



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

Monica Orlandi Paiano

Filogeografia de algumas espécies de Batrachospermales
(Rhodophyta) no Brasil

São José do Rio Preto

2016

Monica Orlandi Paiano

Filogeografia de algumas espécies de Batrachospermales
(Rhodophyta) no Brasil

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

Financiadora: FAPESP – Proc.2013/06436-5

Orientador: Prof. Dr. Orlando Necchi Junior

São José do Rio Preto

2016

Paiano, Monica Orlandi.

Filogeografia de algumas espécies de Batrachospermales (Rhodophyta) no Brasil / Monica Orlandi Paiano. -- São José do Rio Preto, 2016

160 f. : il., tabs.

Orientador: Orlando Necchi Junior

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia de água doce. 2. Filogeografia. 3. Alga vermelha - Classificação. 4. Marcadores genéticos. 5. Batrachospermales – Brasil. 6. Variação genética. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 582.26

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

Monica Orlandi Paiano

Filogeografia de algumas espécies de Batrachospermales
(Rhodophyta) no Brasil

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

Financiadora: FAPESP – Proc.2013/06436-5

Comissão Examinadora

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

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

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

Prof^a. Dr^a. Daniela Milstein
UNIFESP – Baixada Santista

Prof^a. Dr^a. Inessa Lacativa Bagatini
UFSCAR – São Carlos

São José do Rio Preto
03 de novembro de 2016

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente
fica nossa ignorância”. (John F. Kennedy)*

“A minha mãe Vilma e meu irmão Marcel, por toda paciência, suporte e amor a mim dedicados, e ao meu amado pai, que me ilumina e acalma, onde quer que ele esteja”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Orlando Necchi Jr., minha sincera gratidão por seus ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pela paciência, incentivo e orientação, para que pudéssemos concluir este trabalho.

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.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, e à sua coordenadora Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes pela oportunidade e incentivo.

Ao Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, e aos seus funcionários pela amizade e pelos serviços prestados.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado e pelos auxílios financeiros (projeto individual Proc. 2008/00708-5; projeto temático Proc. 2007/51270-7).

Ao Prof. Dr. Olivier De Clerck e a Gent University (Bélgica) pela oportunidade de novos aprendizados e parcerias, e aos amigos que fiz lá, em especial Andrea Del Cortona, pela amizade e apoio imensuráveis.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco pelas coletas realizadas, pelo apoio e amizade durante esses anos.

Aos colegas do Laboratório B.E.T.A. (Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas) pelo excelente convívio durante esse tempo e pela amizade, em especial a Nádia Lemes, que além do apoio e ajuda nesse trabalho, se tornou uma grande amiga.

À minha mãe e ao meu irmão, pelo alicerce, incentivo, paciência, carinho, e, principalmente, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Preciso homenagear, ainda, os amigos queridos que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. Agradeço aos meus amigos Lívia, Ludmila, Maria Fernanda, Nádia, Otávio, Rodrigo, Thaysa e Veronica pelo carinho e compreensão, e por todos os momentos que fizeram parte de nossas vidas, ora alegres, ora não muito, mas o importante é que neles estivemos sempre juntos.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

RESUMO

A filogeografia de sete espécies de Batrachospermales (*Batrachospermum viride-brasiliense*, *Kumanoa ambigua*, *Setacea puiggariana*, *Sirodotia delicatula* e *Sirodotia* spp.) foi investigada em populações brasileiras com base em dois marcadores mitocondriais: a região espaçadora *cox2-3* e a região de “barcode” *cox1*. As espécies apresentaram níveis de divergência genética semelhantes para ambos os marcadores utilizados. *B. viride-brasiliense* apresentou dez haplótipos de *cox2-3* e nove haplótipos, de *cox1*, com variação entre os haplótipos de 0,3 - 2,4% e 0,6 - 1,8%, respectivamente. *K. ambigua* apresentou três haplótipos para cada um dos marcadores analisados, com variação de 0,6 - 2,4% para *cox2-3* e 1,3 - 2,0% para *cox1*. *S. puiggariana* apresentou seis haplótipos de *cox2-3* e oito haplótipos de *cox1*, com variação entre os haplótipos de 0,3 - 2,4% e 0,2 - 2,4%, respectivamente. *Sirodotia* apresentou uma alta variação entre os haplótipos para ambos marcadores, mostrando uma espécie (*S. delicatula*), com baixa variação para *cox2-3* e *cox1* (0,3 - 2,2% e 0,2 - 0,4%; respectivamente) e um complexo (*Sirodotia* spp. formado por três espécies crípticas), com divergência de 0,3 - 7,0% para *cox2-3* e 0,2 - 6,2% para *cox1*. Para a região espaçadora *cox2-3*, as sequências de *K. ambigua* apresentaram 335 pb, enquanto para as outras espécies, todas as sequências tiveram comprimento de 376 pb. Os haplótipos de *cox2-3* diferiram em 13 posições para *B. viride-brasiliense*, nove para *K. ambigua*, 12 para *S. puiggariana* e oito para *S. delicatula* e 33 posições para *Sirodotia* spp. Para a região de “barcode” *cox1*, todas as espécies apresentaram sequências de 664 pb de comprimento, com um número mais elevado de posições variáveis para os haplótipos: 28 para *B. viride-brasiliense*, 16 para *K. ambigua*, 25 para *S. puiggariana*, apenas quatro para *S. delicatula* e 48 para *Sirodotia* spp.. Os resultados obtidos, a partir das análises dos dois marcadores utilizados e da distribuição geográfica das populações no Brasil, mostrou que cada uma das espécies tem características filogeográficas distintas, padrão que parece ser característico de espécies de Batrachospermales em âmbito mundial. Para todas as espécies a variação intra-populacional foi baixa, com cada localidade apresentando de um a dois haplótipos, para ambos os marcadores. No entanto, no conjunto de populações de cada espécie o número de haplótipos foi mais elevado, geralmente mais de cinco haplótipos para cada marcador, com exceção de *K. ambigua*, que apresentou

apenas três haplótipos. Para *B. viride-brasiliense*, a divergência genética foi mais elevada quanto maior a distância geográfica entre os haplótipos de *cox2-3* e *cox1*, e o mesmo caso pode ser observado para os haplótipos de *cox1* para *K. ambigua*. No entanto, o restante das espécies não apresentou correlação entre distância genética e geográfica, com o mesmo haplótipo sendo encontrado em localidades distantes e vice-versa. A distribuição de *K. ambigua* teve amostragem restrita a áreas de Floresta Ombrófila Densa, enquanto as demais espécies foram encontradas em áreas de Cerrado, Floresta Ombrófila Densa (Atlântica e Amazônica) e Floresta Ombrófila Mista, embora não tenha sido observada variação genética correspondente aos diferentes domínios morfoclimáticos. O estudo é o primeiro a caracterizar espécies de Batrachospermales no Brasil com este enfoque.

Palavras-chave: *Batrachospermum viride-brasiliense*. *cox1*. *cox2-3*. Distribuição geográfica. Espécies crípticas. *Kumanoa ambigua*. *Setacea puiggariana*. *Sirodotia delicatula*. Variação intraespecífica.

ABSTRACT

The phylogeography of seven species of Batrachospermales (Batrachospermum viride-brasiliense, Kumanoa ambigua, Setacea puiggariana, Sirodotia delicatula e Sirodotia spp.) was investigated in Brazilian populations based on two mitochondrial markers: the spacer region cox2-3 and the cox1 barcode region. The species showed similar levels of genetic divergence for both markers used. B. viride-brasiliense had ten haplotypes of cox2-3 and nine haplotypes of cox1, with haplotypes ranging from 0.3 to 2.4% and 0.6 to 1.8%, respectively. Three haplotypes for each marker were observed for K. ambigua, ranging from 0.6 to 2.4% and 1.3 to 2.0% for cox2-3 and cox1, respectively. Setacea puiggariana had six haplotypes for cox2-3 and eight haplotypes for cox1, with haplotypes ranging from 0.3 to 2.4% for cox2-3 and 0.2 to 2.4, respectively. A high variation between haplotypes of Sirodotia were found for both markers, showing one group (S. delicatula), with low variation for cox2-3 and cox1 (from 0.3 to 2.2 and 0.2 to 0.4%, respectively), and Sirodotia spp, species complex with divergence from 0.2 to 7.0% for cox2-3 and 0.2 to 6.2 % for cox1, including three cryptic species. For the cox2-3 spacer region, K. ambigua sequences showed 335 bp, whereas for other species, all sequences have of 376 bp in length. The cox2-3 haplotypes differed in 13 positions for B. viride-brasiliense, nine for K. ambigua, 12 for S. puiggariana, eight for S. delicatula and 33 positions for Sirodotia spp. Sequences of the cox1 barcode region, for all species were 664 bp in length, with a higher number of variable positions among the haplotypes: 28 for B. viride-brasiliense, 16 for K. ambigua, 25 for S. puiggariana, only four for S. delicatula, and 48 for Sirodotia spp.. Analyses of the two markers used and the geographical distribution of populations showed that each species had different phylogeographic patterns, a fact that seems to be characteristic of the Batrachospermalean species. For all species, intra-population variation was low, with each location having one to two haplotypes for both markers. However, the number of haplotypes was higher considering all populations for each species, generally more than five haplotypes by species for each marker, except for K. ambigua, that presented only three haplotypes. Genetic divergence was higher with increased

geographic distance for B. viride-brasiliense, haplotypes of cox2-3 and cox1, and the same pattern was observed for cox1 haplotypes of K. ambigua. However, the remaining species showed no correlation between genetic divergence and geographic distance, with the same haplotype being found in distinct locations and vice-versa. Distribution of K. ambigua was restricted to areas of Atlantic rainforest, while the other species were found in areas of cerrado (Brazilian savannah), tropical rainforest (Atlantic and Amazonian) and sub-tropical rain forest, although no evident pattern was observed in terms of genetic variation in different morpho-climatic domains. This is the first study to characterize species of Batrachospermales in Brazil with this approach.

Keywords: *Batrachospermum viride-brasiliense. cox1. cox2-3. Cryptic species. Geographic distribution. Intra-specific variation. Kumanoa ambigua. Setacea puiggariana. Sirodotia delicatula.*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
Hipóteses e objetivos gerais do estudo.....	20
Referências Bibliográficas	21
CAPÍTULO 1: Phylogeography of the freshwater red alga <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i> (Rhodophyta, Batrachospermales)	27
Summary	28
Introduction	30
Material and Methods	31
Results	33
Discussion	35
References	38
Supporting Information	42
CAPÍTULO 2: Filogeografia da rodófito continental <i>kumanoa ambigua</i> (Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil.....	58
Resumo.....	58
Introdução	60
Material e Métodos	61
Resultados	64
Discussão.....	65
Referências Bibliográficas	68
Tabelas e Figuras.....	73
CAPÍTULO 3: Phylogeography of the freshwater red alga <i>Setacea puiggariana</i> (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil	87
Abstract	88
Introduction	90
Material and Methods	92
Results.....	94

Discussion	95
References	98
Supporting Information	102
CAPÍTULO 4: Filogeografia do gênero <i>Sirodotia</i> (Rhodophyta, Batrachospermales) no Brasil	120
Resumo.....	120
Introdução	122
Material e Métodos	124
Resultados	126
Discussão.....	130
Referências Bibliográficas	132
Tabelas e Figuras.....	137
CONCLUSÕES GERAIS	158

INTRODUÇÃO GERAL

O FILO RHODOPHYTA

O filo Rhodophyta é um grupo antigo e diversificado de organismos autotróficos, e são encontrados na maior parte do globo. É considerado um grupo irmão das Chlorophyta (algas verdes) e também das plantas terrestres (LOPEZ-BAUTISTA, 2010). A maioria das rodófitas habita ambientes marinhos (98%), mas muitos táxons bem conhecidos são de habitats de água doce e nascentes de água quente e ácida. Também foram relatadas em florestas tropicais como membros de comunidades subaéreas (Figura 1) (GURGEL & LOPEZ-BAUTISTA, 2007).



FIGURA 1. EXEMPLARES MARINHOS (GELIDIUM E PORPHYRA) E CONTINENTAIS (BATRACHOSPERMUM E SIRODOTIA). FOTOS: ALGAEBASE.

Segundo Graham & Wilcox (2009), são estimados de 500 a 600 gêneros e pouco mais de 6000 espécies de algas vermelhas e acredita-se que o número de espécies possa chegar a 20.000, devido às recentes descobertas de espécies crípticas. Até o fim da década de noventa, o filo Rhodophyta era dividido em duas classes ou subclasses: Florideophycidae e Bangiophycidae (GARBARY & GABRIELSON, 1990).

Atualmente, a classificação do grupo passou por algumas revisões. Saunders & Hommersand (2004) propuseram o subreino Rhodoplantae, com dois filios: Cyanidiophyta, apresentando apenas a classe Cyanidiophyceae; e Rhodophyta, com três subfilios – Rhodellophytina (classe Rhodellophyceae), Metarhodophytina (classe Compsopogonophyceae) e Eurhodophytina (classes Bangiophyceae e Florideophyceae). Yoon *et al.* (2006) propuseram, com base na análise conjunta de dados de nove marcadores moleculares, a existência de dois novos subfilios: Cyanidiophytina (com uma única classe, Cyanidiophyceae) e Rhodophytina, com seis classes, Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae (Figura 2).

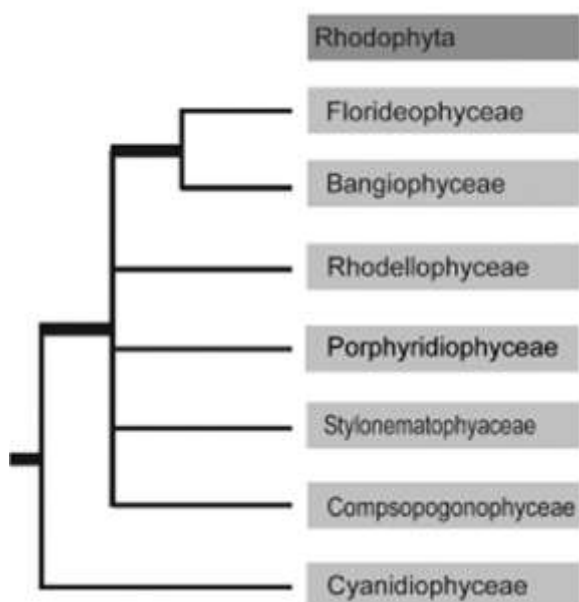


FIGURA 2. CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO YOON *ET AL.* 2006.

Bangiophyceae e Florideophyceae formam um grupo monofilético (YOON *et al.*, 2006) e Florideophyceae contem cerca de 99% das espécies conhecidas (aproximadamente 6786 espécies) (GRAHAM & WILCOX, 2009; GUIRY, M.D &

GUIRY, 2016). World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 26 Setembro, 2016.). Le Gall & Saunders (2007), baseados em dados de três marcadores moleculares, dividiram Florideophyceae em cinco subclasses: Hildebrandiophycidae, Ahnfeltiophycidae, Rhodimeniophycidae, Nemaliophycidae e Corallinophycidae; o número de ordens varia de 16 (YOON *et al.*, 2006) a 23 (LE GALL & SAUNDERS, 2007).

A classe Florideophyceae apresenta organismos que crescem por meio de células apicais e consistem de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas através de “pit-connections” (conexões estruturais entre células adjacentes) (FRESHWATER *et al.*, 1994; GRAHAM & WILCOX, 2009), e foi tradicionalmente dividida em ordens e famílias baseada no ciclo de vida e modo de reprodução sexuada.

A ORDEM BATRACHOSPERMALES

Dentro da classe Florideophyceae e da subclasse Nemaliophycidae, encontram-se as rodófitas da ordem Batrachospermales, que são distribuídas em águas continentais por todo o mundo (ENTWISLE *et al.*, 2009). A ordem Batrachospermales foi foco de recente revisão feita por Entwisle *et al.* (2009), baseada em dados moleculares, e que resultou em algumas novidades importantes no gênero *Batrachospermum*: reconhecimento provisório do gênero, visto que tem sido demonstrado como parafilético em todas análises filogenéticas moleculares; elevação das seções *Contorta* e *Hybrida* ao nível genérico, como novo gênero *Kumanoa* Entwisle, M. L. Vis, W. B. Chiasson, Necchi & A. R. Sherwood e reconhecimento de oito seções no gênero *Batrachospermum*– *Acarposporophytum* (rebaixado do nível gênero para seção),

Aristata, *Batrachospermum*, *Macrospora* (separada de *Aristata*), *Setacea*, *Turfosa* e *Virescentia*. Para a maioria das seções há grande carência de análises mais representativas incluindo maior número de espécies e de populações de cada espécie. A seção *Helminthoidea* foi recentemente elevada para gênero, *Sheathia* Salomaki et M.L. Vis gen. nov., baseado em caracteres morfológicos e com suporte de três marcadores moleculares (SALOMAKI *et al.*, 2014). Rossignolo e Necchi (2016) também elevaram a seção *Setacea* para gênero, com base em dados morfológicos e moleculares.

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, o gênero *Batrachospermum* é o mais especioso, com aproximadamente 97 espécies reconhecidas mundialmente (GUIRY & GUIRY, 2016). O gênero representa 67% das rodófitas dulcícolas (SALOMAKI, 2012), e se apresenta bastante diverso morfológicamente (ENTWISLE *et al.*, 2009). Do ponto de vista sistemático, tem sido demonstrado como parafilético em todos os estudos filogenéticos moleculares já realizados (VIS *et al.*, 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS *et al.*, 2005; ENTWISLE *et al.*, 2009; SALOMAKI *et al.*, 2014; ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016).

ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS

A Filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens intra-específicas ou de espécies próximas, baseada na distribuição espacial de genealogias gênicas (AVISE, 2000). A variação genética intraespecífica permite abordagens filogeográficas interessantes, mas tem sido relativamente pouco investigada dentre as Batrachospermales. A análise e interpretação da distribuição de linhagens, usualmente, requerem informações da

genética molecular, genética de populações, filogenia, demografia e geografia histórica, sendo a filogeografia uma disciplina integrativa (AVISE, 1998). Estudos filogeográficos têm sido utilizados para investigar os efeitos de mudanças climáticas do passado na estrutura genética de espécies animais e vegetais. Esses estudos permitem inferir padrões sobre a evolução de espécies dentro de biomas, o que pode ser utilizado como subsídio para estratégias de conservação de espécies (BERMINGHAM & MORITZ, 1998; RAMOS *et al.*, 2007).

Os primeiros estudos usaram principalmente os espaçadores ITS1-5.8S-ITS2 (espaçador transcrito interno) do DNA nuclear, o gene *rbcL* (que codifica a subunidade grande da enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxidase) e o espaçador entre os genes *rbcL* e *rbcS*, provenientes do DNA plastidial, com ênfase nas relações com implicações sistemáticas (acima do nível específico). Vis & Sheath (1997) utilizaram sequências da região ITS combinadas com dados morfológicos para analisar se as populações de *B. gelatinosum* (L.) De-Candolle da América do Norte representavam uma única entidade taxonômica. A biogeografia e a variação genética de populações de *B. helminthosum* Bory da América do Norte foram analisadas por Hall & Vis (2002), com base em sequências do *rbcL* e da região ITS em várias populações (VIS *et al.* 2001) ou do marcador molecular ISSR (“inter-simple sequence repeat”) dentro de uma única população (HALL & VIS, 2002). Estes estudos demonstraram que a distância genética não reflete a distância geográfica, com indivíduos geneticamente semelhantes de localidades distantes e vice-versa, tanto dentro como entre as populações. No entanto, observou-se que estas regiões do DNA não têm fornecido resolução suficiente para elucidar relações biogeográficas.

Alguns estudos filogeográficos para espécies de Batrachospermales realizados posteriormente foram baseados principalmente nos marcadores mitocondriais *cox2-3* (região espaçadora entre os genes que codificam as subunidades 2 e 3 da enzima citocromo *c* oxidase) e região de “barcode” do gene *cox1* (que codifica a subunidade 1 da enzima citocromo *c* oxidase), abrangendo grandes áreas geográficas. *Batrachospermum helminthosum* apresentou variação de até 6,5% para o espaçador *cox2-3*, em 13 localidades amostradas na América do Norte (CHIASSON et al., 2003). Para outra espécie (*B. macrosporum* Montagne) a divergência do espaçador *cox2-3* foi de até 11,9% para 11 populações amostradas, incluindo localidades das Américas do Norte e do Sul (VIS et al., 2008). Em estudo realizado para *Sirodotia delicatula* Skuja no Brasil, foi encontrada uma alta variação (4,9 – 9,3% para *cox2-3*, 6,2 – 8,4% para *cox1*) para ambos marcadores em três das 14 populações analisadas, sugerindo a existência de duas espécies crípticas (PAIANO e NECCHI, 2013). Em contrapartida, outras espécies de *Sirodotia* apresentaram uma variação menos elevada, como *S. suecica*, que teve variação de até 4,8%, em localidades da Austrália, Finlândia, Nova Zelândia, África do Sul e E.U.A. (LAM et al., 2012).

Estudos envolvendo “DNA barcoding” têm sido demonstrados de grande potencial para sistemática em níveis específicos de algas vermelhas (SAUNDERS, 2005; ROBBA et al., 2006) e têm recebido grande atenção recentemente. Sequências da região de barcode *cox 1* estão sendo aplicadas como marcador clássico para estudos desse tipo com utilização de “primers” e termociclos específicos (SAUNDERS, 2005). Este marcador demonstrou nível de variação suficiente e geralmente apropriado para avaliação de variabilidade genética específica em representantes de Batrachospermales

(SHERWOOD *et al.*, 2008). House *et al.* (2008) analisaram *B. helminthosum* em 15 localidades dos E.U.A. e encontraram uma variação de até 6,6% entre sequências de *cox1*. Para outra espécie (*B. gelatinosum*) a variação foi de apenas 0,6% para 16 localidades nos E.U.A. e Canadá (HOUSE *et al.*, 2010) e de até 1,2% para amostragem abrangendo Bélgica, Estônia, Finlândia, França, Grã-Bretanha, Itália, Letônia, Lituânia, Polônia, Espanha (KEIL *et al.*, 2015).

A ordem Batrachospermales possui representantes amplamente distribuídos no Brasil (NECCHI 1990a, 1991) que permitiu, portanto, a realização de estudo filogeográfico para quatro espécies selecionadas: *Batrachospermum viride-brasiliense* Necchi e Agostinho, *Kumanoa ambigua* (Montagne) Entwisle, M. L. Vis, W. B. Chiasson, Necchi & A. R. Sherwood, *Setacea puiggariana* (Grunow) Necchi e Rossignolo e *Sirodotia delicatula* Skuja.

HIPÓTESES E OBJETIVOS GERAIS DO ESTUDO

Este trabalho teve como objetivo geral a realização da análise filogeográfica de cada uma das quatro espécies da ordem Batrachospermales no Brasil: *B. viride-brasiliense*, *K. ambigua*, *S. puiggariana* e complexo *S. delicatula*. Com base nos dados moleculares obtidos, as seguintes hipóteses foram testadas: 1) a estrutura filogeográfica deverá revelar padrão distinto entre as espécies, a qual está relacionada às conexões históricas de cada espécie; 2) o número de haplótipos dentro de uma única população será pequeno (tipicamente 1 a 2), em contrapartida a um número bem mais elevado de haplótipos no conjunto das populações de cada espécie; 3) a divergência genética entre as populações será progressivamente maior quanto mais distantes entre si, com maior

divergência genética inter do que intra-populacional para todos os marcadores utilizados; 4) as tendências de divergência genética para cada um dos marcadores testados serão congruentes entre si, independentes da espécie analisada. Para testar as hipóteses, os seguintes objetivos foram definidos:

Objetivos específicos: 1) avaliar os padrões de variabilidade genética de populações de quatro espécies da ordem Batrachospermales (Rhodophyta) por meio da análise de marcadores moleculares mitocondriais ao longo da distribuição no Brasil; 2) determinar os níveis de divergência genética dentro e entre as populações amostradas, de sequências de *cox2-3* e da região de “barcode” do gene *cox1*.

REFERÊNCIAS

- AVISE, J. C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol* 7: 371-379, 1998.
- AVISE, J. C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol* 7: 367-369, 1998.
- CHIASSEON, W.B.; MACHESKY, N.J.; VIS, M. L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta) in North America. *Phycologia* 42: 654-660, 2003.
- ENTWISLE, T.J.; VIS, M.L.; CHIASSEON, W.B.; NECCHI, O. JR.; SHERWOOD, A.R. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. *J. Phycol.* 45: 704-715, 2009.

FRESHWATER, D. W., FREDERICQ, S., BUTLER, B. S., HOMMERSAND, M. H., CHASE, M. W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid rbcL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 7281–7285, 1994.

GARBARY, D. J. GABRIELSON, P. W. Taxonomy and Evolution. In K. M. Cole and R. G. Sheath (eds.), *Biology of the red algae*; 477-498. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1990.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. *Algae*. Prentice-Hall, New Jersey. 640pg, 2009.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 26 Setembro, 2016.

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

HALL, M. M.; VIS, M. L. Genetic variation in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) among and within streams reaches using inter simple sequence repeat molecular markers. *Phycolog. Res.* 50: 155-162, 2002.

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.* 56: 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* 49: 501-507, 2010.

- KEIL, E.J.; MACY, T.T.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; TOMA'S, P.; ABOAL, M.; VIS, M.L. Phylogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) shows postglacial expansion in Europe. *Phycologia* 54: 176–182, 2015.
- KUMANO, S. Freshwater Red Algae of the World. Biopress Limited, Bristol, 375, 2002.
- LAM, D.; ENTWISLE, T.J.; ELORANTA, P.; KWANDRAS, J.; VIS, M.L. Circumscription of species in the genus *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *Eur. J. Phycol.* 47: 42-50, 2012.
- LE GALL, L., SAUNDERS, G. W. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43: 1118-1130, 2007.
- LOPEZ-BAUTISTA, J. M. Red Algal Genomics: A Synopsis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 13: 227–240, 2010.
- NECCHI, O. JR. Revision of the genus *Batrachospermum* Roth (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil. *Bibliotheca Phycologica*, 84. Berlim, J. Cramer, pp. 201, 1990.
- NECCHI, O. JR. The Section *Sirodotia* of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermaceae) in Brazil. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 62: 17–30, 1991.
- PAIANO, M. O.; NECCHI, O. JR. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycol. Res.* 61: 248-255.2013.
- RAMOS, A. C. S., LEMOS-FILHO, J. P., RIBEIRO, R. A., SANTOS, F.R., LOVATO, M. B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae:

Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Ann Bot* 100: 1219-1228, 2007.

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

ROSSIGNOLO, N.L.; NECCHI, O. JR. Revision of section *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) with emphasis on specimens from Brazil. *Phycologia* 55: 337-346, 2016.

SALOMAKI, E. A sistematic investigation of *Batrachospermum* section *Helminthoidea* (Batrachospermales, Rhodophyta) using molecular and morphological analyses. 85 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Ohio University, 2012.

SALOMAKI, E., KWANDRANS, J., ELORANTA, P., VIS, M. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. *Journal of Phycology* 50 (3): 526-542, 2014.

SAUNDERS, G. W.; HOMMERSAND, M. H. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany* 91: 1494-1507, 2004.

SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Phil. Trans. Roy. Soc. B360*: 1879–1888, 2005.

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.* 56: 269-279, 2008.

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

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

VIS, M. L., ENTWISLE, T. J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. *J. Phycol.* 36: 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* 40: 2-9, 2001.

VIS M.L.; CHIASSON, W.B.; SHEATH, R.G. Phylogenetic relationship of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. *Phycologia* 44: 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.* 44: 882-888, 2008.

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

CAPÍTULO 1

Phylogeography of the freshwater red alga *Batrachospermum* *viride-brasiliense* (Rhodophyta, Batrachospermales)

Monica O. Paiano and Orlando Necchi Jr.*

¹ Zoology and Botany Department, São Paulo State University, Rua Cristóvão

Colombo, 2265 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

Running title: Phylogeography of *B. viride-brasiliense*

Phone: 55 (17) 3221-2406; fax 55 (17) 3221-2374

E-mail: orlando@ibilce.unesp.br

* corresponding author

Aceito para publicação em "Phycological Research" em 20/09/2016.

SUMMARY

Phylogeography of *Batrachospermum viride-brasiliense* Necchi & Agostinho was investigated using two mitochondrial regions: the *cox2-3* spacer and the barcode region of *cox1* gene. Eighty-seven individuals were analyzed from nine streams segments throughout its distribution in Brazil. Ten *cox2-3* spacer and nine *cox1* haplotypes were observed among the individuals studied (87 versus 43, respectively). Divergences among haplotypes were relatively low ($\leq 2.4\%$ for *cox2-3* and $\leq 1.8\%$ for *cox1*). Most locations have a single haplotype, whereas only two locations had two haplotypes for both markers. The haplotype network for *cox2-3* showed a phylogeographic trend from the south towards the southeast with haplotypes from the southeast more closely related. For *cox1* a trend from the southeast spreading towards the south and north was revealed, with the southern haplotypes more closely associated. Results clearly indicated that *B. viride-brasiliense* represents a single species and the phylogeographic pattern consisted of a closely connected group of haplotypes from southern and southeastern Brazil. Levels of intra and inter-population variation were similar for the two markers with slightly higher values for *cox2-3*. The trend observed in this study is similar to that in other members of Batrachospermales with little variation within a stream segment (one or two haplotypes) and more distant haplotypes showing higher divergences. This pattern could be attributed to the fact that colonization of a site might be rare by a single event with subsequent proliferation of the population. The geographic distribution of *B. viride-brasiliense* was interpreted according to the biogeographic models proposed for South America being limited to three morpho-climatic domains or biogeographic provinces: tropical Atlantic rainforest, sub-tropical rainforest and cerrado (Brazilian savannah).

Key words: *Batrachospermum*, *cox1*, *cox2-3* spacer, genetic diversity, geographic distribution, intra-specific variation

INTRODUCTION

The red algal genus *Batrachospermum* has been shown to be paraphyletic in molecular phylogenetic studies and was recently treated as containing eight sections (Entwistle *et al.* 2009). To resolve the paraphyly of the genus, some previously recognized sections have been raised to the generic level: *Sheathia* (Salomaki *et al.* 2014) and *Setacea* (Rossignolo & Necchi 2016). Alternatively, some authors lumped separate species and small sections in a wider genus, e.g. *Nothocladus* sensu lato including *Setacea* and several Australasian taxa (Entwistle *et al.* 2016). Presently, the following sections are still included within the genus *Batrachospermum*:

Acarposporophytum, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Gonimopropagulum*, *Macrospora*, *Turfosa* and *Virescentia*. Section *Virescentia* is similar in gross morphology to the other sections but is distinguished by having symmetrical carpogonia with elongate and cylindrical or club-shaped and stalked trichogynes developed on short and straight carpogonial branches, and axial and large carposporophytes with determinate gonimoblast filaments (Sheath *et al.* 1994; Kumano 2002; Agostinho & Necchi 2014). Kumano (2002) in his review of the freshwater red algae of the world recognized eleven species, seven of which were known only from the type locality or few other locations in restricted regions.

Previous molecular studies of members of section *Virescentia* indicated its monophyly with high support (Vis *et al.* 1998, 2001; Hanyuda *et al.* 2004; Entwistle *et al.* 2009; Agostinho & Necchi 2014). Phylogenetic relationships among species within this section, as well as intra-specific variation are poorly known due to relatively limited taxon and population sampling.

Phylogeographic studies have been conducted for some members of the section *Virescentia*. Hanyuda *et al.* (2004) analyzed the geographic distribution of *B.*

helminthosum Bory by sequencing 27 individuals from Japan based on sequences of the plastid-encoded RuBisCO large-subunit gene (*rbcL*) and found five haplotypes. House *et al.* (2008) investigated the phylogeographic signal of three molecular markers: universal plastid amplicon (UPA), the cytochrome oxidase subunit I gene marker (*cox1*) and the cytochrome oxidase 2–3 spacer region (*cox2–3*), throughout the geographic range of *B. helminthosum* in North America. They found that *cox1* sequences were comparable to the *cox2–3* spacer for phylogeographic studies as the haplotype networks were similar and showed the same geographic patterns, whereas UPA was shown to be more appropriate for interspecific studies.

Batrachospermum viride-brasiliense Necchi & Agostinho, section Virescentia, is only known from Brazil, where it is relatively widespread (Necchi 1990; Agostinho & Necchi 2014), occurring in tropical Atlantic rainforest, sub-tropical rainforest and cerrado (Brazilian savannah) (Cabrera & Willink 1973; Ab'Saber 1977) from the south to the southeast regions (19°10'–30°45'S). Considering its relatively broad geographic distribution and possibility of sampling several populations, it is a suitable species for a phylogeographic study. Despite the wide distribution, no investigation of the intra-specific genetic variation throughout its geographic distribution has been conducted. Thus, this study was undertaken to elucidate intra and inter-population genetic patterns of *B. viride-brasiliense* across its known range.

MATERIAL AND METHODS

Individuals identified as *B. viride-brasiliense* were obtained from nine streams segments (streams lengths of 6–15 m) across the main part of its known distribution (Supporting Information Table S1, Fig. 1). Some of these locations were the same as described by Agostinho & Necchi (2014). Fifteen individuals were collected from each

site, except site E, where only three individuals were found. Morphological examination and taxonomic identification were made for specimens just after collection, using current diagnostic criteria (Agostinho & Necchi 2014). Voucher specimens were lodged at the local institutional herbarium (Table S1).

For molecular analyses, specimens were dried in silica desiccant and ground in liquid nitrogen or in a Precellys 24 tissue homogeneizer (Bertin Technologies, Montigny-Le Bretonneux, France). For each site, 10 individuals were randomly chosen; when the extractions did not yield PCR product or high genetic variation was found (more than one haplotype was found), some of the remaining 5 individuals were also used. The ten individuals were initially sequenced for *cox2-3* spacer and later three to five individuals of each haplotype were sequenced for *cox1* barcoding region.

Extractions of DNA were performed using either the DNeasyPlant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) or the NucleoSpinplant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Polymerase chain reactions (PCR) were conducted with the TopTaq Master Mix (Qiagen) or Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) for a total volume of 25 µL consisting of ca. 50 pmol of genomic DNA and 5 pmol of each primer. For the *cox1* barcoding region, primers GazF1 and GazR1 and protocols from Saunders (2005) were used; likewise, for the *cox2-3* spacer the primer pair *cox2F* and *cox3R* and protocols from Zuccarello *et al.* (1999) were followed. PCR product was purified using the Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up" (Macherey-Nagel) or "GFX™ PCR" (GE Healthcare) according to the manufacturers' protocols. The PCR products were sequenced using the ABI PRISM Big Dye™ v3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and the ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were performed using PCR primers.

