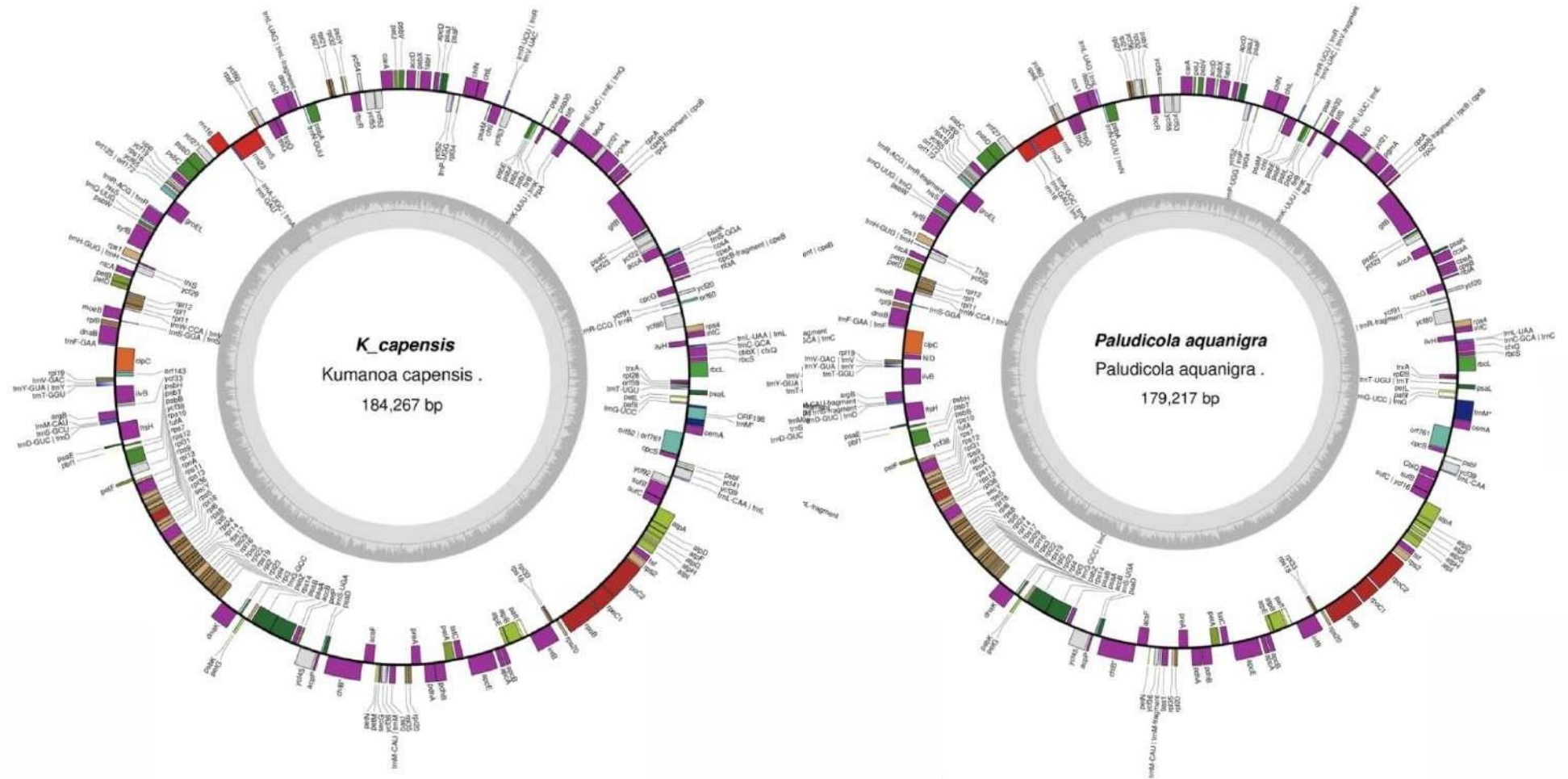
conteúdo de GC variou de 28,5% em *Paludicola aquanigra* a 28,7% em *P. diamantinensis* ($28,6 \pm 0,5$). O número de genes variou de 224 em *Paludicola aquanigra* a 230 em *P. communis* ($226 \pm 3,1$), enquanto o número de genes codificantes variou de 190 em *Paludicola aquanigra* a 197 em *P. communis* ($192,6 \pm 3,7$). O conteúdo de tRNA variou somente em uma espécie com 30 em *P. communis* enquanto que as outras duas espécies com 31; e todas espécies tiveram 3 rRNA. Os comprimentos gênicos variaram de 147,959 pb em *Paludicola aquanigra* a 149.603 pb em *P. communis* (148.621 ± 867). O comprimento da região intergênica variou de 30.969 pb em *Paludicola aquanigra* a 33.200 pb em *P. communis* (32.406 ± 1.247) (Tabela 6).

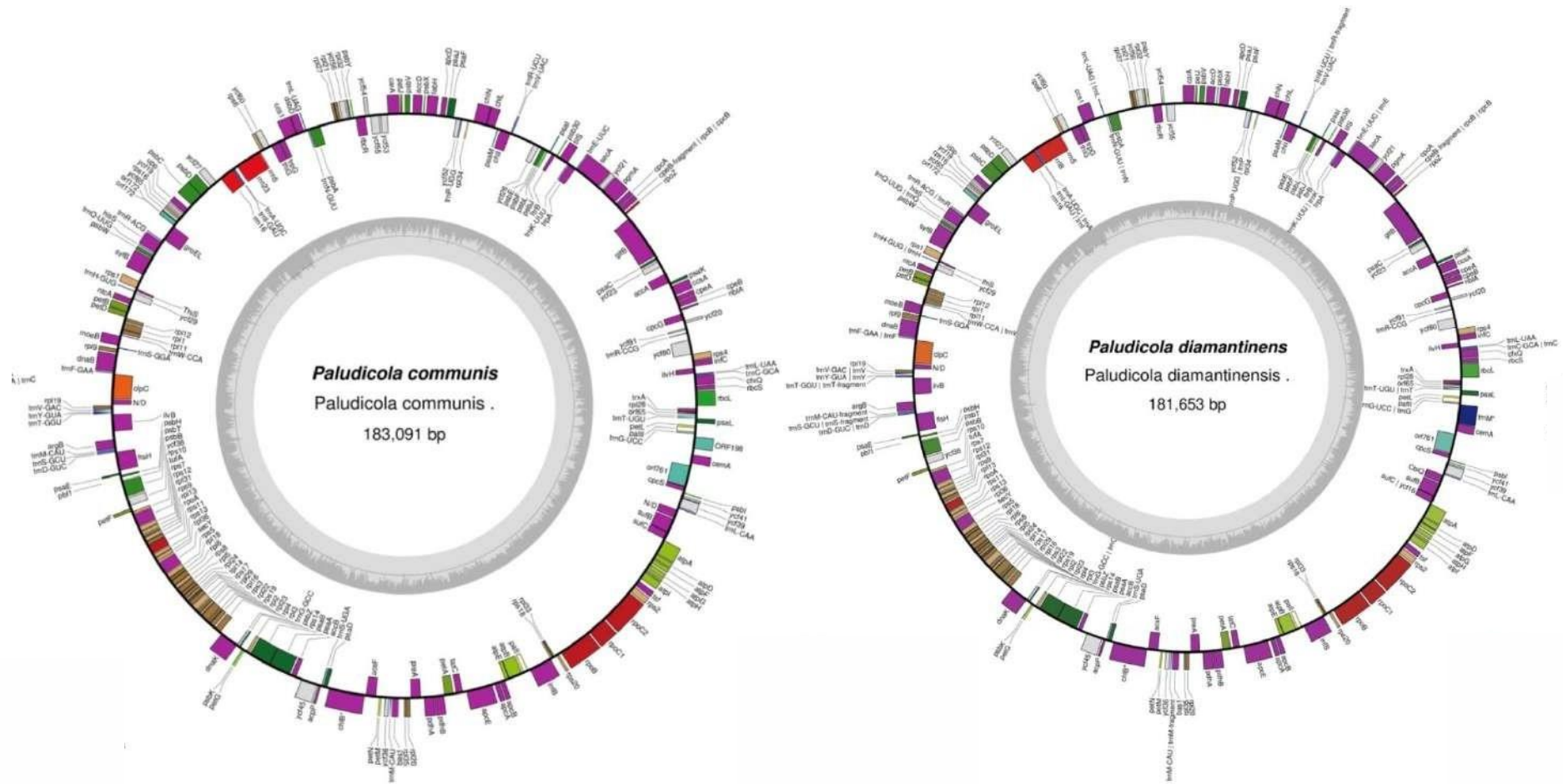
Em *Sheathia*, a variação do tamanho dos genomas foi de 182.806 pb *Sheathia dispersa* MG252488 a 188.048 pb em *S. involuta* ($185.47 \pm 2,6$) e o número de genes variou de 223 em *S. longipedicellata* KY033529 a 238 em *S. involuta* ($233 \pm 6,8$). O conteúdo de GC variou de 29,1% em *Sheathia dispersa* MG252488 a 29,9% em duas espécies (*S. involuta* e *S. longipedicellata* KY033529) ($29,5 \pm 0,5$). O número de genes variou de 223 em *S. longipedicellata* a 238 em *S. involuta* ($233 \pm 6,89$), enquanto o número de genes codificantes variou de 200 em duas espécies (*S. involuta* e *S. longipedicellata* KY033529) a 206 em *Sheathia dispersa* MG252488 ($202 \pm 2,8$). O conteúdo de tRNA variou de 30 em *Sheathia dispersa* MG252488 e *S. dispersa* a 32 em *S. involuta*; e sobre o rRNA, duas espécies com 3 (*Sheathia dispersa* MG252488 e *S. dispersa*) e as outras duas espécies (*S. involuta* e *S. longipedicellata* KY033529) com 6. Os comprimentos gênicos variaram de 152,497 pb *Sheathia dispersa* MG252488 a 161,269 pb em *S. longipedicellata* KY033529 ($156,727 \pm 3973$). A variação do comprimento da região intergênica foi de 25.812 pb em *S. longipedicellata* KY033529 a 30.027 pb em *Sheathia dispersa* MG252488 (28.466 ± 1.834) (Tabela 6).