Sequence alignments were assembled in Geneious 7 (Kearse *et al.* 2012). Variation among sequences was calculated as uncorrected pairwise differences using Geneious. Relationships of *cox1* and *cox2-3* haplotypes were further investigated by a statistical parsimony network using TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) with a 95% connection limit. Trees were constructed for *cox1* and *cox2-3* data using the Geneious plugin. Analyses were performed with a GTR+I+G as the best-fit model of sequence evolution determined by the Akaike Information Criterion using jModelTest 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012). Maximum-likelihood (ML) topologies and bootstrap values from 10,000 replicates were inferred using RAXMLGUI (Silvestro & Michalak 2011). Bayesian analysis (BA) was performed in MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) with three runs of five chains of Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo for 10×10^6 generations. Association of *cox1* and *cox2-3* haplotypes and geographic distances was tested by the Mantel test (Sokal 1979; Diniz-Filho *et al.* 2013) based on two matrices of raw data (genetic differences as base pair and geographic distance in km). Tests were performed using the Isolation by Distance Web Service (IBDWS) (Jensen *et al.* 2005).

RESULTS

***cox2-3* variation**

A total of ten *cox2-3* spacer haplotypes were observed among the 87 individuals sequenced (aligned length of 376 bp) (Table 1, Figs 1-2). Divergences among haplotypes were low ($\leq 2.4\%$). Three locations had two haplotypes each: A (Bv1 and Bv3), G (Bv6 and Bv 7) and H (Bv8 and Bv9); all other locations had one haplotype only (Table 1, Fig. 1). Haplotypes Bv2 and Bv10 occurred in two locations, B-C and D-

E, with 24 and 13 individuals, respectively) and were the most abundant. The ten haplotypes differed by 13 variable positions (Table S2).

The haplotype network (Fig. 2) showed a phylogeographic trend from the south, with ancestral haplotype Bv1, as determined by TCS (location A, same location for Bv3) and closely related haplotypes (locations B-C, haplotypes Bv2), towards the southeast with more distant haplotypes (locations G-I) (Fig. 1). Haplotypes Bv6 and Bv7 (location G) and Bv8 and Bv9 (location H) were more closely related, all occurring in southeastern Brazil (Figs 2 and S1). The remaining haplotypes were more distantly associated geographically. Genetic differences of *cox2-3* spacer haplotypes were positively correlated with geographic distances: Mantel correlation $r=0.488$, $p=0.023$.

cox1 variation

A total of nine *cox1* haplotypes were observed among the 43 individuals sequenced (aligned length of 664 bp) (Table 2, Figs 1, 3). Haplotypes had a relatively low divergence ($\leq 1.8\%$). Only two locations had more than one haplotype: B (haplotypes Bv5 and Bv6) and G (haplotypes Bv1 and Bv2) (Table 2, Fig. 1). Haplotype Bv5 was the only one found in two locations (A and B) and was the most abundant (eight individuals). The nine haplotypes differed by 28 variable positions (Table S3, differing in one amino acid).

The haplotype network (Fig. 3) showed a phylogeographic trend from the southeast, with ancestral haplotype Bv1 (location G) and closely related haplotypes (locations D-F), spreading towards the south, with more distant haplotypes (locations A-C), and north (location I) (Fig 1). Haplotype Bv7 (location H) was an exception, since it was distant from the others in close proximity in the southeast. Haplotypes Bv1 and

Bv2 (location G) were closely related to each other, whereas haplotypes Bv5 and Bv6 (locations A-B) were more distantly related geographically from the remaining ones (Figs 3 and S2). Genetic differences of *cox1* haplotypes were positively correlated with geographic distances: Mantel correlation $r=0.464$, $p=0.015$).

DISCUSSION

The present data clearly indicate that *B. viride-brasiliense* represents a single species, since divergence levels were relatively low and gradually differing throughout the geographic distribution, corroborating the findings by Agostinho & Necchi (2014). The probable phylogeographic pattern for *B. viride-brasiliense*, as evidenced by the haplotype networks for both *cox2-3* and *cox1*, consisted of a closely connected group of nine to ten haplotypes from southern and southeastern Brazil. The dispersal trend was from the south towards the southeast based on *cox2-3* data, whereas *cox1* suggested that it was from southeast spreading towards the south and north. The phylogeographic study of *Sirodotia* (Paiano & Necchi 2013) in Brazil revealed a closely related group of five haplotypes of *cox2-3* and *cox1* from southeastern Brazil, all corresponding to a single species (*S. delicatula* Skuja). This pattern is similar to that found for *cox1* data in this study. On the other hand, other two (cryptic) species of *Sirodotia* were found in the mid-west region with a substantial genetic variation, which were only comparable to few other species in the Batrachospermales in South America, such as *B. macrosporum* Montagne (Vis *et al.* 2008).

The two markers analyzed in this study revealed relatively similar levels of intra and inter-population variation with slightly higher values for *cox2-3* (Table S4). However, in terms of variable positions, haplotypes of *cox1* had slightly higher

differences. The divergence among the ten Brazilian haplotypes for the *cox2-3* spacer region was not high considering the geographic range sampled (maximum distance ~ 1,700 km) as compared to previous studies at broader geographic scales (> 2,500 km) (Table S5): up to 6.5% for *B. helminthosum* in North America (Chiasson *et al.* 2003), up to 13.1% for *B. macrosporum* in South America (Vis *et al.* 2008), up to 6.2% for *B. arcuatum* in North America and 14.8% in European (Bulgarian) locations (Vis *et al.* 2010). The variation found among the nine Brazilian haplotypes for *cox1* is not high either considering similar or larger geographic ranges in previous studies (Table S5).

Based on the studies of batrachospermalean species to date, there is considerable intraspecific genetic differentiation both in the *cox2-3* spacer and the *cox1* barcode regions among individuals of distinct locations, where several haplotypes (5-15) are typically found (Vis *et al.* 2008, Keil *et al.* 2015). However, little variation is usually observed within a location (typically one, rarely two or more haplotypes per stream segments), as has been previously demonstrated for the species studied so far (Table S5). The present data for *B. viride-brasiliense* fit perfectly within this pattern, with most populations having only one haplotype. In addition, more geographically distant haplotypes have, as a rule, higher divergences, as revealed by the Mantel test. This general trend for members of the Batrachospermales could be attributed to the fact that colonization of a site might be rare, with a single event, and subsequent proliferation playing a major role in the presence of a *Batrachospermum* population in a stream segment (Vis *et al.* 2008). Information on dispersal in river macroalgae has received little attention. These algae, like other freshwater organisms, have four potential modes of dispersal: water, air, other motile organisms and humans (Kristiansen 1996). Numerous aquatic organisms may aid in the dispersal of freshwater macroalgae both short and long distances (Vis 2016). The animal dispersal vectors that

have received the most attention are birds, especially wading waterfowl, which have the potential to transport algae and their propagules for long distances (Kristiansen 1996). But these approaches lack experimental studies, which greatly constrain the interpretations of the phylogeographic data available to date.

The geographic distribution of *B. viride-brasiliense* mostly fits within the biogeographic models proposed for animal and plant distribution in South America. The species distribution is limited to three morpho-climatic domains (Ab'Saber 1977) or biogeographic provinces (Cabrera & Willink 1973) from South America: tropical Atlantic rainforest, sub-tropical rainforest (with *Araucaria*) and cerrado (Brazilian savannah). There were no genetic gaps among these domains or provinces for both genetic markers. These patterns are related to both ancient geological (continental drift and plate tectonics) and more contemporary processes (climatic variations) that determine the geological history of these large regions. However, it is difficult to draw generalizations about phylogeographic patterns of Batrachospermales in South America with only three examples (Vis *et al.* 2008; Paiano & Necchi 2013; this study). Therefore, further research is highly recommended with an emphasis on species varying in geographical distribution and genetic structure to provide a sounder basis to the biogeographical knowledge of batrachospermalean red algae.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by FAPESP (2012/12016-6) and CNPq (306047/2013-6, 487566/2012-2) grants to ONJ and a FAPESP scholarship (2013/06436-5) to MOP.

REFERENCES

- Ab'Saber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia* **53**: 1-23.
- Agostinho, D.C. and Necchi, O. Jr. 2014. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycologia* **53**: 561–70.
- Cabrera A.L. and Willink, A. 1973. *Biogeografía de America Latina*. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, Washington.
- Chiasson, W.B., Machesky, N.J. and Vis, M. L. 2003. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta) in North America. *Phycologia* **42**: 654-60.
- Clement, M., Posada, D. and Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-9.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**: 772.
- Diniz-Filho, J.A.F., Soares, T.N., Lima, J.S. *et al.* 2013. Mantel test in population genetics. *Genet. Mol. Biol.* **36**: 475-85.
- Entwistle, T.J., Vis, M.L., Chiasson, W.B., Necchi, O. Jr. and Sherwood, A.R. 2009. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. *J. Phycol.* **45**: 704-15.
- Entwistle, T. J., Johnston, E. T., Lam, D. L. and Vis, M. 2016. *Nocturama* gen. nov. *Nothocladus* s. lat. and other taxonomic novelties resulting from the further

resolution of paraphyly in Australasian members of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta). *J. Phycol.* **52**: 384- 96.

Hanyuda, T., Suzawa, Y., Suzawa, T., Arai, S., Sato, H., Ueda, K. and Kumano, S. 2004. Biogeography and taxonomy of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Japan inferred from *rbcL* gene -sequences. *J. Phycol.* **40**: 581–8.

House, D. L., Sherwood, A. R. and Vis, M. L. 2008. Comparison of three organelle markers for phylogeographic inference in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North America. *Phycol. Res.* **56**: 69-75.

Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–5.

Jensen, J.L., Bohonak, A.J. and Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* **6**: 6-13.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., *et al.* 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647-9.

Keil, E.J., Macy, T.T., Kwadrans, J., Eloranta, P., Toma's, P., Aboal, M. and Vis, M.L. 2015. Phylogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) shows post glacial expansion in Europe. *Phycologia* **54**: 176–82.

Kristiansen, J. 1996. Dispersal of freshwater algae - a review. *Hydrobiologia* **336**: 151–7.

Kumano, S. 2002. *Freshwater Red Algae of the World*. Biopress Limited, Bristol.

Necchi, O. Jr. 1990. *Revision of the genus Batrachospermum Roth (Rhodophyta,*

- Batrachospermales*) in Brazil. *Bibliotheca Phycologica*, 84. J. Cramer, Berlin.
- Paiano, M. O. and Necchi, O. Jr. 2013. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycol. Res.* **61**: 248-55.
- Rossignolo, N.L. and Necchi, O. Jr. 2016. Revision of section *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) with emphasis on specimens from Brazil. *Phycologia* **55**: 337-46.
- Salomaki, E., Kwandrans, J., Eloranta, P. and Vis, M. 2014. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. *J. Phycol.* **50**: 526-42.
- Saunders, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* **360**: 1879–88.
- Sheath, R. G., Vis, M. L. and Cole, K. M. 1994. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 4. Section *Virescentia*. *J. Phycol.* **30**: 108-17.
- Silvestro, D. and Michalak, I. 2012. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAXML. *Org. Divers. Evol.* **12**: 335-7.
- Sokal, R. R. 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* **28**: 227-32.
- Swofford, D.L. 2003. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)*; Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Vis, M. L. 2016. *Biogeography of River Algae*. In O. Necchi Jr. (Ed.) *River Algae*. Springer International Publishing, Cham, pp. 219-43.

- Vis, M.L., Feng, J., Chiasson, W.B. *et al.* 2010. Investigation of the molecular and morphological variability in *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from geographically distant locations. *Phycologia* **49**: 545-53.
- Vis, M.L., Hodge, J.C. and Necchi, O. Jr. 2008. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. *J. Phycol.* **44**: 882-8.
- Vis, M. L., Miller, E. J. and Hall, M. M. 2001. Biogeographical analyses of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America using molecular and morphological data. *Phycologia* **40**: 2-9.
- Vis, M.L., Saunders, G.W., Sheath, R.G., Dunse, K. and Entwisle, T.J. 1998. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences. *J. Phycol.* **34**: 341-50.
- Vis, M.L. and Sheath, R.G. 1999. A molecular investigation of the systematic relationship of *Sirodotia* species (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. *Phycologia* **38**: 261-6.
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A., and King, R.J. 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Mol. Ecol.* **8**: 1443-7.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Description of collecting sites and GenBank accession numbers for population samples of *Batrachospermum viride-brasiliense* from Brazil analyzed in this study.

Table S2. Haplotypes of *cox2-3* spacer for *B. viride-brasiliense* defined by 13 nucleotide variable positions among 376 bp.

Table S3. Haplotypes of *cox1* barcode region for *B. viride-brasiliense* defined by 28 nucleotide variable positions among 664 bp.

Table S4. Comparison of variation levels within and among populations of *B. viride-brasiliense* for the two markers analyzed.

Table S5. Previous reports of intraspecific sequence variation in batrachospermalean species for the two molecular markers used in this study. All *cox1* sequences are 664 bp in length.

Fig. S1. Tree from maximum likelihood analysis of *cox2-3* spacer sequence data showing the relationship among *B. viride-brasiliense* haplotypes and using *B. helminthosum* as outgroup.

Fig. S2. Tree from maximum likelihood analysis of *cox1* barcode region sequence data showing the relationship among *B. viride-brasiliense* haplotypes and using *B. helminthosum* as outgroup.

Table1. Locality, number of individuals (*n*) and frequency of each haplotype for *cox2-3* spacer region of *Batrachospermum viride-brasiliense*.

Localities	<i>n</i>	Haplotypes									
		Bv1	Bv2	Bv3	Bv4	Bv5	Bv6	Bv7	Bv8	Bv9	Bv10
A	10	07		03							
B	10		10								
C	14		14								
D	10										10
E	03										03
F	10				10						
G	10						04	06			
H	10								05	05	
I	10					10					
Total	87	07	24	03	10	10	04	06	05	05	13

Table 2. Locality, number of individuals (*n*) and frequency of each haplotype for *cox1* barcode region of *B. viride-brasiliense*.

Localities	<i>n</i>	Haplotypes								
		Bv1	Bv2	Bv3	Bv4	Bv5	Bv6	Bv7	Bv8	Bv9
A	05					05				
B	04					03	01			
C	03								03	
D	06									06
E	03									03
F	03			03						
G	11	06	05							
H	05							05		
I	03				03					
Total	43	06	05	03	03	08	01	05	03	09

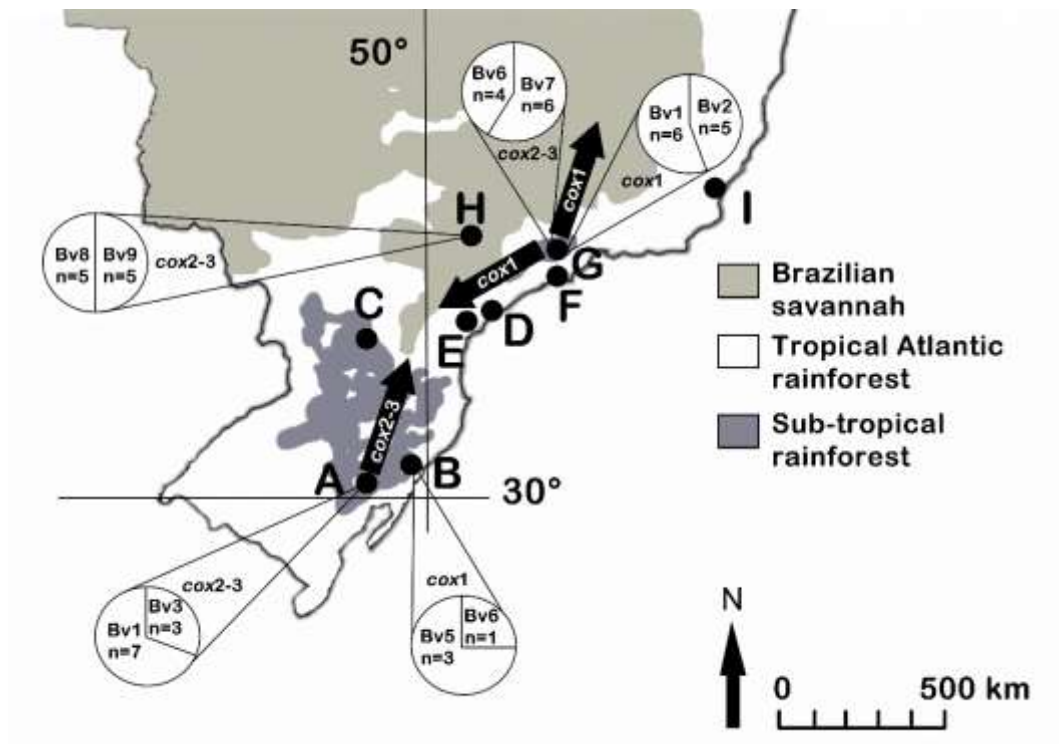


Fig. 1. Map showing sampling locations for *Batrachospermum viride-brasilense* in Brazil. Site descriptions and location codes are shown in Table S1. Locations with more than one haplotype are indicated by pie charts. Black arrows indicate the putative dispersion pathways for each genetic marker. The biogeographic provinces and morpho-climatic domains are defined according to Cabrera & Willink (1973) and Ab' Saber (1977).