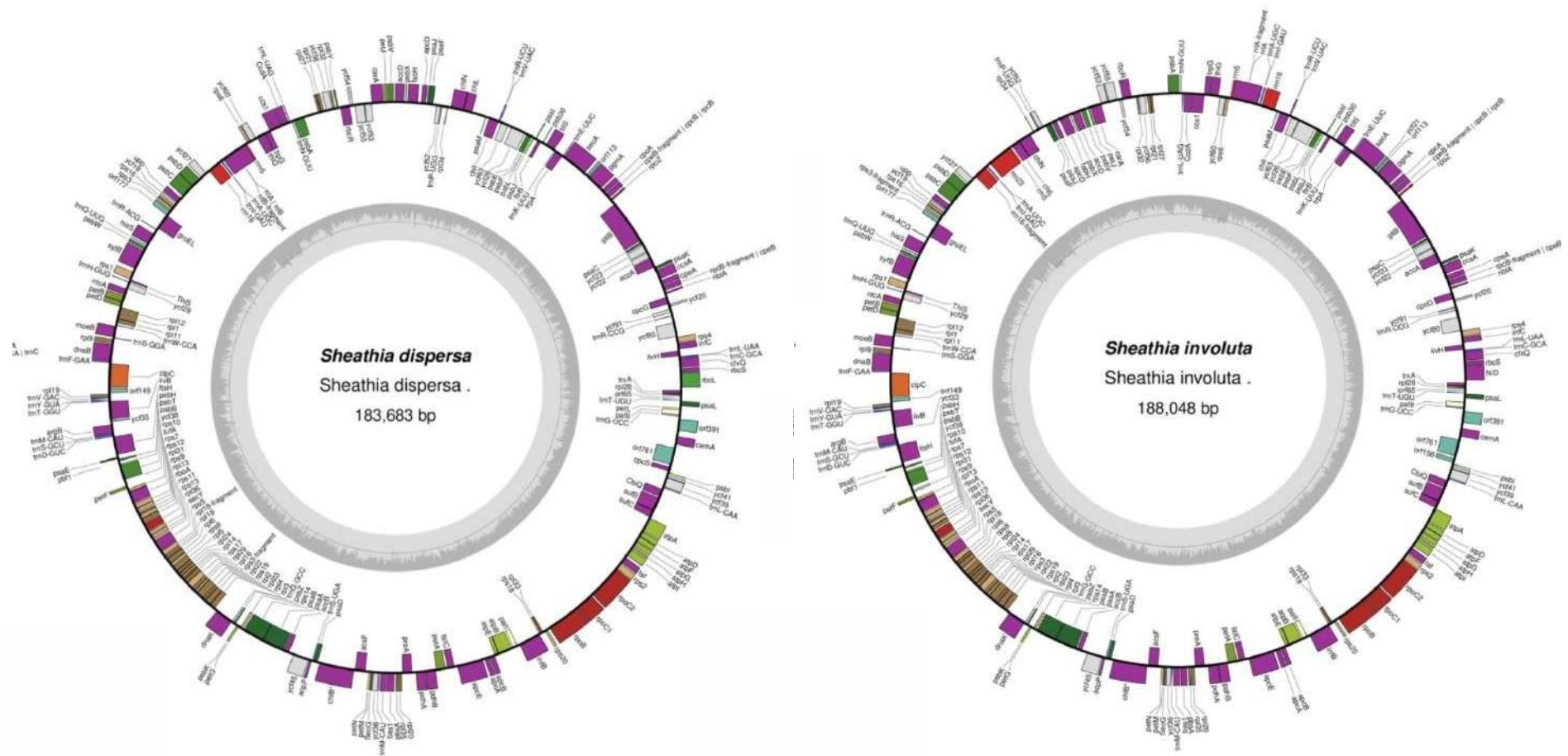
O teste de correlação de Pearson aplicado a todas as características dos genomas plastidiais (valores de cada parâmetro do genoma para todos os táxons conforme descrito nas Tabelas 5-6), não revelou correlações significativas entre elas.

Figura 4. Mapa dos genomas plastidiais sequenciados de Batrachospermales neste estudo.









Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Tabela 3. Características dos mitogenomas de membros dos Batrachospermales publicados anteriormente

Espécies	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA / rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)	Número de acesso Genbank
<i>Batrachospermum gelatinosum</i>	25.340	29,7	45	24	19/ 2	23.272	91,84	2.067	PV153506
<i>B. qujingense</i> MN882544	27.268	29,3	48	27	19/ 2	23.572	86,2	3.672	MN882544
<i>B. naiadis</i>	25.291	30,4	46	24	20/ 2	23.218	91,81	2.072	PV153507
<i>Lemanea borealis</i>	25.946	31,2	45	22	20/ 2	22.568	86,98	3.377	PV153508
<i>L. occidentalis</i>	26.726	31,1	48	24	20/ 2	23.291	87,15	3.434	PV153509
<i>Lympha mucosa</i> MF488959	25.191	27,5	46	24	20/ 2	23.351	92,70	1.839	MF488959
<i>Montagnia australis</i>	22.863	26,8	39	22	14/ 3	21.027	93,22	1.528	PV166915
<i>Nocturama novamundensis</i>	26.682	28,1	44	24	16/ 3	21.491	80,61	5.168	PV156532
<i>Paralemanea</i> sp. MG787097	29.785	32,4	47	25	20/ 3	26.624	89,46	3.136	MG787097
<i>Paralemanea blumii</i>	29.673	30,0	49	26	20/ 3	27.078	91,33	2.569	PV153510
<i>Paralemanea grandis</i>	29.321	30,8	47	24	20/ 3	25.714	87,77	3.582	PV153511
<i>Psilosiphon scoparius</i>	24.751	30,7	40	22	15/ 3	22.018	89,04	2.710	PV158397
<i>Sirodotia delicatuliformis</i> NC039407	25.150	30,7	46	25	18/ 3	23.874	95,01	1.252	NC039407
<i>S. suecica</i>	25.140	31,6	45	23	19/ 2	23.009	91,53	2.130	PV153512
<i>Tuomeya americana</i>	25.207	27,7	46	24	20/ 2	23.042	---	2.139	PV153513
<i>Virescentia viride-americana</i>	25.044	29,0	40	23	14/ 2	22.137	88,49	2.880	PV156531
<i>Volatus carrionii</i>	25.136	29,2	47	24	20/ 3	23.339	92,93	1.774	PV153514
<i>Volatus personatus</i>	25.342	29,0	46	24	20/ 2	23.040	90,91	2.301	PV153515
Média geral	26.103	29,7	45,2	23,9	18/5	23.425	89,7	2.646	---
Desvio padrão	1.885	1,5	2,8	1,3	2,2	1,5	3,3	9,5	—

Tabela 4. Características dos mitogenomas dos três gêneros de Batrachospermales em estudo gerados neste estudo (destacados em negrito) e publicados anteriormente.