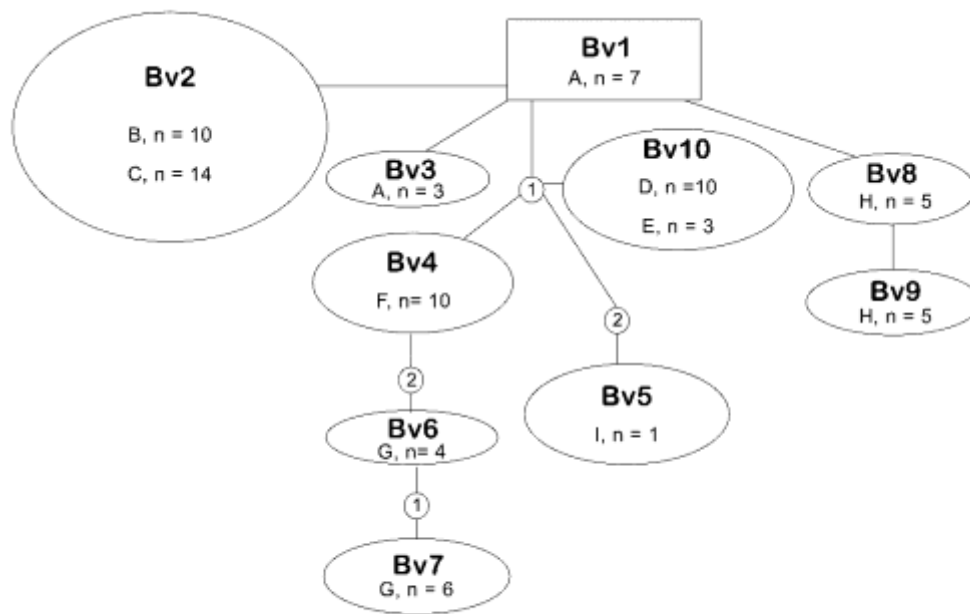


Fig. 2. Haplotype network of *cox2-3* spacer for *B. viride-brasiliense* populations from Brazil. A single line indicates one base pair difference; open circles indicate missing intermediates; numbers within circles indicate number of intermediates; *n* - number of identical individuals; haplotype designations and location codes are shown in Table 1 and Table S1, respectively.

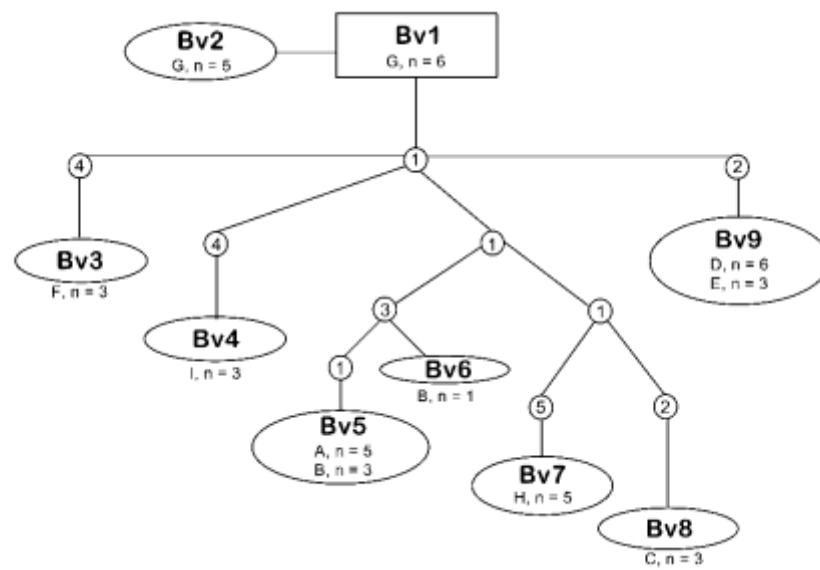


Fig. 3. Haplotype network of *cox1* barcode region for *B. viride-brasiliense* populations from Brazil. Haplotype designations are shown in Table 2. See the caption in Fig. 2 for other information.

Table S1. Description of collecting sites, GenBank accession numbers and voucher specimens for population samples of *B. viride-brasiliense* analyzed in this study.

Code	Locality, collection date, voucher specimens and stream length sampled	Haplotypes cox2-3	Haplotypes cox1
A	Rio Grande do Sul State: Arroio Camisas, Aparados da Serra National Park, 29°10'44"S, 50°08'13"W; 10 June 2009 (SJRP 31506); 11 m	KX452178 KX452180	KX452192
B	Rio Grande do Sul State: Arroio Perdizes, Aparados da Serra National Park, 29°09'29"S, 50°04'09"W; 10 June 2009 (SJRP 31507); 6 m	KX452179	KX452192
C	Paraná State: Guarapuava, River Lageado, Marrecas River, 25°12'57"S, 51°21'18"W; 26 October 2008 (SJRP 31497); 10 m	KX452179	KX452195
D	São Paulo State: Apiaí (Route SP-250), 15 km from the city, 24°27'54"S, 48°44'38"W; 07 July 2015 (SJRP 32134); 10 m	KX452187	KX452196
E ^a	São Paulo State: Guapiara (Route SP-250), 10 km from town, 24°09'06"S, 48°37'10"W; 07 July 2015 (SJRP 32135); 10 m	KX452187	KX452196

Table S1. Continued.

Code	Locality, collection date, stream length sampled and voucher specimens	Haplotypes cox2-3	Haplotypes cox1
F	São Paulo State: Paraibuna, Pousada Alto da Serra, 23°33'48"S, 45°27'31"W; 23 September 2006 (SJRP 31910); 10 m	KX452181	KX452190
G	São Paulo State: Campos do Jordão, "Ducha da Prata", 22°44'17"S, 45°34'10"W; 15 December 2009 (SJRP 31495); 15 m	KX452183	KX452188
		KX452184	KX452189
H	São Paulo State: Brotas, "Parque dos Saltos"; 22°17'30" S, 48°07'51" W; 09.x.2012 (SJRP 31505); 10 m	KX452185	KX452194
		KX452186	
I	Espírito Santo State: Domingos Martins, Pedra Azul, "Rota do Lagarto" Road, 20°24'49"S, 41°02'23"W; 05 July 2009 (SJRP 33153); 6 m	KX452182	KX452191

a. N=3 individuals

[illegible]

Table S3. Haplotypes of *B. viride-brasiliense* defined by 28 variable positions of nucleotides in 664 bp for *cox1* barcode region. Sequence for the haplotype 1 is shown for all variable positions and for the remaining haplotypes just for those which differs from haplotype 1.

Positions	Haplotypes								
	Bv1	Bv2	Bv3	Bv4	Bv5	Bv6	Bv7	Bv8	Bv9
37	A								G
55	T			C					
67	C				T			T	
76	G				A				
85	A			G					
98	C						T		
114	A		C			C			
121	T			C					
205	G						A		
223	A							G	
244	A		G						
250	A		G						
379	A						G	G	
382	C				T	T			
415	A						G		
496	C		T						
499	A						T		
514	T								C
542	C		T						
544	G				T	T			A
545	C							T	
559	T				C	C			
613	A		G	G	G	G	G	G	G

Table S3. Continued.

Positions	Haplotypes								
	Bv1	Bv2	Bv3	Bv4	Bv5	Bv6	Bv7	Bv8	Bv9
616	C				T	T	T	T	
628	A		G	G	G	G	G	G	G
631	T			G					
649	T						C		
652	C	T							

Table S4. Comparison of intra and inter-specific variation for the two markers analyzed for the populations of *B. viride-brasiliense*.

	cox2-3	cox1
Characteristics		
Number of haplotypes	10	9
Intrapopulation variation (%)	0.3-0.6	0.1-0.4
Interpopulation variation (%)	0.3 – 2.4	0.6 – 1.8
Variable positions (%)	3.5	4.2

Table S5: Previous reports of intraspecific sequence variation in species of Batrachospermales for the two molecular markers used in this study.

Species	Molecular marker	Source, length and range	Reference
<i>Batrachospermum helminthosum</i>	cox2-3	USA, 13 localities, 234 specimens, 370-371 bp, 0.3-6.5%	Chiasson <i>et al.</i> (2003)
<i>Sirodotia delicatula</i>	cox2-3	Brazil, 3 localities, 18 specimens, 376 bp, 0%	Necchi & Vis (2005)
<i>B. macrosporum</i>	cox2-3	Brazil, French Guiana and USA, 11 localities, 149 specimens, 334-348 bp, 0-11.9%	Vis <i>et al.</i> (2008)
<i>B. arcuatum</i>	cox2-3	Bulgaria, China, Hawaii, New Zealand, Taiwan, USA, 16 localities, 107 specimens, 374-395 bp, 0-14.8%	Vis <i>et al.</i> (2010)
<i>S. suecica</i>	cox2-3	Australia, Finland, New Zealand, South Africa, USA, 13 specimens, 378 bp, 0-4.8%	Lam <i>et al.</i> (2012)

Table S5. Continued.

Species	Molecular marker	Source, length and range	Reference
<i>S. delicatula</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, 10 localities, 86 specimens, 376 bp, 0.3-1.1%	Paiano & Necchi (2013)
<i>B. viride-brasiliense</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, 9 localities, 87 specimens, 376 bp, 0.3-2.4%	This study
<i>B. helminthosum</i>	<i>cox1</i>	USA, 15 localities, 85 specimens, 664 bp, 0-6.6%	House <i>et al.</i> (2008)
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	USA and Canada, 16localities, 193 specimens, 664 bp, 0-0.6%	House <i>et al.</i> (2010)
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	Belgium, Estonia, Finland, France, Great Britain, Italy, Latvia, Lithuania, Poland, Spain, 10 localities, 71 specimens, 664 bp, 0.2-1.2%	Keil <i>et al.</i> (2015)
<i>S. delicatula</i>	<i>cox1</i>	Brazil, 7 localities, 42 specimens, 664 bp, 0.2-0.4%	Paiano & Necchi (2013)
<i>B. viride-brasiliense</i>	<i>cox1</i>	Brazil, 9 localities, 43 specimens, 664 bp, 0.6-2.0%	This study

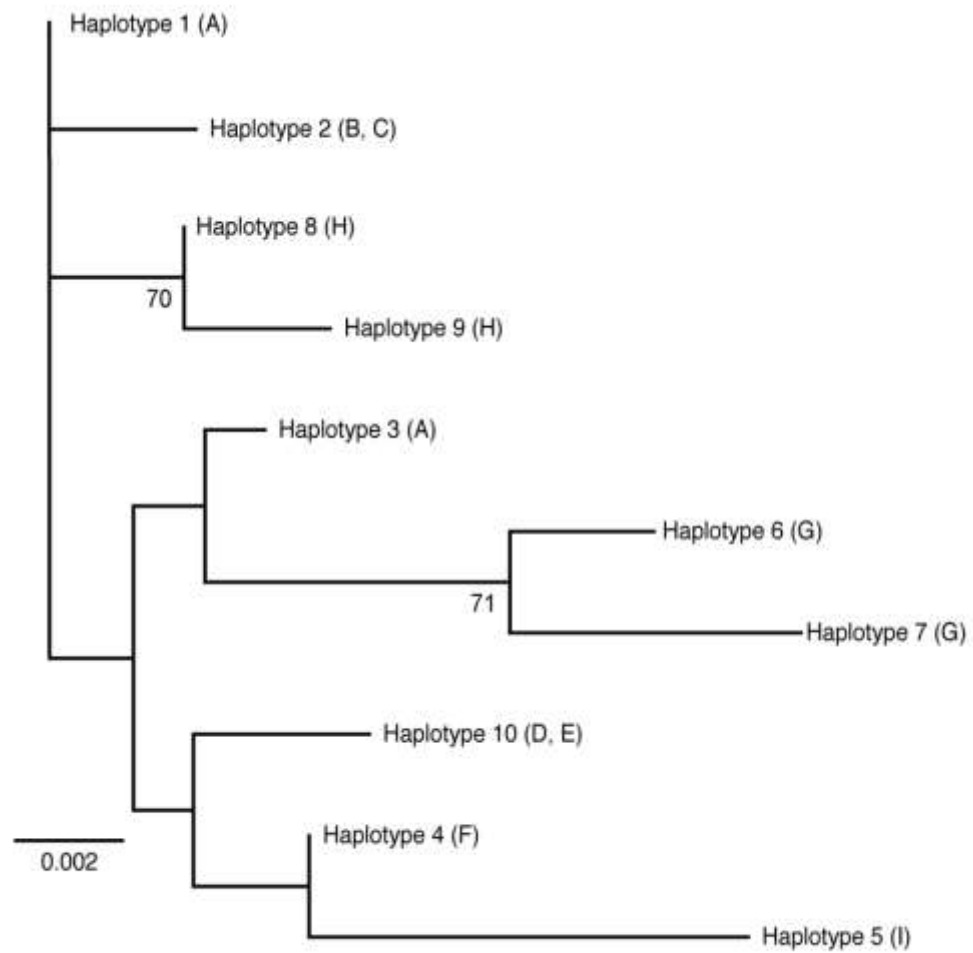


Fig. S1. Tree from maximum likelihood analysis of *cox2-3* spacer sequence data showing the relationship among *B. viride-brasiliense* haplotypes and using *B. helminthosum* as outgroup.

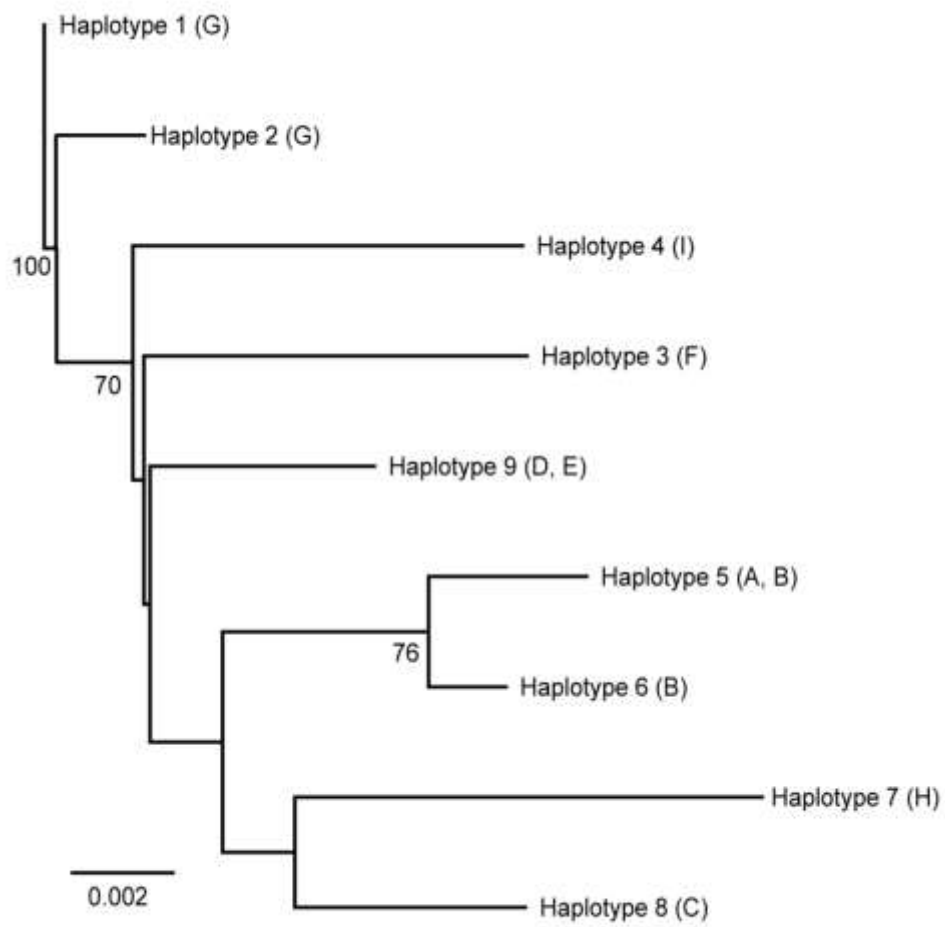


Fig. S2. Tree from maximum likelihood analysis of *cox1* barcode region sequence data showing the relationship among *B. viride-brasiliense* haplotypes and using *B. helminthosum* as outgroup.

CAPÍTULO 2

FILOGEOGRAFIA DA RODÓFITA CONTINENTAL *Kumanoa ambigua* (RHODOPHYTA, BATRACHOSPERMALES) NO BRASIL

Resumo

Kumanoa ambigua (Montagne) Entwisle, é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. A variação genética entre e dentro de populações ao longo de sua distribuição geográfica no Brasil foi investigada com base em dois marcadores mitocondriais: a região espaçadora *cox2-3* e a região de “barcode” *cox1*. Três haplótipos foram encontrados para ambos marcadores, num total de 43 indivíduos analisados em cinco localidades. Os haplótipos de *cox2-3* apresentaram variação de 0,6-2,4%, com nove posições variáveis nas suas sequências (todas com comprimento 335 pb), enquanto para *cox1*, os haplótipos variaram em 1,3-2,0%, com dezesseis posições variáveis (em sequências de 664 pb. Para ambos marcadores, cada uma das cinco localidades apresentou somente um haplótipo, sendo que três locais apresentaram o mesmo haplótipo tanto de *cox2-3* como de *cox1*. Os resultados indicam que trata-se de uma única espécie, com níveis de variação semelhantes aos encontrados para estudos anteriores de outras espécies de Batrachospermales. A ausência variação intra-populacional observada para *K. ambigua* tem sido consistentemente constatada para outros membros de Batrachospermales, com cada localidade apresentando somente um ou dois haplótipos e considerada como padrão típico para este grupo de algas. A distribuição geográfica dos espécimes

amostrados restringiu-se à vegetação de Floresta Ombrófila Densa (Atlântica), padrão também observado para diferentes grupos de organismos que tiveram seus padrões filogeográficos analisados, como anfíbios e plantas, para os quais a variação pôde ser explicada pela existência de refúgios durante os períodos de máximo glacial. Essa teoria pode ser aplicada à distribuição conhecida de *K. ambigua*, apesar do pequeno número de populações amostradas nesse estudo.

Palavras-chave: *cox1*. *cox2-3*. Divergência genética. Haplótipos. Mata Atlântica. Variação intraespecífica.