Espécies	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA/ rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)	Número de acesso Genbank
<i>Kumanoa capensis</i>	24.997	29,2	45	23	19/ 3	21.433	85,82	3.541	PV112101
<i>K. equisetoides</i>	25.111	28,6	45	23	19/ 3	21.650	86,29	3.438	PV156527
<i>K. procarpa</i>	25.017	29,1	45	23	19/ 3	21.594	86,32	3.422	PV156524
<i>Kumanoa ambigua</i> NC039405	25.862	26,9	41	22	16/ 3	21.984	85,08	3.855	NC039405
<i>Kumanoa mahlacensis</i> NC039406	25.069	28,4	45	23	19/ 3	23.034	91,97	2.012	NC039406
Média geral	25.211	28,4	44,2	22,8	18/4	21.939	87	3.253	---
Desvio padrão	366,5	0,8	1,8	0,44	1,3	644,13	2,82	715,5	---
<i>Paludicola aquanigra</i>	24.815	26,8	45	23	19/ 3	22.483	90,69	2.307	PV156528
<i>P. communis</i>	26.017	26,0	45	23	18/ 3	22.425	86,28	3.567	PV156529
<i>P. diamantinensis</i>	24.828	25,3	44	23	19/ 3	22.370	90,19	2.433	PV156525
Média geral	25.220	26	44,6	23	18,6/ 3	22.426	89	2.769	---
Desvio padrão	690,2	1	0,5	0	0,5	56,5	2,6	693	---
<i>S. dispersa</i>	25.071	28,5	48	25	20/ 3	23.085	92,16	1.963	PV156526
<i>S. involuta</i>	25.122	29,1	47	24	20/ 3	22.396	89,19	2.714	PV156530
<i>Sheathia dispersa</i> MG787098	25.036	28,4	47	24	20/ 3	23.648	94,54	1.365	MG787098
<i>Sheathia longipedicellata</i> NC_035349	25.086	29,7	46	25	19/ 2	23.736	94,62	1.349	NC_035349
Média geral	25.078	28,7	47	24,5	19,7/ 2,5	23.216	92,25	1.847	---
Desvio padrão	35,64	0,9	0,8	0,5	0,5	618	2,3	644	---

Tabela 5. Características dos plastomas de membros dos Batrachospermales publicados anteriormente.

Espécies	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA / rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)	Número de acesso Genbank
<i>Acarposporophycos brasiliensis</i>	183.353	30,6	225	190	31/3	140.654	76,84	42.402	PX373572
<i>Batrachospermum gelatinosum</i>	188.711	29,5	227	201	32/6	159.868	84,84	28.572	PX060844
<i>B. naiadis</i>	188.586	29,9	227	201	32/ 6	159.232	84,58	29.020	PX060845
<i>B. qujingense</i> MN905507	184.902	29,0	227	201	30/4	155.244	84,08	29.384	MN905507
<i>Lemanea borealis</i>	188.030	30,8	225	200	32/6	159.489	84,87	28.424	PX060846
<i>L. occidentalis</i>	188.242	30,8	225	200	32/6	156.451	83,24	31.510	PX060847
<i>Lympha mucosa</i> MN509464	≥189.825	28,4	222	198	32/6	160.396	84,63	29.133	MN509464
<i>Montangnia australis</i>	179.420	28,4	222	189	30/3	143.709	80,23	35.413	PX147381
<i>M. macrospora</i> MG252483	179.687	28,1	226	190	33/3	143.548	80,03	35.810	MG252483
<i>Nocturama novamundensis</i>	185.426	28,2	232	198	31/3	153.765	83,05	31.391	PX171394
<i>Nothocladus kraftii</i>	184.530	28,8	231	198	30/3	154.440	83,82	29.809	PX672968
<i>Nothocladus ranulifer</i>	183.398	29,3	233	195	30/3	152.639	83,36	30.471	PX672969
<i>Nothocladus theaquus</i>	187.490	29,1	239	199	32/6	157.707	84,23	29.516	PX672970
<i>Notohesperus serendipidus</i>	183.582	28,3	221	188	30/3	150.063	81,87	33.242	PX672971
<i>Paralemanea</i> sp. MG252487	187.837	31,0	225	199	28/5	154.961	82,62	32.604	MG252487
<i>Paralemanea blumii</i>	187.783	30,8	227	201	28/6	161.912	86,35	25.591	PX060848
<i>Paralemanea grandis</i>	≥ 183.183	30,3	227	201	30	-----	-----	-----	PX060849
<i>Psilosiphon scoparius</i>	182.178	30,9	227	193	31/3	145.965	80,25	35.922	PX516257
<i>Sirodotia delicatuliformis</i> MG252489	185.489	29,2	225	200	32/3	137.670	74,31	47.591	MG252489
<i>S. suecica</i>	186.915	29,6	226	201	32/6	160.917	86,22	25.726	PX060850
<i>Tolularia puiggariana</i>	186.712	29,1	238	200	32/6	154.746	83,00	31.690	PX421652

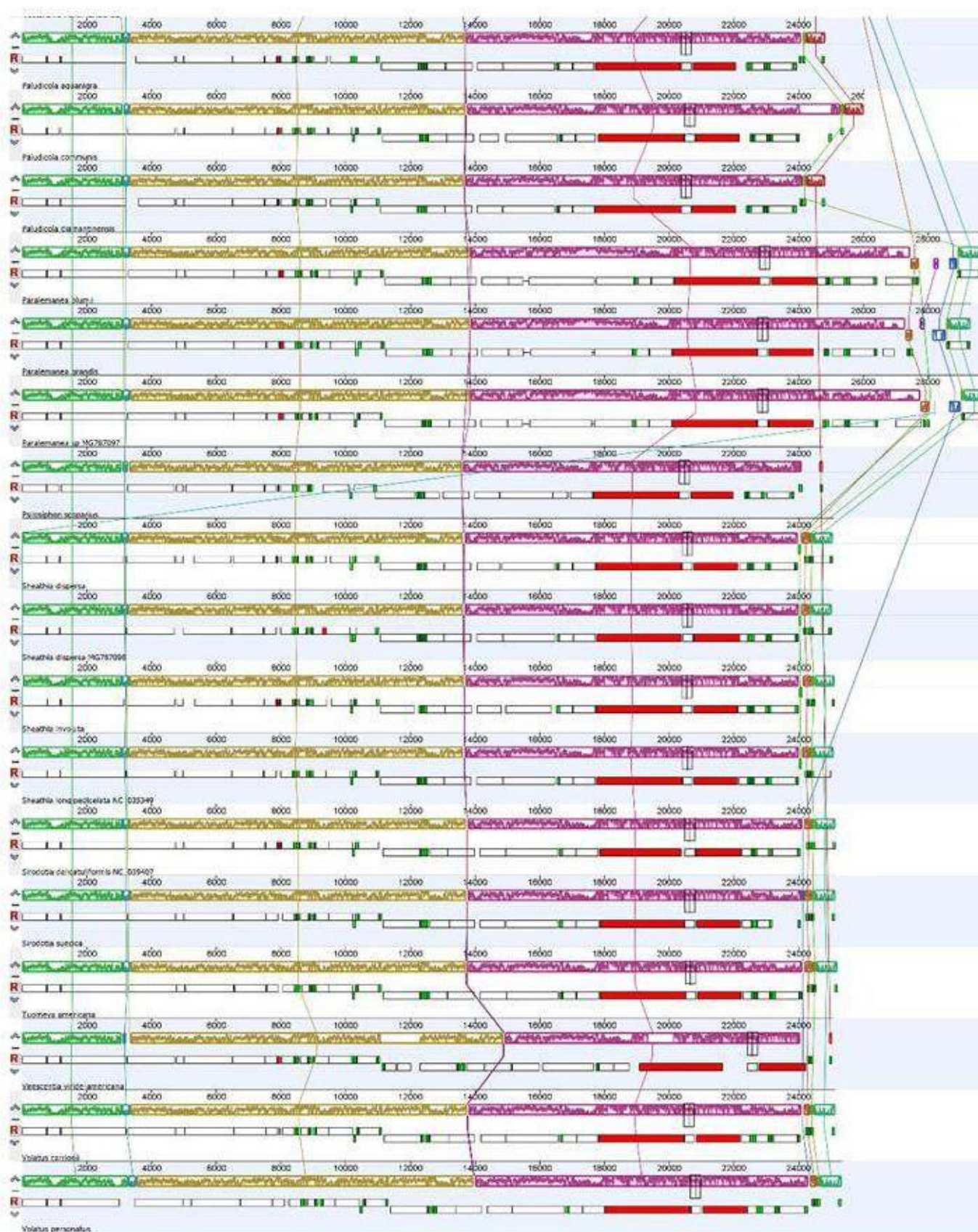
<i>Tuomeya americana</i>	189.523	29,3	225	200	32/6	160.441	84,78	28.807	PX060851
<i>Virescentia viride-americana</i>	184.608	28,6	228	195	30/3	149.171	80,93	35.150	PX421653
<i>Virescentia viride-brasiliensis</i> MG252484	171.682	28,5	209	189	34/3	135.740	79,18	35.696	MG252484
<i>Volatus carrionii</i>	188.856	29,1	225	200	32/6	160.119	84,91	28.465	PX060852
<i>Volatus personatus</i>	≥ 183.580	28,6	225	200	30	-----	-----	----	PX060853
Média geral	3,9	29,3	226,3	197,3	31/4,5	153.204	82,6	31.886	---
Desvio padrão	185.217	1,0	5,5	4,4	1,3	7,8	2,9	5,0	---

Tabela 6. Características dos plastomas dos três gêneros de Batrachospermales em estudo gerados neste estudo (destacados em negrito) e publicados anteriormente.

Espécies	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA / rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)	Número de acesso Genbank
<i>Kumanoa ambigua</i> MG252485	182.932	28,2	228	201	31/3	148.432	81,25	34.265	MG252485
<i>Kumanoa americana</i> KX284725	184.025	29,3	228	201	31/3	156.368	85,11	27.359	KX284725
<i>Kumanoa capensis</i>	184.267	29,2	235	200	32/3	158.144	85,96	25.822	PV564056
<i>K. equisetoides</i>	184.008	29,3	234	200	31/3	157.889	86,00	25.712	PX516260
<i>K. mahlacensis</i> MG252486	181.368	29,8	226	199	31/2	151.124	83,47	29.933	MG252486
<i>K. mahlacensis</i> MK641509	183.893	29,6	233	200	30/3	156.455	85,22	27.127	MK641509
<i>K. procarpa</i>	184.368	29,4	234	200	31/3	158.141	85,91	25.927	PX109641
Média geral	183.551	29,1	231,1	200,1	31/2,8	155.221	84,7	28.020	---
Desvio padrão	1,0	0,6	3,6	0,6	0,5	3870	1,6	3120	---
<i>Paludicola aquanigra</i>	179.217	28,5	224	190	31/3	147.959	82,69	30.969	PX373573
<i>P. communis</i>	183.091	28,6	230	197	30/3	149.603	81,84	33.200	PX375374
<i>P. diamantinensis</i>	181.653	28,7	225	191	31/3	148.301	81,78	33.050	PX421651
Média geral	181.320	28,6	226,3	192,6	30,6/ 3	148.621	82,3	32.406	---
Desvio padrão	1,95	0,5	3,2	3,7	0,5	867,4	0,5	1247	---
<i>Sheathia dispersa</i> MG252488	182.806	29,1	236	206	30/3	152.497	83,55	30.027	MG252488
<i>S. dispersa</i>	183.683	29,2	236	202	30/3	154.476	84,23	28.923	PX516258
<i>S. involuta</i>	188.048	29,9	238	200	32/6	158.669	84,50	29.104	PX516259
<i>S. longipedicellata</i> KY033529	187.354	29,9	223	200	31/6	161.269	86,20	25.812	KY033529
Média geral	185.472	29,5	233,2	202	30,7/ 5	156.727	84,2	28.466	---
Desvio padrão	2,6	0,5	6,8	2,8	0,9	3973,2	1,2	1834	---

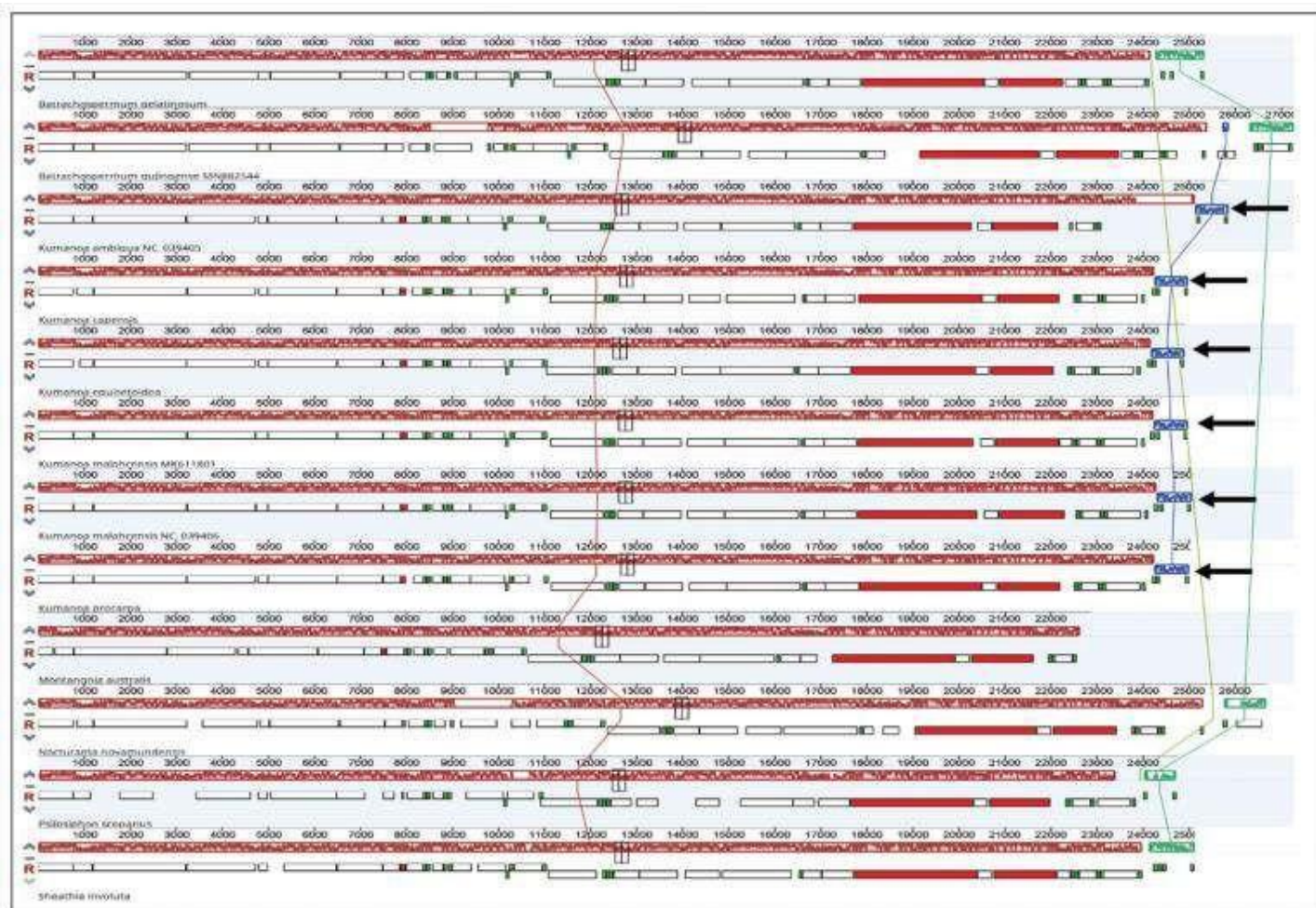
4.2. ARRANJO DO GENOMA

A sintenia entre os membros de Batrachospermales nos mitogenomas mostrou-se altamente conservada. Os alinhamentos revelaram poucos rearranjos, sendo que o algoritmo ProgressiveMAUVE mostrou três grandes blocos colineares (LCB) para alinhamentos dos genomas completos (Figura 5). As espécies de *Kumanoa* apresentaram uma exceção, que consistiu de uma região pequena e divergente (Figura 6). Em termos de perdas gênicas, apenas três genes que ocorrem em outras ordens de Nemaliophycidae estavam ausentes nas Batrachospermales: trnS-AGC tRNA (presente em *Palmariales* e *Thoreales*); trnU tRNA and secY (presente em *Palmariales*); e em relação aos três gêneros foco deste estudo, somente com uma perda gênica do gene rpl20 CDS, presente em todas as espécies do no gênero *Sheathia* e ausente em *Kumanoa* e *Paludicola* (Figura 7). Nos plastomas, houve poucos rearranjos entre os genomas, o algoritmo ProgressiveMAUVE mostrou três grandes blocos colineares (LCB) (Figura 8). Em termos de perdas gênicas, 12 genes que ocorrem em outras ordens de Nemaliophycidae estavam ausentes nas Batrachospermales: apcF (presente em *Palmariales* e *Thoreales*); grx/orf26, orf169, orf307, orf399, orf768, ycf34, ycf35 e ycf46 (presentes em *Palmariales*); orf176, orf334 e orf418 (presentes em *Thoreales*); e em relação aos três gêneros foco deste estudo, 34 genes presentes em *Kumanoa* e *Sheathia* estiveram ausentes em *Paludicola*; pbsA ausente em *Kumanoa* mas presente em *Paludicola* e *Sheathia*; orf753, orf768 e orf773 ocorreu somente em *Paludicola*; e orf466 somente em *Kumanoa* (Tabela 8).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 6: Dados parciais de ProgressiveMauve com as espécies do gênero *Kumanoa* mostrando pequena região divergente (setas).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 7: Mapa da ocorrência de genes codificantes dos mitogenomas em espécies de Batrachospermales e das ordens mais próximas (Palmariales e Thoreales).