INTRODUÇÃO

O gênero *Kumanoa* foi proposto para espécies previamente classificadas nas seções *Contorta* Skuja e *Hybrida* De Toni do gênero *Batrachospermum*, baseado em dados morfológicos e moleculares (ENTWISLE *et al.*, 2009). Espécies deste gênero distinguem-se de outras Batrachospermales por apresentar ramos carpogoniais torcidos em hélice ou fortemente curvados (NECCHI e VIS, 2012). Atualmente, 35 espécies são reconhecidas para o gênero, com a maioria dessas espécies distribuídas mundialmente (ENTWISLE *et al.*, 2009; NECCHI *et al.*, 2010; NECCHI e VIS, 2012). Destas, 13 espécies foram registradas no Brasil (NECCHI e VIS, 2012). As espécies de *Kumanoa* são diferenciadas umas das outras baseadas em uma combinação de caracteres relacionados basicamente ao carpogônio e ao carposporófito, assim como na morfologia vegetativa (NECCHI, 1990; NECCHI, 1990; ENTWISLE e FOARD, 1999; KUMANO, 2002; VIS *et al.*, 2004).

Estudos moleculares têm sido conduzidos até o momento baseado nos genes *rbcL* (gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO), *SSU* (subunidade menor do DNA ribossomal nuclear), *UPA* (gene plastidial “Universal Plastid Amplicon”) e *cox1* (região de “barcode” do gene que codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) os quais têm confirmado o gênero como um grupo monofilético dentro de Batrachospermales (ENTWISLE *et al.*, 2009; NECCHI *et al.*, 2010; NECCHI e VIS, 2012). No entanto, as relações intra-específicas das espécies são pouco conhecidas, devido à limitação de amostragens populacionais.

Kumanoa ambigua (Montagne) Entwisle *et al.*, apresenta distribuição restrita às Américas do Norte (Belize, Costa Rica, Caribe) e Sul (Brasil e Guiana Francesa). No Brasil, tem registros de ocorrência limitada às regiões de Floresta Ombrófila Densa (Atlântica e Amazônica) (CABRERA e WILLINK, 1973; AB’SABER, 1977), sendo mais frequentes nas regiões sul e sudeste (5°21’-30°53’ S) (NECCHI, 1990).

Até a presente data, nenhum estudo com enfoque filogeográfico foi conduzido para as espécies do gênero *Kumanoa*. O objetivo desse estudo é avaliar os padrões de divergência genética inter e intra-populacionais para a espécie *K. ambigua* com base em dois marcadores mitocondriais: região de barcode *cox1* e região espaçadora *cox2-3* ao longo de sua distribuição geográfica no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes identificados como *Kumanoa ambigua* foram obtidos a partir de 5 localidades (trechos com extensão variando entre 7 – 17 m), nas regiões sul e sudeste do Brasil (Tabela 1, Figura 1). Em geral, 15 indivíduos foram coletados em cada localidade, com exceção da localidade A, onde somente três indivíduos foram encontrados. Observações morfológicas e identificação taxonômica foram feitas para as populações logo após coleta, baseando-se nos atuais caracteres diagnósticos (ENTWISLE *et al.*, 2009; NECCHI e VIS, 2012). Espécimes-testemunho estão depositados no herbário institucional local (Tabela 1).

Para as análises moleculares, os indivíduos preservados em sílica gel foram macerados em nitrogênio líquido ou utilizando homogeneizador de tecidos ‘Precellys™ 24’ (Bertin Technologies, Montignyle-Bretonneux, França). Para

cada localidade, 10 indivíduos foram selecionados aleatoriamente, e quando as extrações não geravam produtos de PCR ou uma variação genética elevada foi encontrada, os cinco indivíduos restantes também eram analisados. Os indivíduos foram sequenciados inicialmente para a região espaçadora *cox2-3* e posteriormente três indivíduos de cada haplótipo foram sequenciados para a região de barcode *cox1*.

As extrações de DNA foram feitas utilizando-se dos kits DNeasy™ Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ou NucleoSpin™ Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), de acordo com os protocolos dos fabricantes. Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram feitas com TopTaq Master Mix (Qiagen) e Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA), com volume final de 25 µL, contendo 50 pmol de DNA genômico e 5 pmol de cada “primer” (iniciador).

Para a região de barcode *cox1*, foram usados os iniciadores GazF1 e GazR1, seguindo os termociclos de Saunders (2005); e para a região espaçadora *cox2-3* o par de iniciadores utilizados foi *cox2F* e *cox3R*, e os termociclos de Zuccarello *et al.* (1999) foram usados. Os produtos de PCR foram purificados com os kits ‘Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up’ (Macherey-Nagel) ou “GFX™ PCR” (GE Healthcare), de acordo com os protocolos dos fabricantes. Posteriormente os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa ‘Genomic Engenharia Molecular’ (<http://www.genomic.com.br>) em sequenciador automático ABI PRISM™ 3100 e Kit ABI PRISM Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de

sequenciamento foram conduzidas utilizando-se os mesmos iniciadores usados nas reações de PCR.

As sequências finais foram alinhadas e a variação genética calculada utilizando o software Geneious versão 7 (KEARSE *et al.*, 2012). A relação entre os haplótipos de *cox1* e de *cox2-3* foram inferidas por uma rede de parcimônia estatística com uso do software TCS versão 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) utilizando um limite de conexão de 95%. Árvores foram construídas para as sequências de *cox1* e *cox2-3* através do ‘Phylogenetic Analysis Using Parsimony’ (PAUP 4.0b8; SWOFFORD, 2003) usando o Geneious “plugin”. As análises foram rodadas com o uso do modelo de evolução GTR+G+I, determinado pelo Akaike Information Criterion, pelo software ModelTest 2.1.4 (DARRIBA *et al.*, 2012). Topologias de Máxima Verossimilhança (ML) e valores de bootstrap de 1000 réplicas foram inferidas usando o programa RAxMLGUI versão 1.2 (SILVESTRO e MICHALAK, 2011). Análise Bayesiana (BA) foi realizada no software MrBayes 3.2 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2011) com três corridas de cinco cadeias de Metropolis acopladas à cadeia de Markov Monte Carlo para 10×10^6 gerações. Associações dos haplótipos de *cox1* e *cox 2-3* com suas respectivas distâncias geográficas foram testadas pelo Teste de Mantel (SOKAL, 1979; DINIZ-FILHO *et al.*, 2013) baseados em duas matrizes de dados (diferenças genéticas em pares de base e distância geográfica em km). Os testes foram realizados com o uso de ‘Isolation by Distance Web Service’ (IBDWS) (JENSEN *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Variação intraespecífica de *cox2-3*

Foram encontrados três haplótipos para os 43 indivíduos analisados para a região espaçadora *cox2-3*, com sequências de 335 pb de comprimento (Tabela 2, Figuras 1-2). A divergência entre os haplótipos foi relativamente baixa, variando de 0,6 até 2,4%. Dentre as cinco localidades analisadas, três delas apresentaram o mesmo haplótipo Ka1, enquanto os haplótipos Ka2 e Ka3 foram encontrados em apenas uma localidade. As cinco populações analisadas neste estudo tiveram apenas um haplótipo cada (Tabela 1, Figura 1). O haplótipo Ka1 foi o mais abundante, com 30 indivíduos, e os haplótipos Ka2 e Ka3 apresentaram dez e três indivíduos, respectivamente. Os três haplótipos diferiram em nove posições entre si (Tabela 3).

A rede de haplótipos (Figuras 2-3) mostrou o haplótipo Ka1 (localidades B, C e D) como provável ancestral (conforme determinado pelo TCS) igualmente distantes dos haplótipos Ka2 (localidade E) e Ka3 (localidade A), sendo estes mais próximos geneticamente, mas distantes geograficamente. As diferenças genéticas não apresentaram correlação com as distâncias geográficas, com valores do teste de Mantel de $r=0.141$, $p=0.851$.

Variação intraespecífica de *cox1*

Foram encontrados três haplótipos para os 15 indivíduos analisados para a região de barcode *cox1*, com sequências de 664 pb de comprimento (Tabela 4, Figuras 1-3). Os haplótipos apresentaram variação relativamente baixa, de 1,3% até 2,0%. Todas as cinco localidades apresentaram um único haplótipo, sendo o haplótipo Ka1 o mais frequente e abundante, encontrado em três localidades, com um total de nove indivíduos, enquanto os demais haplótipos ocorreram em uma localidade, com três indivíduos cada. Os haplótipos diferiram em 16 posições entre si (Tabela 5).

A rede de haplótipos (Figuras 4-5) mostrou o haplótipo Ka1 (localidades B, C e D) como provável ancestral, porém os haplótipos Ka2 (localidade E) e Ka3 (localidade A) foram mais divergentes e distantes. As divergências genéticas dos haplótipos de *cox1* foram positivamente correlacionadas com as distâncias geográficas, com valores do teste de Mantel de $r=0.865$, $p=0.949$.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos mostraram que as populações de *K. ambigua* representam uma única espécie, com valores de divergência relativamente baixos para ambos marcadores utilizados. O mesmo padrão de distribuição foi observado, onde três localidades (B, C e D) apresentaram o mesmo haplótipo, tanto para *cox2-3* como para *cox1*. Esse resultado é semelhante ao encontrado em várias espécies de *Batrachospermales* estudadas, nas quais o mesmo haplótipo foi encontrado em localidades distintas, com distâncias geográficas consideravelmente altas como *Batrachospermum helminthosum* na América do

Norte (CHIASSON *et al.*, 2003; HOUSE *et al.*, 2010; respectivamente), *B. gelatinosum* na Europa (KEIL *et al.*, 2015) e *Sirodotia delicatula* no Brasil (PAIANO e NECCHI, 2013). Curiosamente, haplótipos de mesmas localidades, com distância de ~600 km, foram geneticamente próximos para o marcador *cox2-3*, porém se apresentaram mais divergentes para *cox1*, fato que fica evidenciado pelos valores observados no teste de Mantel, que apresentou valores significantes somente para o marcador *cox1*.

Os dois marcadores utilizados neste estudo apresentaram valores similares em termos de posições variáveis, com *cox2-3* sendo levemente mais elevado (Tabela 6). Nenhuma das localidades apresentou divergência intra-populacional, diferentemente das outras espécies deste estudo. Em termos de divergência inter-populacional, os valores encontrados para ambos marcadores foram semelhantes a algumas espécies estudadas no Brasil, como *Batrachospermum viride-brasiliense* e *Setacea puiggariana*, que apresentaram variação de até 2,4%. No entanto, foi considerado baixo em relação a estudos de maior abrangência geográfica: até 6,5% para *B. helminthosum* na América do Norte (CHIASSON *et al.*, 2003), até 13,1% para *B. macrosporum* na América do Sul (VIS *et al.*, 2008), até 6,2% para *B. arcuatum* na América do Norte e 14,8% para haplótipos encontrados em diferentes localidades na Europa (VIS *et al.*, 2010) (Tabela 7), embora deva ser considerada a abrangência geográfica deste estudo, que foi consideravelmente menor do que para outras espécies analisadas.

Com base nos estudos de Batrachospermales realizados até o momento, os valores de divergência encontrados para ambos os marcadores entre haplótipos de localidades distintas, revelaram um número considerável de haplótipos

encontrados (entre cinco e 15) (VIS *et al.*, 2008; KEIL *et al.*, 2015). Porém, o número de haplótipos dentro de uma localidade é geralmente muito baixo, tipicamente um ou dois, raramente mais, como demonstrado para estudos anteriores até o momento (Tabela 7). Os dados apresentados para este estudo também confirmam esse padrão, com apenas um haplótipo para todas as localidades amostradas.

As populações amostradas neste estudo tiveram distribuição exclusivamente em Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica). Poucos estudos filogeográficos nesse bioma foram realizados até o momento, porém para estes poucos foi possível observar a existência de descontinuidades filogeográficas em diferentes grupos de organismos, como anfíbios (CARNAVAL *et al.*, 2009), morcegos (MARTINS *et al.*, 2009) e plantas (RIBEIRO *et al.* 2010). A principal hipótese usada para explicar a diversificação dentro desses organismos é baseada na teoria dos refúgios (BROWN e AB'SABER, 1979), que representam ilhas de florestas densas úmidas isoladas por vegetação aberta, que durante períodos de máximo glacial se retraíram e depois voltaram a se expandir nos períodos mais quentes (interglaciais). Carnaval & Moritz (2008) realizaram um estudo para a Mata Atlântica com base no último máximo glacial (21 mil anos atrás), evidenciando a existência de zonas de estabilidade florestal na região de São Paulo durante esse período. Essa teoria se aplica adequadamente a estudos filogeográficos de pássaros e anfíbios (CABANNE *et al.*, 2007; 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009), e pode ser usada para explicar a distribuição conhecida de *K. ambigua*, apesar do pequeno número de populações amostradas neste estudo. Porém, ainda não é possível definir nenhum padrão filogeográfico,

devido ao baixo número de populações amostradas. Além disso, o pequeno número de estudos filogeográficos realizados até o presente, evidencia a necessidade de uma amostragem mais abrangente, se possível incluindo novas populações de *K. ambigua* de outros biomas, para que se possa entender melhor os padrões biogeográficos de espécies de Batrachospermales no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia* 53: 1-23, 1977.
- BROWN, K.S.; AB'SÁBER, A. N. Ice – ages forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological, and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas* 5, 1-30, 1979.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 73-84, 2007.
- CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 760-773, 2008.
- CABRERA A.L.; WILLINK, A. Biogeografia de America Latina. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, Washington, 120 pp, 1973.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35, 1187-1201, 2008.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323, 785-789, 2009.

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

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

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

DINIZ-FILHO, J.A.F.; SOARES, T.N.; LIMA, J.S.; DROBOVOLSKY, R.; LANDEIRO, V. L.; TELLES, M. P. C.; RANGEL, T. F.; BINI, L. M. Mantel test in population genetics. *Genet. Mol. Biol.* 36: 475-85, 2013.

ENTWISLE T.J.; FOARD, H.J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and records in sections *Contorta* and *Hybrida*. *Australian Systematic Botany* 12: 615–633, 1999.

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

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.* 56: 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* 49: 501-507, 2010.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755, 2001.

JENSEN, J.L.; BOHONAK, A.J.; KELLEY, S.T. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 6-13, 2005.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARROWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-9, 2012.

KEIL, E.J.; MACY, T.T.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; TOMA'S, P.; ABOAL, M.; VIS, M. L. Phylogeography of *Batrachospermumgelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) shows postglacial expansion in Europe. *Phycologia* 54: 176–182, 2015.

KUMANO, S. *Freshwater Red Algae of the World*. Biopress Limited, Bristol, 375, 2002.

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

MARTINS, F. M.; TEMPLETON, A. R.; PAVAN, A. C. O.; KOHLBACH, B. C.; MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9, 294, 2009.

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

NECCHI, O. JR.; VIS, M.L. Reproductive ecology of the freshwater red alga *Batrachospermum delicatulum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in three tropical streams. *Phycol. Res.* 53: 194-200, 2005.

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

NECCHI, O. JR.; VIS, M.L. Monograph of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Bibliotheca Phycologia* 116: 1-79, 2012.

PAIANO, M. O.; NECCHI, O. JR. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycol. Res.* 61: 248-255, 2013.

PAIANO, M.O.; NECCHI, O. JR. Phylogeography of the freshwater red alga *Batrachospermum viride-brasiliense*. *Phycol. Res.* 64: no prelo, 2016.

RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 1-12, 2010.

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

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

SOKAL, R. R. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* 28: 227-32, 1979.

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

VIS M.L.; ENTWISLE T.J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from rbcL sequence data of Australian taxa. *Journal of Phycology* 36: 1175–1182, 2000.

VIS M.L.; SHEATH R.G.; CHIASSON, W.B. A survey of the Rhodophyta and associated macroalgae from coastal streams in French Guiana. *Cryptogamie, Algologie* 25: 161–174, 2004.

VIS M.L.; CHIASSON, W.B.; SHEATH, R.G. Phylogenetic relationship of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. *Phycologia* 44: 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.*44: 882-888, 2008.

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

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

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Descrição dos locais de coleta para as populações de *Kumanoa ambigua* analisadas neste estudo.

Espécie/Código	Localidade, coletor, data e n° herbário
<i>K. ambigua</i> – A*	SC: São Pedro Alcântara, Salto, 27°34'01"S, 48°50'05"W, 12.iii.2016.
<i>Kumanoa. ambigua</i> – B	PR: Foz do Iguaçu, riacho no final da trilha do reservatório, Rio São João, 25°37'13,1"S, 54°28'14,4"W; 26.xii.2013 (SJRP 32186).
<i>K. ambigua</i> – C	SP: Paraguaçu Paulista, Maracaí, Córrego Km 487-488 (SP 374), 22°33'08"S, 50°48'26"W; 16.xi.2007 (SJRP 32187).
<i>K. ambigua</i> – D	SP: Potirendaba, Ribeirão Borá, 20°58'25,7"S, 49°25'21,9"W; 06.vi.2008 (SJRP 32188).
<i>K. ambigua</i> – E	SP: Bebedouro, Fazenda Córrego dos Bois, 20°53'24'S, 48°31'43"W; 04.vii.2008 (SJRP 32189).

*Apenas 3 indivíduos

Tabela 2. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipos para a região espaçadora *cox2-3* de *K. ambigua*.

Localidade	n	Haplótipos		
		Ka1	Ka2	Ka3
A	03			03
B	10	10		
C	10	10		
D	10	10		
E	10		10	
Total	43	30	10	03

Tabela 3. Haplótipos de *K. ambigua* definidos por nove posições variáveis de nucleotídeos em 335 pb da região espaçadora *cox2-3*. A sequência para o haplótipo Ka1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Ka1.

Posições	Haplótipos		
	Ka1	Ka2	Ka3
12	C	T	T
54	T	C	C
96	C	T	T
162	C	T	T
168	A	G	
223	C		G
233	C	G	
258	C	T	T
319	T	C	C

Tabela 4. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipos para a região espaçadora *cox1* de *K. ambigua*.

Localidade	n	Haplótipos		
		Ka1	Ka2	Ka3
A	03			03
B	03	03		
C	03	03		
D	03	03		
E	03		03	
Total	15	09	03	03

Tabela 5. Haplótipos de *K. ambigua* definidos por 16 posições variáveis de nucleotídeos em 664 pb da região espaçadora *cox1*. A sequência para o haplótipo Ka1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Ka1.

Haplótipos			
Posições	Ka1	Ka2	Ka3
37	A		G
58	T		G
59	T		G
67	C	T	A
79	C	T	T
136	A		C
202	G		A
208	C	T	
220	C	T	T
337	A	G	
346	T	C	C
376	T		C
388	G		A
427	T	C	
490	C	T	
652	T	C	

Tabela 6. Comparação da variação intra e interespecífica para os dois marcadores moleculares analisados para as populações de *K. ambigua*.

	<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
Características		
Número de haplótipos	3	3
Variação intra-populacional (%)	0	0
Variação inter-populacional (%)	0.6-2.4	1.3-2.0
Posições variáveis (%)	2.7	2.4

Tabela 7: Estudos anteriores de variação intraespecífica em espécies de Batrachospermatales para os dois marcadores moleculares utilizados neste estudo. Todas as sequências de *cox1* tem comprimento de 664 pb.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>Batrachospermum helminthosum</i>	<i>cox2-3</i>	USA, 13 localidades, 234 indivíduos (13 haplótipos), 370-371 pb, 0.3-6.5%	Chiasson <i>et al.</i> (2003)
<i>Sirodotia delicatula</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 3 localidades, 18 indivíduos (1 haplótipo), 376 pb, 0%	Necchi & Vis (2005)
<i>Batrachospermum macrosporum</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, Guiana Francesa e USA, 11 localidades, 149 indivíduos (16 haplótipos), 334-348 pb, 0-11.9%	Vis <i>et al.</i> (2008)
<i>Batrachospermum arcuatum</i>	<i>cox2-3</i>	Bulgária, China, Havaí, Nova Zelândia, Taiwan, USA, 16 localidades, 107 indivíduos (12 haplótipos), 374-395 pb, 0-14.8%	Vis <i>et al.</i> (2010)
<i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 9 localidades, 87 indivíduos (10 haplótipos), 376 pb, 0.3-2.4%	Paiano & Necchi (2016)
<i>Sirodotia suecica</i>	<i>cox2-3</i>	Austrália, Finlândia, Nova Zelândia, África do Sul, EUA, 13 indivíduos (12 haplótipos), 378 pb, 0-4.8%	Lam <i>et al.</i> (2012)

Tabela 7. Continuação.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>Sirodotia delicatula</i>	cox2-3	Brasil, 10 localidades, 86 indivíduos (8 haplótipos), 376 pb, 0.3-1.1%	Paiano & Necchi (2013)
<i>K. ambigua</i>	cox2-3	Brasil, 5 localidade, 43 indivíduos (3 haplótipos), 0.6-2.4%	Este estudo
<i>Setacea puiggariana</i>	cox2-3	Brasil, 10 localidades, 65 indivíduos (6 haplótipos), 376 pb, 0.3-2.4%	Este estudo
<i>B. helminthosum</i>	cox1	EUA, 15 localidades, 85 indivíduos (16 haplótipos), 0-6.6%	House <i>et al.</i> (2008)
<i>B. gelatinosum</i>	cox1	EUA e Canadá, 16 localidades, 193 indivíduos (7 haplótipos), 0-0.6%	House <i>et al.</i> (2010)
<i>B. viride-brasiliense</i>	cox1	Brasil, 9 localidades, 43 indivíduos (9 haplótipos), 0.6-1.8%	Paiano & Necchi (2016)
<i>S. delicatula</i>	cox1	Brasil, 7 localidades, 42 indivíduos (9 haplótipos), 0.2-0.4%	Paiano & Necchi (2013)

Tabela 7. Continuação.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	Bélgica, Estônia, Finlândia, França, Grã-Bretanha, Itália, Letônia, Lituânia, Polônia, Espanha, 10 localidades, 71 indivíduos (12 haplótipos), 0.2-1.2%	Keil <i>et al.</i> (2015)
<i>K. ambigua</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 5 localidades, 43 indivíduos (3 haplótipos), 1.3-2.0%	Este estudo
<i>S. puiggarianna</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 10 localidades, 30 indivíduos (8 haplótipos), 0.2-2.4%	Este estudo

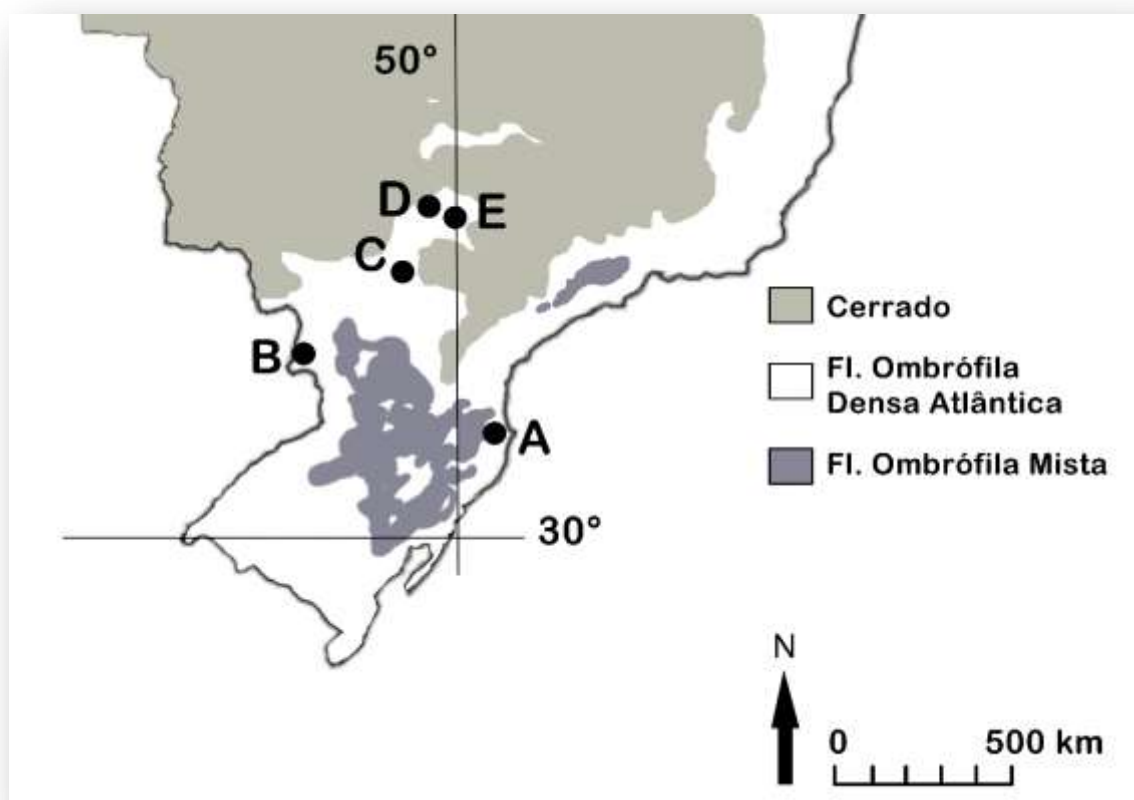


Figura 1. Mapa mostrando as localidades amostradas de *Kumanoa ambigua* no Brasil. Descrições e códigos de cada localidade estão apresentados na Tabela 1.

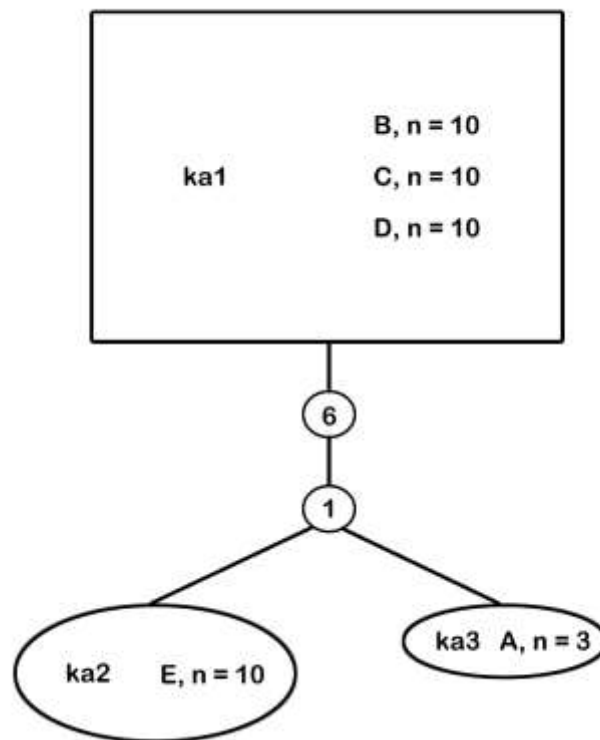


Figura 2. Rede de haplótipos da região espaçadora *cox2-3* para populações de *K. ambigua* no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

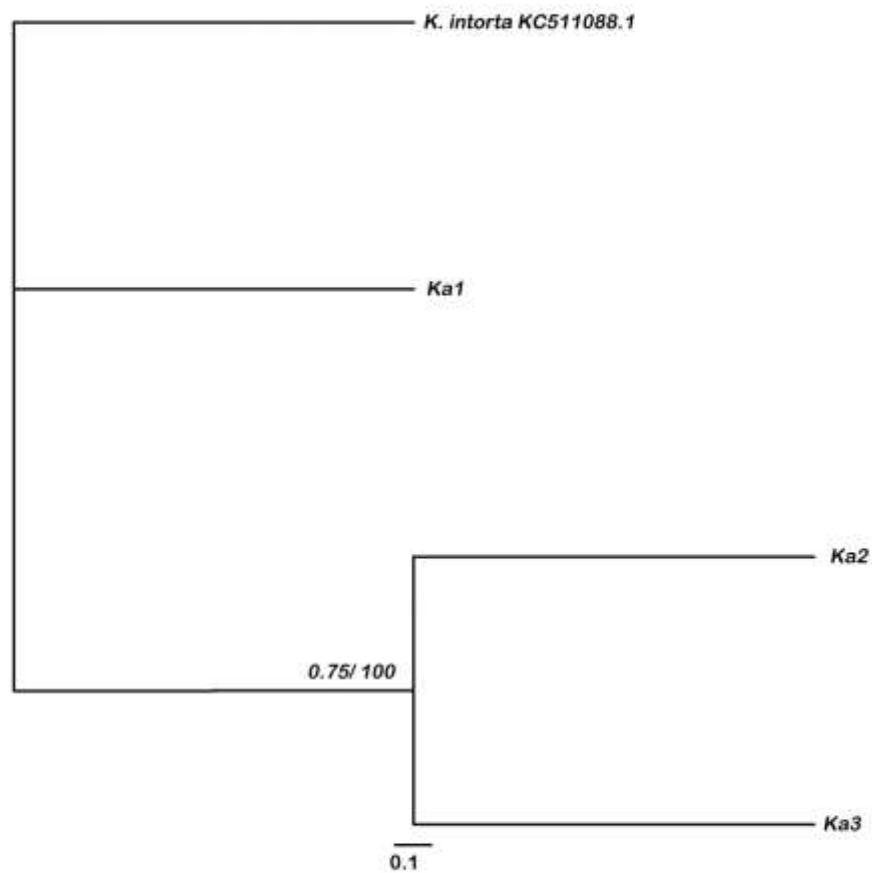


Figura 3. Árvore da análise Máxima Verossimilhança das sequências da região espaçadora *cox2-3* mostrando as relações entre os haplótipos de *K. ambigua*, usando *K. intorta* como grupo externo (KC511088.1). Código das localidades e designação dos haplótipos estão na Tabela 2. Os valores nos nós indicam os valores de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente; nós sem valores indicam suporte < 70%.

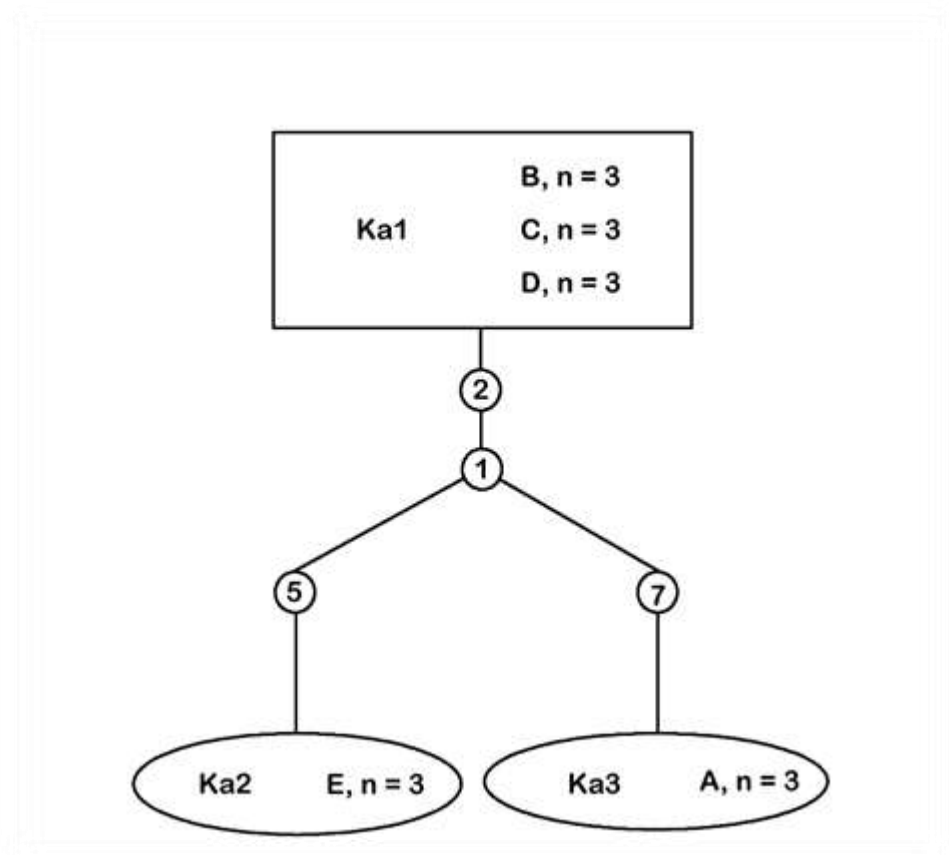


Figura 4. Rede de haplótipos para a região de barcode *cox1* para populações de *K. ambigua* no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 4, respectivamente.

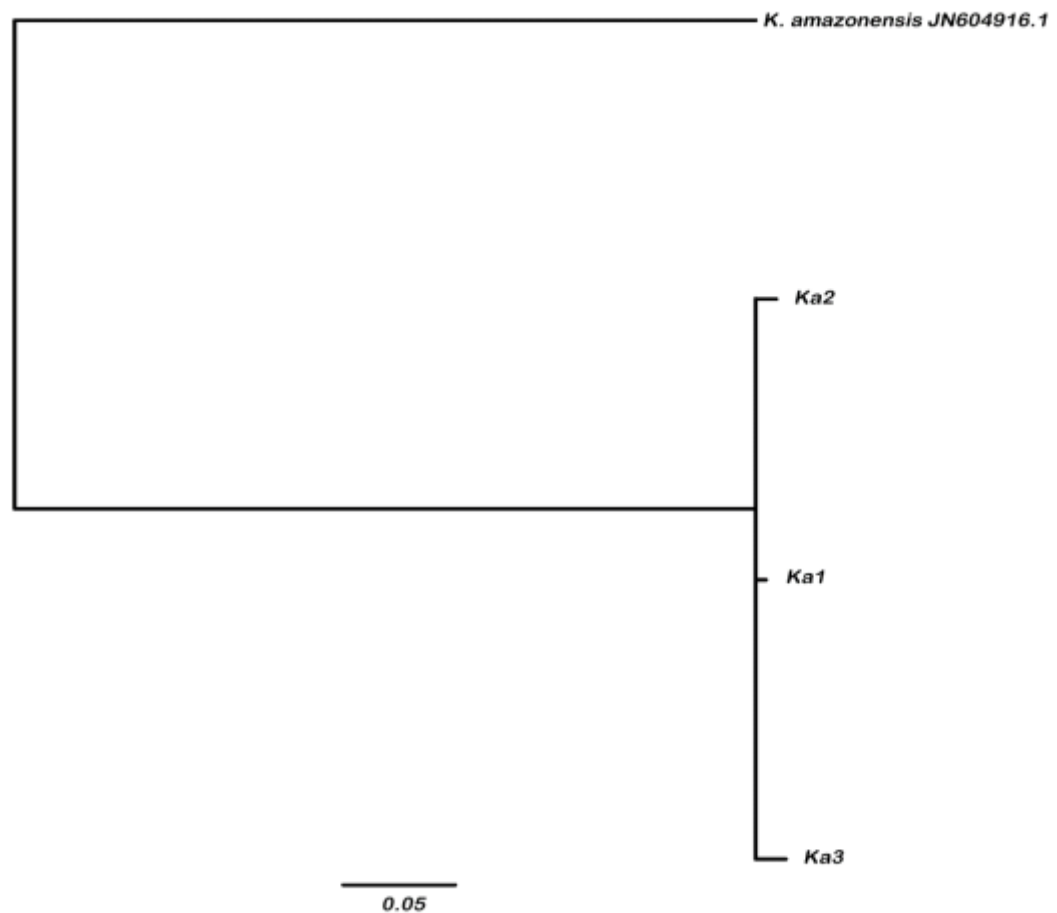


Figura 5. Árvore da análise Máxima Verossimilhança das sequências da região de barcode *cox1* mostrando as relações entre os haplótipos de *K. ambigua*, usando *K. amazonensis* como grupo externo (JN604916.1). Código das localidades e designação dos haplótipos estão na Tabela 4. Os valores nos nós indicam os valores de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente; nós sem valores indicam suporte < 70%.