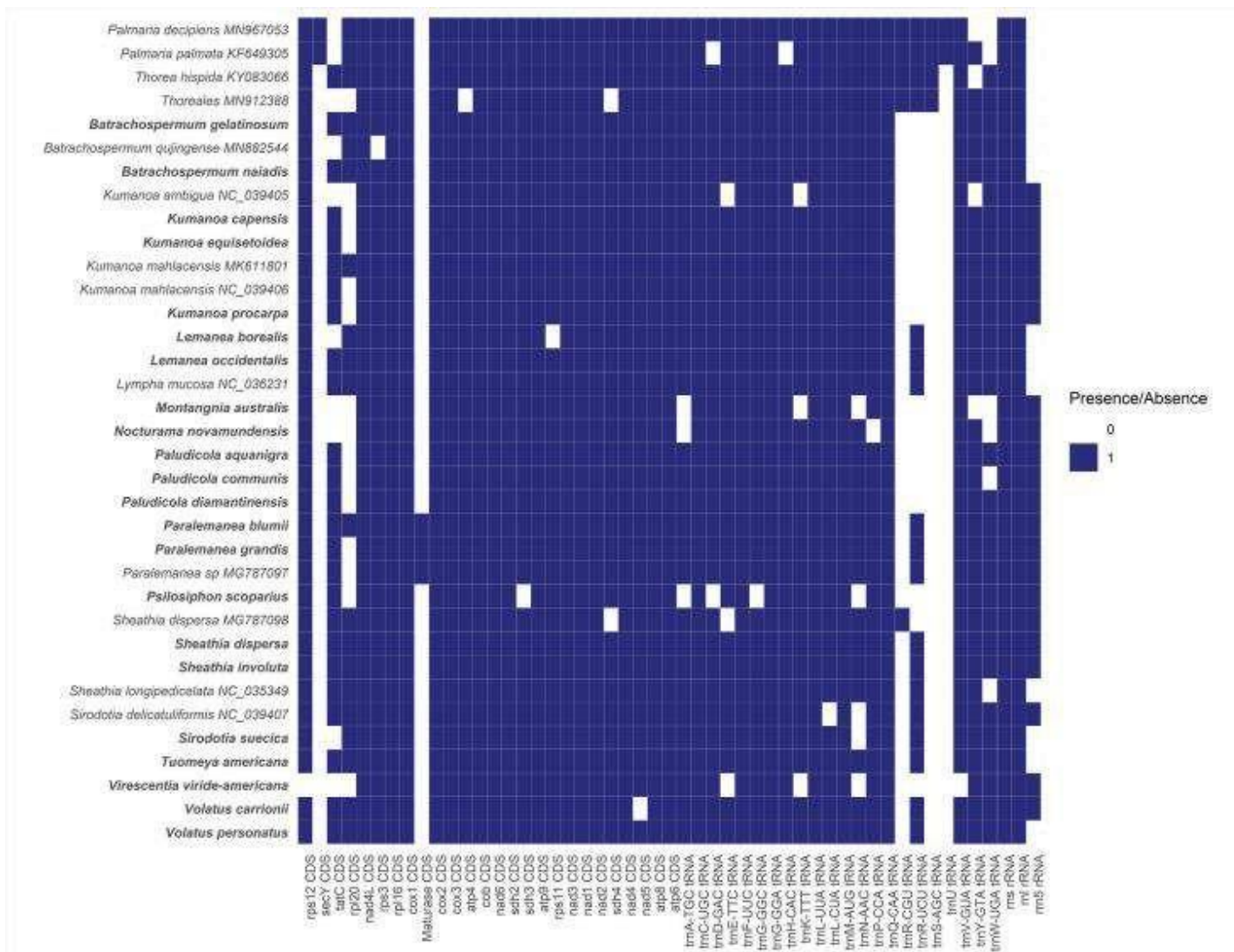


Tabela 7: Mapa da ocorrência de genes codificantes dos plastomas em espécies de Batrachospermales e das ordens mais próximas (Palmariales e Thoreaales).

[illegible]

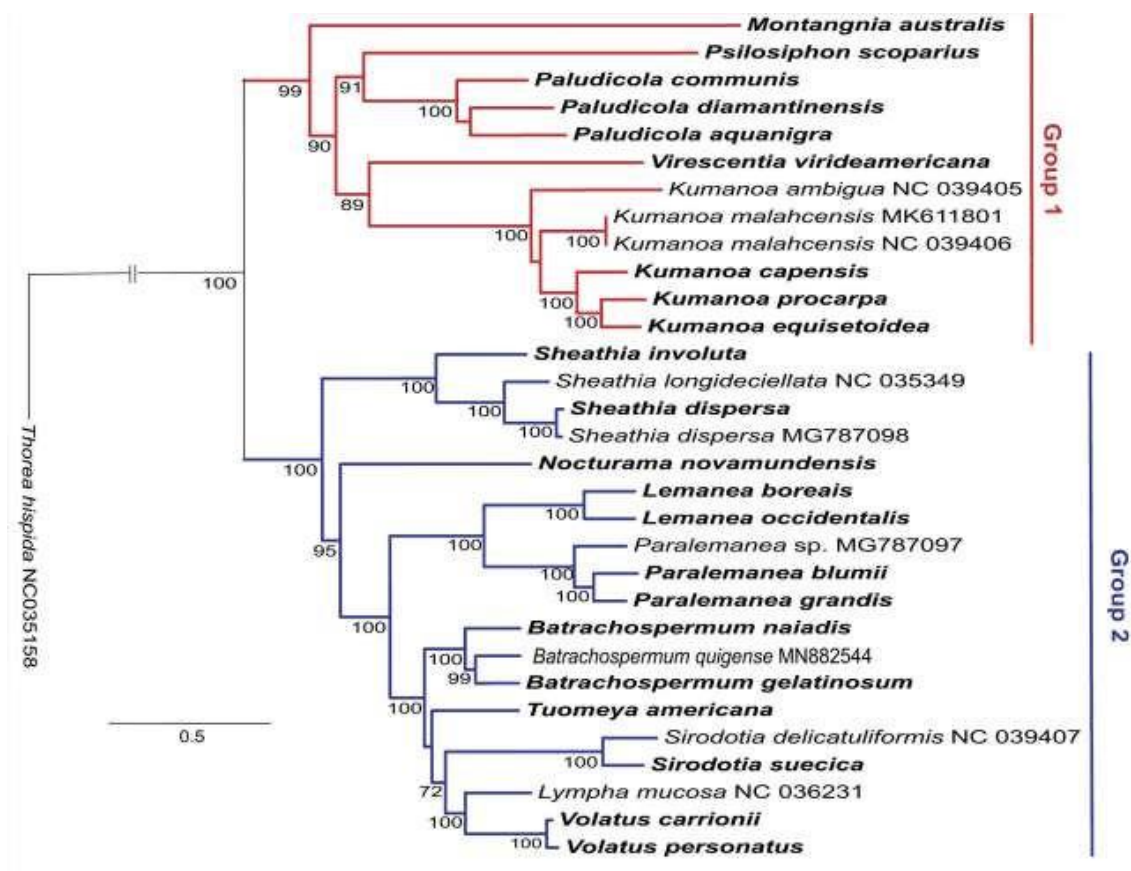
[illegible][illegible]

[illegible]