CAPÍTULO 3

Phylogeography of the freshwater red alga *Setacea puiggariana* (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil

Monica O. Paiano^{1*} and Orlando Necchi Jr¹

¹Zoology and Botany Department, São Paulo State University, Rua Cristóvão Colombo, 2265 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

Running title: Phylogeography of *Setacea puiggariana*

*Corresponding author (mopaiano83@gmail.com).

Submetido à publicação em "Phycologia" em 13/09/2016

ABSTRACT

Phylogeography of *Setacea puiggariana*, which is widely distributed in southern and southeastern Brazil, with few records in South America and Africa, was investigated based on mitochondrial genetic markers: the *cox2-3* spacer and the barcode region of *cox1* gene. Ten streams segments were sampled across the known geographic distribution in Brazil, with a total of 65 individuals sequenced for the *cox2-3* spacer and 30 for *cox1*. Six *cox2-3* and eight *cox1* haplotypes were observed among the individuals analyzed. Divergence among haplotypes were relatively low for both markers ($\leq 2.4\%$), indicating that *S. puiggariana* represents a single species. Two haplotypes were found in one location for *cox2-3* spacer, with all other locations having just one haplotype. Each of the *cox1* haplotypes was found in a distinct location. Haplotype network showed the putative ancestor occurring in most locations in southern and southeastern Brazil for *cox2-3*, and for *cox1* the haplotype network revealed a relatively complex structure, with the putative ancestor represented by individuals from two distant locations of southern and southeastern Brazil. The low divergence observed among the Brazilian haplotypes supported the recognition of all collections as a single species, for both markers considering the geographic range sampled (maximum distance $\sim 1,000$ km) as compared to previous studies at similar or broader geographic scales ($> 2,500$ km). This study confirmed the general pattern found in Batrachospermales that little variation is typically observed within a location (one, rarely two haplotypes) and most populations having only one haplotype. In addition, we found no evidence of higher genetic divergences with increased

geographic distance among haplotypes, which has also been reported in members of the Batrachospermales.

Key words: Batrachospermales, *cox1*, *cox2-3* spacer, genetic distances, geographical patterns, haplotypes, intra-specific variation, phylogeography

INTRODUCTION

Batrachospermum Roth is the most species-rich genus of the freshwater red algal order Batrachospermales with at least 263 species recognized worldwide (Kumano 2002, Guiry & Guiry 2016). Molecular assisted studies have demonstrated the genus as paraphyletic (Vis et al. 1998; Vis & Entwisle 2000; Vis et al. 2005; Entwisle et al. 2009). Entwisle et al. (2009) proposed the provisional acceptance of the genus and recognition of eight sections: *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora*, *Setacea*, *Turfosa* and *Virescentia*. Recently, the section *Helminthoidea* was raised to the genus rank as *Sheathia* (Salomaki et al. 2014). Section *Setacea* was also raised to genus by Rossignolo & Necchi (2016), but Entwisle et al. (2016) proposed placed it into a wider genus *Nothocladus sensu lato* with various Australasian taxa. *Setacea* (De Toni) Necchi & Rossignolo is currently composed by three species (*S. atra* (Hudson) Necchi & Rossignolo, *S. atro-brasiliensis* Necchi & Rossignolo and *S. puiggariana* (Grunow) Necchi & Rossignolo). The three species are clearly distinct based on morphological evidence and DNA sequences (Rossignolo & Necchi 2016).

Previous molecular investigations including members of *Setacea*, mostly used two genetic markers (*rbcL* and the nuclear small subunit ribosomal DNA, SSU rDNA gene) (Entwisle et al. 2009, Rossignolo & Necchi 2016)). While inter-specific phylogenetic have been investigated, little is known about intra-specific variation. There are only two phylogeographic investigations on members of Batrachospermales in South America. Phylogeographic patterns of *Batrachospermum macrosporum* in South and North America, including

populations from French Guiana and Brazil, found extremely high variation between haplotypes from South America, with the Amazon probably serving as a center of diversity (Vis *et al.* 2008). Genetic variation of *Sirodotia* in Brazil, revealed the existence of high intraspecific genetic variation among individuals from distinct locations (several haplotypes), but lower variation within a location (Paiano & Necchi 2013), which seems to be a pattern for the Batrachospermales.

Setacea puiggariana is widely distributed in South America, with many records in southeastern and southern Brazil, and also Argentina and Uruguay (Necchi 1990), plus a single record from Africa (Angola, as *Batrachospermum nigrescens* W. West & G.S. West, Necchi 1990). In Brazil it is found in three biomes or biogeographical provinces (as defined by Cabrera & Willink 1973, Ab'Saber 1977): the tropical Atlantic rainforest, sub-tropical rainforest, and "cerrado" (Brazilian savannah) areas ranging from 22°49' -30°53' S (Necchi 1990).

Although the species has wide geographic distribution and several populations have been sampled (Rossignolo & Necchi 2016), no phylogeographic study has been conducted to investigate the intra- and inter-population genetic patterns. The present study was undertaken to evaluate the genetic variation within and between populations of *S. puiggariana* across its Brazilian geographical distribution (south and southeast regions) using the mitochondrial markers *cox1* and the *cox2-3* spacer.

MATERIALS AND METHODS

The populations of *S. puiggariana* were obtained from ten streams segments (streams lengths of 7-25 m) across its distribution in southern and southeastern Brazil (Supporting Information Table S1, Fig. 1). Several of these locations were the same as described by Rossignolo & Necchi (2016) and all from distinct river basins, whereas some belong to different large drainage systems from South America. Morphological examination and taxonomic identification were made for specimens just after collection, based on current diagnostic criteria (Necchi 1990, b; Entwisle 1992; Rossignolo & Necchi 2016). Voucher specimens were made with a portion of the specimens and lodged at the herbarium SJRP (Table S1), whereas the main part was dried in silica desiccant for molecular analyses.

For DNA extraction, specimens were ground in liquid nitrogen or in a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-Le Bretonneux, France). As a rule, 10 individuals were randomly chosen. Generally, ten individuals were sequenced for *cox2-3* spacer and then three individuals of each population were sequenced for *cox1*.

DNA extractions were performed using either the DNeasy™ Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) or the NucleoSpin™ plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. PCRs were conducted with the TopTaq Master Mix (Qiagen) and Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) for a total volume of 25 µL consisting of ca. 50 pmol of genomic DNA and 5 pmol of each primer. For the *cox2-3* spacer the primer pair *cox2F* and *cox3R* and protocols from Zuccarello *et al.* (1999) were followed; likewise, for the *cox1* barcoding region, primers *GazF1* and *GazR1* and protocols

from Saunders (2005) were used. The PCR product was purified using the “GFX™ PCR” (GE Healthcare) or NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up” (Macherey-Nagel) according to the manufacturers’ protocols. PCR products were sequenced using the ABI PRISM Big Dye™ v3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and the ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were performed using PCR primers.

Sequence alignments were assembled in Geneious 7 (Kearse *et al.* 2012). Variation among sequences was calculated as uncorrected pairwise differences using Geneious. Relationships of *cox2-3* and *cox1* haplotypes were further investigated by a statistical parsimony network using TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) with a 95% connection limit. Trees were constructed for *cox2-3* and *cox1* data with ‘Phylogenetic Analysis Using Parsimony’ (PAUP 4.0b8; Swofford 2003) using the Geneious plugin. Analyses were performed with a GTR+I+G as the best-fit model of sequence evolution determined by the Akaike Information Criterion using jModelTest 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012). Maximum-likelihood (ML) topologies and bootstrap values from 10,000 replicates were inferred using RAxMLGUI (Silvestro & Michalak 2011). Bayesian analysis (BA) was performed in MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) with three runs of five chains of Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo for 10×10^6 generations. Association of *cox1* and *cox2-3* haplotypes and geographic distances was tested by the Mantel test (Sokal 1979; Diniz-Filho *et al.* 2013) based on two matrices of raw data (genetic differences as base pairs and geographic distance in

km). Tests were performed using the Isolation by Distance Web Service (IBDWS) (Jensen *et al.* 2005).

RESULTS

***cox2-3* intra-specific variation**

A total of six *cox2-3* spacer haplotypes were observed among 65 individuals sequenced (aligned length of 376 bp) (Table 1, Fig. 2). Divergence among haplotypes were low (≤ 2.4). All locations had only one haplotype, except location D, that had two haplotypes (Sp3 and Sp4, Fig. 2). Haplotype Sp1 was the most abundant, with 32 individuals, occurring in most locations in southern and southeastern Brazil: found in sites A, B, C, F, I and J (Table 1). The six haplotypes differed by 12 variable positions (Table S2). The haplotype network (Fig. 2) showed haplotype Sp1 as the ancestor occurring in most locations in southern and southeastern Brazil. This haplotype was closely related to haplotypes Sp3 and Sp5, from locations D and G, respectively (Fig. 2). Haplotypes Sp2, Sp4 and Sp6 were more divergent from Sp1 (from locations H, D and E, respectively) and were found in both south and southeast regions (Figs 1, 2, Table S1). Genetic and geographical distances among the *cox2-3* spacer haplotypes, were not significantly correlated based on the Mantel test ($r=0.012$, $p=0.514$).

***cox1* intra-specific variation**

A total of eight *cox1* haplotypes were observed among the 30 individuals sequenced (aligned length of 664 bp) (Table 2, Fig. 3). Haplotypes had low

divergence ($\leq 2.4\%$). All locations had only one haplotype. Haplotype Sp1 occurred in locations B and I, while haplotype Sp5 was found in locations C and D. All remaining haplotypes were found in one location only (Table 2, Fig. 3). The eight haplotypes differed by 25 variable positions (Table S3).

The haplotype network (Fig. 3) revealed a relatively complex structure. Haplotype Sp1 was found in two distant locations of southern and southeastern Brazil (B and I) (Figs 1, 3). Haplotypes Sp1 and Sp3 were closely connected, one mutation step, but geographically distant (Figs 1, 3, Table S2). The remaining haplotypes had no evident pattern of sequence similarity with geographic (non-significant IBD Mantel test ($r=-0.144$, $p=0.897$)).

DISCUSSION

The present data indicate that all populations of *S. puiggariana* represent a single species, based on the relatively low divergence values for both mitochondrial markers corroborating previous findings (Rossignolo & Necchi 2016).

Interestingly, haplotypes revealed no correlation of geographic distribution with genetic variation, with geographically distant locations revealing low divergences, in agreement with the phylogeographic pattern described for several species of Batrachospermales: *Batrachospermum helminthosum* in North America (Chiasson *et al.* 2003), *Batrachospermum gelatinosum* in North America (House *et al.* 2010) and Europe (Keil *et al.* 2015) and *Sirodotia delicatula* in Brazil (Paiano & Necchi 2013). The same haplotype has been found in several distant locations, similar to the existence of the same haplotype in geographically distant locations in this

study. In contrast, our results differ from the pattern described for *B. macrosporum* (Vis *et al.* 2008) from North and South America and *Sheathia arcuata* worldwide (Vis *et al.* 2010), with a more restricted geographic distribution of haplotypes found in this study.

We found very similar values of haplotypes divergences and variable positions among the haplotypes for the two markers analyzed (Table S4). The divergence among the Brazilian haplotypes for both markers were relatively low considering the geographic range sampled (maximum distance ~ 1,000 km) as compared to previous studies at similar or broader geographic scales (> 2,500 km) (Table S5): up to 6.5% for *B. helminthosum* in North America (Chiasson *et al.* 2003), up to 13.1% for *B. macrosporum* in South America (Vis *et al.* 2008), up to 6.2% for *S. arcuata* in North America and 14.8% in European (Bulgarian) locations (Vis *et al.* 2010).

Based on other studies of species of Batrachospermales, there is considerable intraspecific genetic diversity both in the *cox2-3* spacer and the *cox1* barcode regions among individuals of distinct locations, where several haplotypes (5-15) are typically found (Vis *et al.* 2008; Keil *et al.* 2015). However, little variation is usually observed within a location (typically one, rarely two haplotypes per stream segment) (Table S5). The present data for *S. puiggariana* followed a similar pattern, with most populations having only one haplotype. In contrast, we found no evidence of higher genetic divergences with increased geographic distance among haplotypes, which has been reported in members of the Batrachospermales (Chiasson *et al.* 2003; House *et al.* 2008, 2010; Vis *et al.* 2008, 2010). The lack of relationship between genetic divergence and a higher

geographic distance that has been reported for some Batrachospermales has been attributed to the fact that colonization of a site might be a rare event, with subsequent proliferation playing a major role in the presence of a population in a stream segment (Vis *et al.* 2008). However, information on dispersal in river macroalgae is still scarce and lacks experimental studies (Vis 2016), which greatly limits the interpretations of the phylogeographic data.

The known geographic distribution in South America, limited to three morpho-climatic domains (Ab'Saber 1977) or biogeographic provinces (Cabrera & Willink 1973): tropical Atlantic rainforest, sub-tropical rainforest (with *Araucaria*) and "cerrado" (Brazilian savannah), suggests that the species phylogeographic structure is presumably related to geological processes determining the evolutionary history of the continent. However, it is difficult to draw generalizations about phylogeographic patterns of Batrachospermales in South America with only four examples (Vis *et al.* 2008; Paiano & Necchi 2013; Paiano & Necchi, 2017; this study). Therefore, further research is highly recommended with an emphasis on species with a distinct geographical distribution to shed some light to the biogeographical knowledge of batrachospermalean red algae from South America.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was provided by grants 2012/12016-6 (FAPESP) and 306047/2013-6, 487566/2012-2 (CNPq) to ONJ, and for the scholarship 2013/06436-5 (FAPESP) to MOP.

REFERENCES

- AB'SABER A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia* 53: 1-23.
- CABRERA A.L. & WILLINK A. 1973. *Biogeografia de America Latina*. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, Washington.
- CHIASSE W.B., MACHESKY N.J. & VIS M. L. 2003. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta) in North America. *Phycologia* 42: 654-660.
- CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- DARRIBA D., TABOADA G.L., DOALLO R. & POSADA D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- DINIZ-FILHO J.A.F., SOARES T.N., LIMA J.S., DOBROVOLSKI R., LANDEIRO V.L., TELLES M.P.C., RANGEL T.F. & BINI L.M. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology* 36: 475-485.
- ENTWISLE T.J. 1992. The setaceous species of *Batrachospermum* (Rhodophyta): a re- evaluation of *B. atrum* (Hudson) Harvey and *B. puiggarianum* Grunow including the description of *B. dyatyches* sp. nov. from Tasmania, Australia. *Muelleria* 7: 425–445.
- ENTWISLE T.J., VIS M.L., CHIASSE W.B., NECCHI O. JR. & SHERWOOD A.R. 2009. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. *Journal of Phycology* 45: 704-715.
- ENTWISLE T. J., JOHNSTON E. T., LAM D. L. & VIS M.L. 2016. *Nocturama* gen. nov, *Nothocladus* sensu lato and other taxonomic novelties resulting from the

- further resolution of paraphyly in Australasian members of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 52: 384-396.
- HOUSE D. L., SHERWOOD A. R. & VIS M. L. 2008. Comparison of three organelle markers for phylogeographic inference in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North America. *Phycological Research* 56: 69-75.
- HOUSE D.L., VANDENBROEK A.M. & VIS M.L. 2010. Intraspecific genetic variation of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in eastern North America. *Phycologia* 49: 501–507.
- HUELSENBECK J. P. & RONQUIST F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755
- JENSEN J.L., BOHONAK A.J. & KELLEY S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 6-13.
- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., STONES-HAVAS S., CHEUNG M., STURROCK S., BUXTON S., COOPER A., MARKOWITZ S., DURAN C., THIERER T., ASHTON B., MEINTJES P. & DRUMMOND A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.
- KEIL E.J., MACY T.T., KWANDRANS J., ELORANTA P., TOMA'S P., ABOAL M. & VIS M.L. 2015. Phylogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) shows post glacial expansion in Europe. *Phycologia* 54: 176–182.
- KUMANO S. 2002. *Freshwater red algae of the world*. Biopress Ltd., Bristol, 375 pp.

- NECCHI O. JR. 1990. Revision of the genus *Batrachospermum* Roth (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil. *Bibliotheca Phycologica* 84. J. Cramer, Berlin. 201 pp.
- PAIANO M.O. & NECCHI O. JR. 2013. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. *Phycological Research* 61:248-255.
- ROSSIGNOLO N.L. & NECCHI O. JR. 2016. Revision of section Setacea of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) with emphasis on specimens from Brazil. *Phycologia* 55: 337-346.
- SALOMAKI E., KWANDRANS J., ELORANTA P. & VIS M. 2014. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. *Journal of Phycology* 50 (3): 526-542.
- SAUNDERS G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1879–1888.
- SILVESTRO D. & MICHALAK I. 2011. RaxMLGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12: 335-337.
- SOKAL R.R. 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Systematic Zoology* 28: 227-232.
- SWOFFORD D.L. 2003. PAUP, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 280 pp.
- VIS M. L. 2016. Biogeography of River Algae. In: *River Algae*. (Ed. by O. Necchi Jr.), pp. 219-243. Springer International Publishing, Cham.

- VIS M. L., CHIASSE W. B. & SHEATH R. G. 2005. Phylogenetic relationships of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. *Phycologia* 44: 441-446.
- VIS M. L. & ENTWISLE T. J. 2000. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. *Journal of Phycology* 36: 1175-1182.
- VIS M.L., FENG J., CHIASSE W.B., XIE S.L., STANCHEVA R., ENTWISLE T.J., CHOU J.Y. & WANG W.L. 2010. Investigation of the molecular and morphological variability in *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from geographically distant locations. *Phycologia* 49: 545-553.
- VIS M.L., HODGE J.C. & NECCHI O. JR. 2008. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. *Journal of Phycology* 44: 882-888
- VIS M.L., SAUNDERS G.W., SHEATH R.G., DUNSE K. & ENTWISLE T.J. 1998. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences. *Journal of Phycology* 34: 341-350.
- ZUCCARELLO G.C., BURGER G., WEST J.A. & KING R.J. 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

SUPPORTING INFORMATION

Table 1. Locality, number of individuals (*n*) and frequency of each haplotype for *cox2-3* spacer region of *Setacea puiggariana* in Brazil.