4.3. FILOGENIA

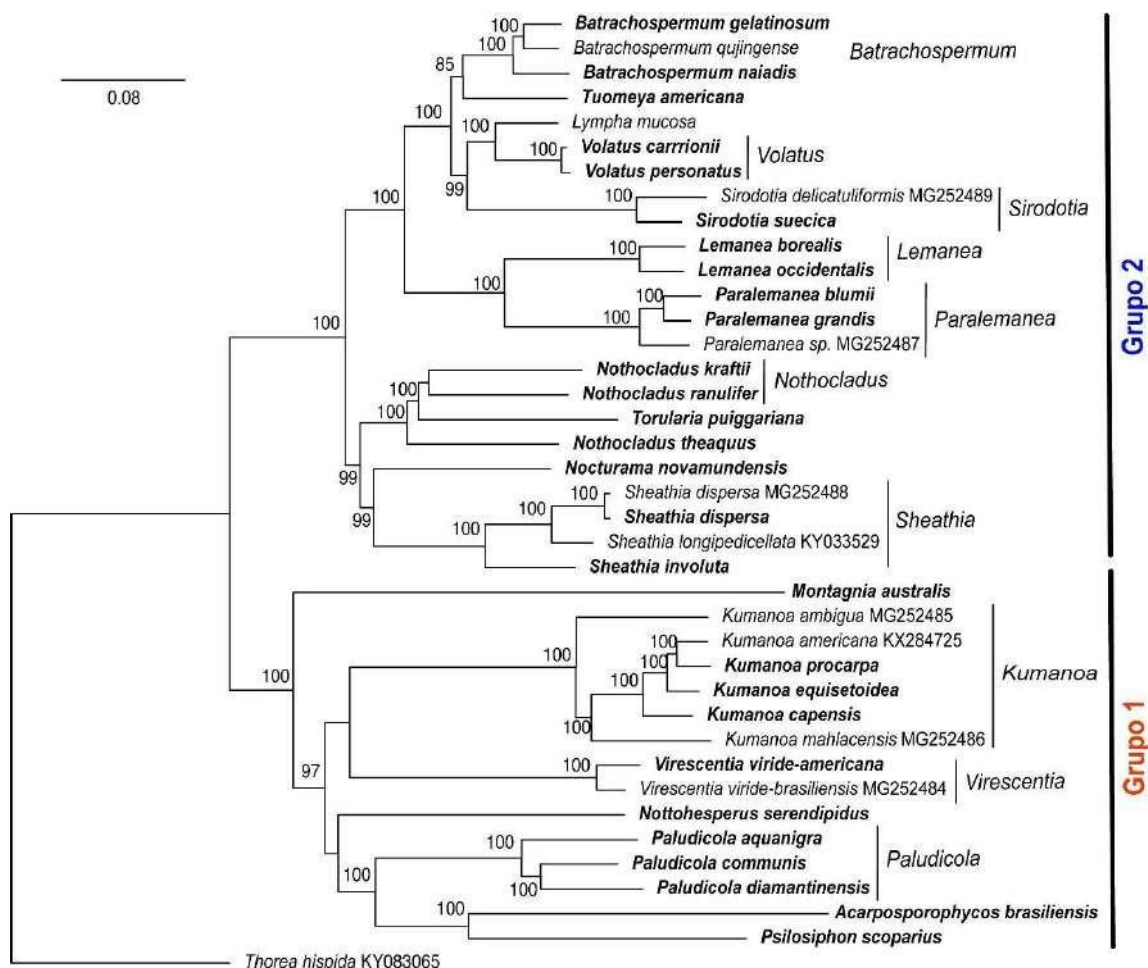
A árvore filogenética de máxima verossimilhança para o conjunto de dados dos mitogenomas (Figura 10) demonstrou a existência de dois grupos com alto suporte (99-100%) sendo os gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* pertencentes ao grupo 1, enquanto que o gênero *Sheathia* no grupo 2. A relação entre os gêneros dentro do clado revelaram que *Kumanoa* e *Paludicola* são gêneros relacionados, pertencentes ao mesmo grande grupo dentro de Batrachospermales (Grupo 1), mas posicionam-se em ramos distintos com separação por outros gêneros intermediários como *Virescentia* (grupo-irmão de *Kumanoa*) e *Psilosiphon* (grupo-irmão de *Paludicola*). Já o gênero *Sheathia* compõe um clado com alto suporte (100%) e está posicionado como grupo mais basal no Grupo 2. A árvore filogenética de máxima verossimilhança para o conjunto de dados dos plastomas (Figura 11) também demonstrou a existência de dois grupos com alto suporte (100%) sendo os gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* pertencentes ao grupo 1, enquanto que o gênero *Sheathia* no grupo 2. A relação entre os gêneros dentro do clado revelaram também que *Kumanoa* e *Paludicola* são gêneros relacionados, pertencentes ao mesmo grande grupo dentro de Batrachospermales (Grupo 1), mas posicionam-se em ramos distintos com separação por outros gêneros intermediários como *Virescentia* (grupo-irmão de *Kumanoa*) e *Acarposporophycos* e *Psilosiphon* (grupos-irmãos de *Paludicola*). Já o gênero *Sheathia* compõe um grupo monofilético com alto suporte (100%) e está posicionado como grupo mais basal no grupo 2.

Figura 10: Árvore de máxima verossimilhança para os mitogenomas dos táxons de Batrachospermales com thoreales como grupo externo, inferida a partir do alinhamento concatenado de 17 genes mitocondriais. Os valores de suporte são % bootstrap e os ramos sem valores tiveram < 70% de suporte.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 11: Árvore de máxima verossimilhança para os plastomas dos táxons de batrachospermales com thoreales como grupo externo, inferida a partir do alinhamento concatenado de 132 genes plastidiais. Os táxons recém-sequenciados estão em negrito. Os valores de suporte são % bootstrap e os ramos sem valores tiveram < 70% de suporte.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, estão descritas as características de oito genomas mitocondriais e oito genomas plastidiais dos três gêneros de Batrachospermales (*Kumanoa*, *Paludicola* e *Sheathia*). Nos mitogenomas, considerando todas as sequências disponíveis no Genbank, bem como os publicados em Lemes da Silva et al. (2025), que incluem as oito sequências desse projeto, a análise das estruturas dos genomas revelou que não há perdas gênicas relevantes, são altamente conservados, com poucos rearranjos, corroborando os dados publicados anteriormente para a ordem (Paiano et al. 2018; Lemes da Silva et al. 2025) e, mais abrangentemente, para as Florideophyceae (Van Beveren et al. 2022). Uma característica particularmente interessante – com exceção somente da porcentagem do genoma constituída por genes que foi alta em todas as espécies – foi que a espécie *Montagnia australis* obteve os menores valores relatados e, em contrapartida, os maiores valores foram relatados para as espécies do gênero *Paralemanea*, cuja ocorrência de um íntron do grupo II contribuiu para formar os maiores mitogenomas dentre as espécies de Batrachospermales sequenciadas até o momento (Paiano et al. 2018; Lemes da Silva et al. 2025).

Considerando os três gêneros de interesse deste estudo, o conjunto de dados dos mitogenomas mostrou que para todos os parâmetros da estrutura genômica houve maior variação entre os gêneros do que dentro de cada um deles, corroborando nossa hipótese de que as maiores diferenças seriam observadas entre os genomas dos três gêneros do que dentro de cada um (Tabela 8). Houve maior proximidade nas médias da estrutura genômica dos gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* do que em *Sheathia*. Além disso, somente no gênero *Sheathia* houve a presença do gene *rpl20* CDS, ausente nos outros dois gêneros. Para os parâmetros da estrutura genômica, houve menor amplitude no tamanho do genoma e no comprimento das regiões intergênicas; contudo, para os demais parâmetros, observou-se maior amplitude em comparação aos gêneros *Kumanoa* e *Paludicola* (Paiano et al. 2018; Lemes da Silva et al. 2025). Destaca-se a ocorrência de uma pequena região divergente nas espécies de *Kumanoa*, que configura uma exceção relevante em relação aos demais representantes da ordem que pode representar um marcador genômico de valor taxonômico. Entretanto, a origem e evolução permanece desconhecida, evidenciando a necessidade de mais dados genômicos para fornecer um quadro mais preciso da história e dinâmica da estrutura dos genomas (Kim et al. 2022;

Lemes da Silva et al. 2025).

Tabela 8. Características dos mitogenomas de Batrachospermales (média e desvio padrão) em geral e dos três gêneros deste estudo.

Gêneros	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA/ rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)
<i>Kumanoa</i> Média geral	25.211	28,4	44,2	22,8	18,4	21.939	87	3.253
<i>Kumanoa</i> Desvio padrão	366,5	0,8	1,8	0,44	1,3	644,13	2,82	715,5
<i>Paludicola</i> Média geral	25.220	26	44,6	23	18,6	22.426	89	2.769
<i>Paludicola</i> Desvio padrão	690,2	1	0,5	0	0,5	56,5	2,6	693
<i>Sheathia</i> Média geral	25.078	28,7	47	24,5	19,75	23.216	92,25	1.847
<i>Sheathia</i> Desvio padrão	35,64	0,9	0,8	0,5	0,5	618	2,3	644
Batrachospermales geral Média geral	26.103	29,7	45,2	23,9	18,5	23.425	89,7	2.646
Batrachospermales geral Desvio padrão	1.885	1,5	2,8	1,3	2,2	1,5	3,3	9,5

A análise de sintenia dos plastomas de todas as Batrachospermales, assim como dos mitogenomas, mostrou a presença de poucos rearranjos, apontando que esses genomas possuem estruturas similares, seguindo a tendência de Florideophyceae (Costa et al. 2016; DíazTapia et al. 2017). No entanto, algumas novas características relevantes foram reveladas em nosso estudo. Os tamanhos dos genomas em membros de Batrachospermales (171.682 – ≥189.825 pb) estão próximos das menores faixas relatadas para Florideophyceae (171.392-194.153 nt; Costa et al. 2016; Lee et al. 2016; Paiano et al. 2017). Além disso, as diferenças no tamanho dos genomas plastidiais dentro da ordem foram altas (~18.143 pb) em comparação com outras ordens onde mais de um membro foi sequenciado: Ceramiales, Gelidiales, Gracilariales, Hildenbrandiales e Nemaliales (4.000-8.000 pb; Costa et al. 2016, Lee et al. 2016, Díaz-Tapia et al. 2017). Em termos de genes codificantes de proteínas, os membros das Batrachospermales apresentam o menor conteúdo genético (variando de 188 a 201) entre as Florideophyceae (184-235; Costa et al. 2016, Lee et al. 2016; Paiano et al. 2017). Entre os três gêneros de interesse deste estudo, não foram encontradas correlações significativas nos parâmetros descritivos da estrutura genômica. Uma exceção foi *S. longipedicellata* KY033529 que apresentou menor amplitude no número total de genes em

relação às demais espécies do gênero com maior desvio padrão nesse parâmetro da estrutura do plastoma. Além disso, em *Paludicola*, somente o comprimento da região intergênica (pb) tiveram maior amplitude na estrutura do genoma plastidial, mas para os demais parâmetros evidenciaram menor amplitude em comparação aos gêneros *Kumanoa* e *Sheathia*.

Em termos de perda gênica, é importante notar a ausência de *apcF* em todos os táxons sequenciados de Batrachospermales. Esse gene codifica a subunidade beta da aloficocianina, um componente da ficobilina das proteínas coletoras de luz, características das algas vermelhas (Apt e Grossman 1993). Sua ausência em Batrachospermales foi evidenciada por Paiano et al. (2018) e este estudo confirmou essa ausência em número muito maior de táxons, podendo ser interpretada como uma perda em todos representantes da ordem ou alternativamente há possibilidade do gene ter sido transferido para o núcleo. Chang et al. (2015) relataram que a função de *apcF* foi possivelmente substituída por outra aloficocianina (*apcB*), uma hipótese alternativa, mas há necessidade de mais dados genômicos para avaliar a perda gênica de todos membros da ordem.

Tabela 9. Características dos plastomas de Batrachospermales (média e desvio padrão) em geral e dos três gêneros deste estudo.

Espécies (14)	Tamanho do genoma (pb)	% GC	Nº total de genes	Nº de genes codificantes	RNA tRNA/ rRNA	Comprimento total do gene (pb)	% do genoma (Genes)	Comprimento da região intergênica (pb)
<i>Kumanoa</i> Média geral	183.551	29,1	231,1	200,1	31	155.221	84,7	28.020
<i>Kumanoa</i> Desvio padrão	1,0	0,6	3,6	0,6	0,5	3870	1,6	3120
<i>Paludicola</i> Média geral	181.320	28,6	226,3	192,6	30,6	148.621	82,3	32.406
<i>Paludicola</i> Desvio padrão	1,9	0,5	3,2	3,7	0,5	867,4	0,5	1247
<i>Sheathia</i> Média geral	185.472	29,5	233,2	202	30,7	156.727	84,2	28.466
<i>Sheathia</i> Desvio padrão	2,6	0,5	6,8	2,8	0,9	3973	1,2	1834
Batrachospermales geral Média geral	185.217	29,3	226,3	197,2	31,0	153.204	82,6	31.886
Batrachospermales geral Desvio padrão	3,9	1,0	5,5	4,4	1,3	7,8	2,9	5,0

As árvores filogenéticas, tanto de mitogenomas quanto de plastomas,

revelaram a existência de dois grandes grupos dentro das Batrachospermales, os quais já tinham sido encontrados em outras análises filogenéticas anteriores com base em genes individuais (Entwistle et al. 2009), multigênicas (Lam et al. 2016) e filogenômicas (Paiano et al. 2017, 2018; Lemes da Silva et al. 2025). Na relação entre os três gêneros, o conjunto dos dados para mitogenomas e plastomas foram essencialmente congruentes, evidenciando que cada um dos gêneros *Kumanoa*, *Paludicola* e *Sheathia* representam ramos com alto suporte. Para *Kumanoa* e *Paludicola*, em ambas as árvores, observou-se maior proximidade, pois ambos fizeram parte do mesmo grupo, mas posicionaram-se em ramos distintos com separação por outros gêneros intermediários. Já, *Sheathia* foi observado como pertencendo ao grupo 2 e posicionado como grupo mais basal. O alto suporte geral para as árvores sugerem que as filogenias dos genomas organelares são ferramentas capazes de elucidar as relações anteriormente ainda não compreendidas entre ordens, famílias e gêneros de Florideophyceae, muitas das quais não podem ser descritas facilmente e somente por dados morfológicos, genes únicos ou mesmo pequenas filogenias multigênicas (Verbruggen et al. 2010; Paiano et al. 2017, 2018; Lemes da Silva et al. 2025). Assim, com base no conjunto de dados de mitogenomas e de plastomas gerados a partir das análises filogenéticas de membros da ordem Batrachospermales, corroboram a hipótese do posicionamento filogenético distante dos três gêneros.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS S. (2016). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- BECK N. & LANG B.F. (2010). MFannot, organelle genome annotation web server. Available from: <https://github.com/BFL-lab/Mfannot>.
- BOLGER A.M., LOHSE M. & USADEL B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- BOROWIEC, M. L. (2016) AMAS: A fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ*, v. 4, e1660. DOI: 10.7717/peerj.1660.
- CHANG, L. , LIU, X. , Li, Y. , LIU , CC , YANG, F. , ZHAO, J. & SUI , SF. (2015). Organização estrutural de um ficobilissomo intacto e sua associação com o fotossistema II . *Cell Research* 25 : 726-37 .
- CHAN P.P. & LOWE, T.M. (2019). tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. In Kollmar, M. [Ed.] *Gene Prediction: Methods and Protocols*, 1962: 1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1
- COSTA J.F., LIN S., MACAYA E.C., FERNÁNDEZ-GARCÍA C. & VERBRUGGEN H. (2016). Chloroplast genomes as a tool to resolve red algal phylogenies: a case study in the Nemaliales. *BMC Ecology and Evolution* 16:205. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0772-3>
- DARLING A.E., MAU B. & PERNA N.T. (2010). ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss, and rearrangement. *PLoS ONE* 5: e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- DIAZ-TAPIA P., MAGGS C.A., WEST J.A. & VERBRUGGEN H. (2017). Analysis of chloroplast genomes and a supermatrix inform reclassification of the Rhodmelaceae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 53:920-37. <https://doi.org/10.1111/jpy.12553>
- DIERCKXSENS N., MARDULYN P. & SMITS G. (2017). NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research* 45(4):e18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw955>
- EDGAR R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- ENTWISLE T.J., VIS M.L., CHIASSEN W.B., NECCHI O. Jr & SHERWOOD A.R. (2009). Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) – a synthesis. *Journal of Phycology* 45: 704-715. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00686.x>

- GARBARY, D. J. & GABRIELSON, P. W. (1990). Taxonomy and evolution. In Cole K.M. & Sheath R.G. [Eds.] *Biology of the red algae*. Cambridge Univ. Press, New York: 477-98.
- Greiner, S., Lehwark, P. & Bock, R. 2019. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* 47: doi: 10.1093/nar/gkz238.
- GREINER S., LEHWARK P. & BOCK R. (2019). Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W59-W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz238>
- HOANG, D. T.; CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q.; VINH, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 2, p. 518-522, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msx281
- IHA C., GRASSA C.J., LYRA G.M., DAVIS C.C., VERBRUGGEN H. & OLIVEIRA M.C. (2018). Organellar genomics: a useful tool to study evolutionary relationships and molecular evolution in Gracilariaceae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 54: 775-787. <https://doi.org/10.1111/jpy.12765>
- JANOŮŠKOVEC J., SHAO-LUN L., MARTONE P.T., CARRÉ W., LEBLANC C., COLLÉN J. & KEELING P.J. (2013). Evolution of red algal plastid genomes: ancient architectures, introns, horizontal gene transfer, and taxonomic utility of plastid markers. *PLoS ONE* 8: e59001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059001>
- JIN J-J, YU W.B., YANG J.B., SONG Y., PAMPHILIS C.W., YI T.S. & LI D.Z (2020). GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome Biology* 21: 241. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02154-5>
- KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T. K. F.; VON HAESELER, A.; JERMIIN, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, v. 14, n. 6, p. 587-589. DOI: 10.1038/nmeth.4285
- KIM, D., LEE, J., CHO, C. H., KIM, E. J., BHATTACHARYA, D., & YOON, H. S. (2022). Group II intron and repeat-rich red algal mitochondrial genomes demonstrate the dynamic recent history of autocatalytic RNAs. *BMC Biology*, 20, 2. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01200-3>
- KUMANO S. (2002). *Freshwater red algae of the world*. Biopress, Bristol.
- LAM, D. W., VERBRUGGEN, H., SAUNDERS, G. W. & VIS, M. L. (2015). Multigene phylogeny of the red algal subclass Nemaliophycidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 730-736. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.015>
- LEE J.M., BOO S.M., MANSILLA A. & YOON H.S. (2015). Unique repeat and plasmid sequences in the mitochondrial genome of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia* 54:20-23. <https://doi.org/10.2216/PH14-97.1>

LEE, J.M., CHO, C. H., PARK, S. I., CHOI, J. W., SONG, H. S., WEST, J. A., BHATTACHARYA, D. & YOON, H.S. (2016). Parallel evolution of highly conserved plastid genome architecture in red seaweeds and seed plants. *BMC Biology* 14:75. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0299-5>

LEE J.M., SONG H.J., PARK S.I., LEE Y.M. JEONG S.Y., CHO, T.O., YOON, H.S. (2018). Mitochondrial and Plastid Genomes from Coralline Red Algae Provide Insights into the Incongruent Evolutionary Histories of Organelles. *Genome Biology and Evolution* 10: 2961-2972. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy222>

LEMES DA SILVA, N. M.; CROWELL, R. M.; VIS, M. I.; CHIASSON, W. B.; PAIANO, M. O.; LOPES, Y. M. S.; NECCHI JR., O. (2025). Investigation of mitochondrial genomes of members of the order Batrachospermales (Rhodophyta). *Phycologia*, v. 64, p 118-126, 2025. DOI: 10.1080/00318884

LELIAERT, F., TRONHOLM, A., LEMIEUX, C., TURMEL, M., DEPRIEST, M., BHATTACHARYA, D., KAROL, K. G. ET AL. (2016). Chloroplast phylogenomic analyses reveal the deepest-branching lineage of the Chlorophyta, Palmophyllophyceae class. nov. *Scientific Reports* 6:25367.

MINH, B. Q.; HAHN, M. W.; LANFEAR, R. (2020). New methods to calculate concordance factors for phylogenomic datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 37, p. 2727-2733.

MUÑOZ-GÓMEZ, S., MEJÍA-FRANCO, F.G., DURNIN, K., COLPS, M. GRISDALE, C.J., ARCHIBALD, J.M. & SLAMOVITS, C.H. (2017). The new red algal subphylum Proteorhodophytina comprises the largest and most divergent plastid genomes known. *Current Biology*, v. 27, p. 1677-1684. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.054>

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

NECCHI O JR, WEST JA, GANESAN EK, YASMIN F, RAI SK, ROSSIGNOLO NL (2019) Diversity of the genus *Sheathia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in northeast India and east Nepal. *Algae* 34: 277-288. <https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.10.30>

NURK S., MELESHKO D., KOROBAYNIKOV A. & PEVZNER PA. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research* 27: 824-834. DOI: 10.1101/gr.213959.116

PAIANO M.O., DEL CORTONA A., COSTA J.F., LIU S.-L., VERBRUGEN H., DE CLERCK O. & NECCHI, O. JR. (2017). Organization of plastid genomes in the freshwater red algal order Batrachospermales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 54: 25-33. <https://doi.org/10.1111/jpy.12602>

PAIANO M.O., DEL CORTONA A., COSTA J.F., LIU S.-L., VERBRUGEN H., DE CLERCK O. & NECCHI, O. JR. (2018). Complete mitochondrial genomes of six species of the freshwater red algal order Batrachospermales (Rhodophyta). *Mitochondrial DNA B* 23:607-610. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1473734>

- PRJIBELSKI A., ANTIPOV D., MELESHKO D., LAPIDUS A. & KOROBENNIKOV A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70: e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- PUESCHEL C.M. & COLE, K.M. (1982). Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. *American Journal of Botany* 69: 703-720. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1982.tb13310.x>
- SALOMAKI, E. D.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; VIS, M. L. (2014). Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. *Journal of Phycology*, v. 50, n. 3, p. 526- 542, 2014. DOI: 10.1111/jpy.12179
- SAUNDERS, G. W.; HOMMERSAND, M. H. (2004). Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany*, 91(10), 1494-1507.
- SAYERS E.W., CAVANAUGH M., CLARK K., OSTELL J., PRUITT K.D., KARSCH-MIZRACHI I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research* 48: D84-D86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz956>
- STAMATAKIS, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- VAN BEVEREN F., EME L., LÓPEZ-GARCÍA P., CIOBANU M. & MOREIRA D. (2022). Independent Size Expansions and Intron Proliferation in Red Algal Plastid and Mitochondrial Genomes. *Genome Biology and Evolution* 14: evac037. <https://doi.org/10.1093/gbe/evac037>
- VIS, M. L.; NECCHI JR., O. (2012). Monograph of the genus *Kumanoa* (Rhodophyta, Batrachospermales). *Bibliotheca Phycologica*, n. 116, p. [1]- 79, pls 1-26.
- VIS, M. L.; NECCHI, O., JR.; CHIASSON, W. B.; ENTWISLE, T. J. (2012). Molecular phylogeny of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, v. 48, n. 3, p. 750-758, 2012. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01141.x.
- VIS, M. L.; LEE, J.; ELORANTA, P.; CHAPUIS, I. S.; LAM, D. W.; NECCHI JR., O. (2020). *Paludicola* gen. nov. and revision of the species formerly in *Batrachospermum* section *Turfosa* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, v. 56, n. 4, p. 844-861. DOI: 10.1111/jpy.13001.
- VIS M.L. & NECCHI O. JR (2021). Subphylum Eurhodophytina, Class Florideophyceae, Subclass Nemaliophycidae, Order Batrachospermales. In: *Freshwater red algae: phylogeny, taxonomy and biogeography* (Ed. By M.L. Vis & O. Necchi Jr), pp. 129-332. Springer Nature, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83970-3_5
- YANG E.C., KIM K.M., KIM S.Y., LEE J.M., BOO G.H., LEE, J.H. ... YOON H.S. (2015). Highly Conserved Mitochondrial Genomes among Multicellular Red Algae of the Florideophyceae, *Genome Biology and Evolution* 7: 2394-2406, <https://doi.org/10.1093/gbe/evv147>

YANG E.C., BOO S.M., BHATTACHARYA D., SAUNDERS G.W., KNOLL A. H., FREDERICQ S., GRAF L. & YOON, H.S. (2016). Divergence time estimates and the evolution of major lineages in the florideophyte red algae. *Scientific Reports* 6: 21361. <https://doi.org/10.1038/srep21361>

WICK RR, SCHULTZ MB, ZOBEL J, HOLT KE. (2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* 31: 3350-3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>

ZAR, J.H. (2010). Biostatistical Analysis, 5th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River.