Localities	n	Haplotypes					
		Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
A	10	10					
B	03	03					
C	03	03					
D	10			01	09		
E	03						03
F	03	03					
G	10					10	
H	10		10				
I	03	03					
J	10	10					
Total	65	32	10	01	09	10	03

Table 2. Locality, number of individuals (*n*) and frequency of each haplotype for *cox1* spacer region of *Setacea puiggariana* in Brazil.

Localities	Haplotypes								
	n	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8
A	03						03		
B	03	03							
C	03					03			
D	03					03			
E	03							03	
F	03		03						
G	03				03				
H	03			03					
I	03	03							
J	03								03
Total	30	06	03	03	03	06	03	03	03

Figure legends

Fig. 1. Map showing sampling locations for *Setacea puiggariana* in Brazil. Site descriptions and location codes as in Table S1. Locations with more than one haplotype are indicated by pie charts.

Fig. 2. Haplotype network of *cox2-3* spacer for *Setacea puiggariana* populations from Brazil. A single line indicates one base pair difference; open circles indicate missing intermediates; numbers within circles indicate number of intermediates; N = number of identical individuals; location codes as in Table S1; haplotype designations as in Table 1.

Fig. 3. Haplotype network of *cox1* barcode region for *Setacea puiggariana* populations from Brazil. A single line indicates one base pair difference; open circles indicate missing intermediates; numbers within circles indicate number of intermediates; N = number of identical individuals; location codes as in Supporting Information Table S1; haplotype designations as in Table 2.

Figures

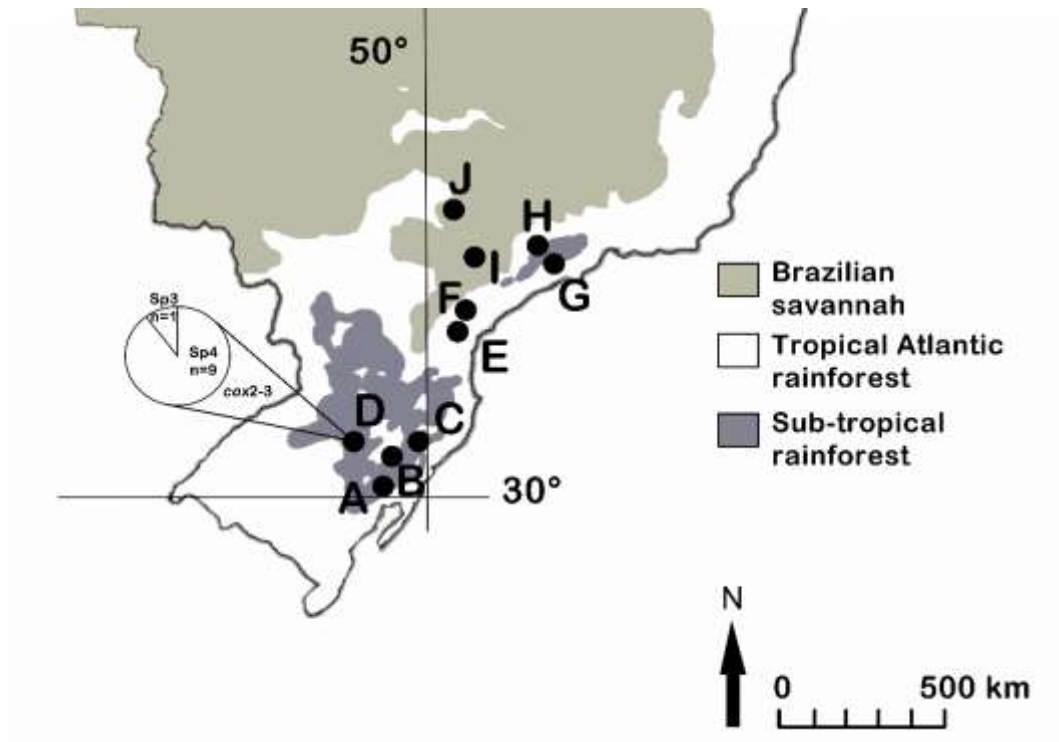


Fig. 1. Map showing sampling locations for *Setacea puiggariana* in Brazil. Site descriptions and location codes as in Table S1. Locations with more than one haplotype are indicated by pie charts.

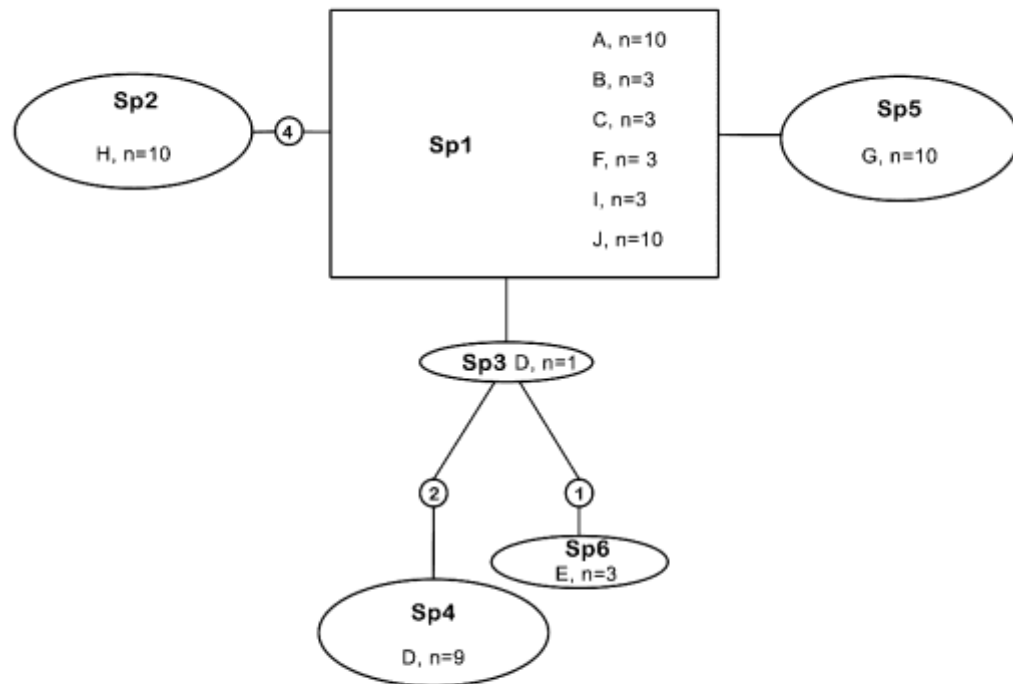


Fig. 2. Haplotype network of *cox2-3* spacer for *Setacea puiggariana* populations from Brazil. A single line indicates one base pair difference; open circles indicate missing intermediates; numbers within circles indicate number of intermediates; N - number of identical individuals; location codes as in Table S1; haplotype designations as in Table 1.

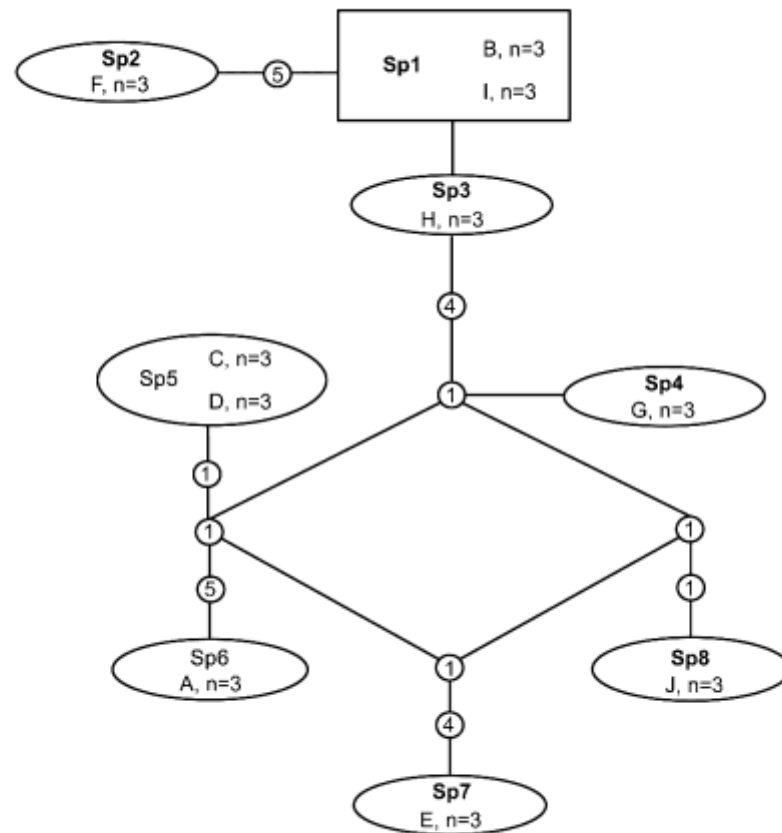


Fig. 3. Haplotype network of *cox1* barcode region for *Setacea puiggariana* populations from Brazil. A single line indicates one base pair difference; open circles indicate missing intermediates; numbers within circles indicate number of intermediates; N - number of identical individuals; location codes as in Supporting Information Table S1; haplotype designations as in Table 2.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Description of collecting sites and GenBank accession numbers for population samples of *Setacea puiggariana* from Brazil analyzed in this study.

Table S2. Haplotypes of *cox2-3* spacer for *Setacea puiggariana* defined by 12 nucleotide variable positions among 376 bp. Information for haplotype Sp1 is presented for all variable positions and for all other haplotypes only the different bases.

Table S3. Haplotypes of *cox1* barcode region for *Setacea puiggariana* defined by 25 nucleotide variable positions among 664bp. Information for haplotype Sp1 is presented for all variable positions and only the different bases for all other haplotypes.

Table S4. Comparison of variation levels within and among populations of *Setacea puiggariana* for the two markers analyzed.

Table S5. Previous reports of intraspecific sequence variation in species of Batrachospermales for the two molecular markers used in this study. All *cox1* sequences are 664 bp in length.

Table S1. Description of collecting sites, GenBank accession numbers and voucher specimens for population samples of *Setacea puiggariana* analyzed in this study.

Code	Locality, collection date, stream length sampled and voucher specimens	Haplotypes	Haplotypes
		<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
A	Rio Grande do Sul State, Cambará do Sul, Aparados da Serra National Park, River Camisas; 29°10'44"S, 50°08'13"W, 10 June 2009 (SJRP 31467); 11.0 m	Sp1, KX703036	Sp6, KX703033
B ^a	Rio Grande do Sul State, Cambará do Sul, Aparados da Serra National Park, Preá Stream; 29°09'48"S, 50°05'49"W, 31 May 2008 (SJRP 31468); 10 m	Sp1, KX703036	Sp1, KX703028
C ^a	Rio Grande do Sul State, Cambará do Sul, Arroio Baio Branco, Route RS- 020; 29°12'36"S, 50°14'22"W, 11 June 2009 (SJRP 31470); 10 m	Sp1, KX703036	Sp5, KX703032

Table S1. Continued.

Code	Locality, collection date, stream length sampled and voucher specimens	Haplotypes	Haplotypes
		<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
D	Rio Grande do Sul State, Cambará do Sul, Aparados da Serra National Park, Camarinhas Stream, 29°06'24"S, 50°07'31"W, 10 June 2009 (SJRP 31469); 25 m	Sp3, KX703038 Sp4, KX703039	Sp5, KX703032
E ^a	Paraná State, Guaraqueçaba, Rio Sebuí Ecological Reserve, Sebuí River; 25°17'26"S, 42°13'45"W; 21 September 2008 (SJRP 31466); 10 m	Sp6, KX703041	Sp7, KX703034
F ^a	São Paulo State, Apiaí, Road SP-165, 1 km from town; 24°32'24.5"S, 48°49'41"W, 08 July 2015 (SJRP 31886); 10 m	Sp1, KX703036	Sp2, KX703029
G	São Paulo State, Campos do Jordão State Park, near to the visitor center, 22°41'25" S, 45°28'47" W; 22 May 2008 (SJRP 31909); 15 m	Sp5, KX703040	Sp4, KX703031

Table S1. Continued.

Code	Locality, collection date, stream length sampled and voucher specimens	Haplotypes	Haplotypes
		<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
H	São Paulo State, Campos do Jordão, Cassununga Cascade; 22°47'10"S, 45°42'44"W, 23 May 2008 (SJRP 31472); 7 m	Sp2, KX703037	Sp3, KX703030
I ^a	São Paulo State, Jumirim, tributary of Sorocaba River; 23°05'13"S, 47°48'56"W, 13 June 2008 (SJRP 31474); 10 m	Sp1, KX703036	Sp1, KX703028
J	São Paulo State, Brotas, "Parque dos Saltos". 22°17'30" S, 48°07'51" W, 09 October 2012 (SJRP 31471); 10 m	Sp1, KX703036	Sp8, KX703035
a. N=3 individuals.			

Table S2. Haplotypes of *Setacea puiggariana* defined by 12 variable positions of nucleotides in 376 bp for *cox2-3* spacer region. Sequence for the haplotype 1 is shown for all variable positions and for the remaining haplotypes just for those which differs from haplotype Sp1.

Positions	Haplotypes					
	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
91	T			C		
241	G			A		
257	A			G		
285	A					G
314	T	A				
326	A				C	
340	C		T	T		T
341	T	C				
346	A					G
372	G	A				
374	C	G				
376	T	C				

Table S3. Haplotypes of *Setacea puiggariana* defined by 25 variable positions of nucleotides in 664 bp for *cox1* spacer region. Sequence for the haplotype 1 is shown for all variable positions and for the remaining haplotypes just for those which differ from haplotype Sp1.

Positions	Haplotypes							
	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8
26	T							C
40	T			C	C		C	C
49	T						C	
55	A							G
70	A	G						
77	T		A	A	A	A	A	A
112	T						C	
121	C						T	
123	C			A	A	A	A	A
127	C			T	T	T	T	T
157	A					T		
175	C	T			T	T	T	
187	A					G		
268	A	G			G			
466	G	T		A	A	A	A	A
469	C						T	
484	T			C	C	C	C	C
517	A	G			G			
526	G						A	
554	T	G						
586	T						C	C
590	A			C				

Table S3. Continued.

Positions	Haplotypes							
	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8
643	A					T		
652	C					T		
664	T					C		

Table S4. Comparison of variation levels within and among populations of *Setacea puiggariana* for the two markers analyzed.

	<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
Characteristics		
Number of haplotypes	6	8
Intra-population variation (%)	0.8	0
Inter-population variation (%)	0.3 – 2.4	0.2 – 2.4
Variable Positions (%)	3.2	3.6

Table S5: Previous reports of intraspecific sequence variation in species of Batrachospermales for the two molecular markers used in this study. All *cox1* sequences are 664 bp in length.

Species	Molecular marker	Source, length and range	Reference
<i>Batrachospermum helminthosum</i>	<i>cox2-3</i>	USA, 13 localities, 234 specimens, 370-371 bp, 0.3-6.5%	Chiasson <i>et al.</i> (2003)
<i>Sirodotia delicatula</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, 3 localities, 18 specimens, 376 bp, 0%	Necchi & Vis (2005)
<i>Batrachospermum macrosporum</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, French Guiana and USA, 11 localities, 149 specimens, 334-348 bp, 0-11.9%	Vis <i>et al.</i> (2008)
<i>Batrachospermum arcuatum</i>	<i>cox2-3</i>	Bulgaria, China, Hawaii, New Zealand, Taiwan, USA, 16 localities, 107 specimens, 374-395 bp, 0-14.8%	Vis <i>et al.</i> (2010)
<i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, 9 localities, 87 specimens, 376 bp, 0.3-2.4%	Paiano & Necchi (unpublish data)

Table S5. Continued.

Species	Molecular marker	Source, length and range	Reference
<i>Sirodotia suecica</i>	cox2-3	Australia, Finland, New Zealand, South Africa, USA, 13 specimens, 378 bp, 0-4.8%	Lam <i>et al.</i> (2012)
<i>Sirodotia delicatula</i>	cox2-3	Brazil, 10 localities, 86 specimens, 376 bp, 0.3-1.1%	Paiano & Necchi (2013)
<i>Setacea puiggariana</i>	cox2-3	Brazil, 10 localities, 65 specimens, 376 bp, 0.3-2.4%	This study
<i>B. helminthosum</i>	cox1	USA, 15 localities, 85 specimens, 0-6.6%	House <i>et al.</i> (2008)
<i>B. gelatinosum</i>	cox1	USA and Canada, 16localities, 193 specimens, 0-0.6%	House <i>et al.</i> (2010)
<i>B. viride-brasiliense</i>	cox1	Brazil, 9 localities, 43 specimens, 0.6-1.8%	Paiano & Necchi (unpublish data)
<i>S. delicatula</i>	cox1	Brazil, 7 localities, 42 specimens, 0.2-0.4%	Paiano & Necchi (2013)

Table S5. Continued.

Species	Molecular marker	Source, length and range	Reference
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	Belgium, Estonia, Finland, France, Great Britain, Italy, Latvia, Lithuania, Poland, Spain, 10 localities, 71 specimens, 0.2-1.2%	Keil <i>et al.</i> (2015)
<i>S. puiggarianna</i>	<i>cox1</i>	Brazil, 10 localities, 30 specimens, 0.2-2.4%	This study

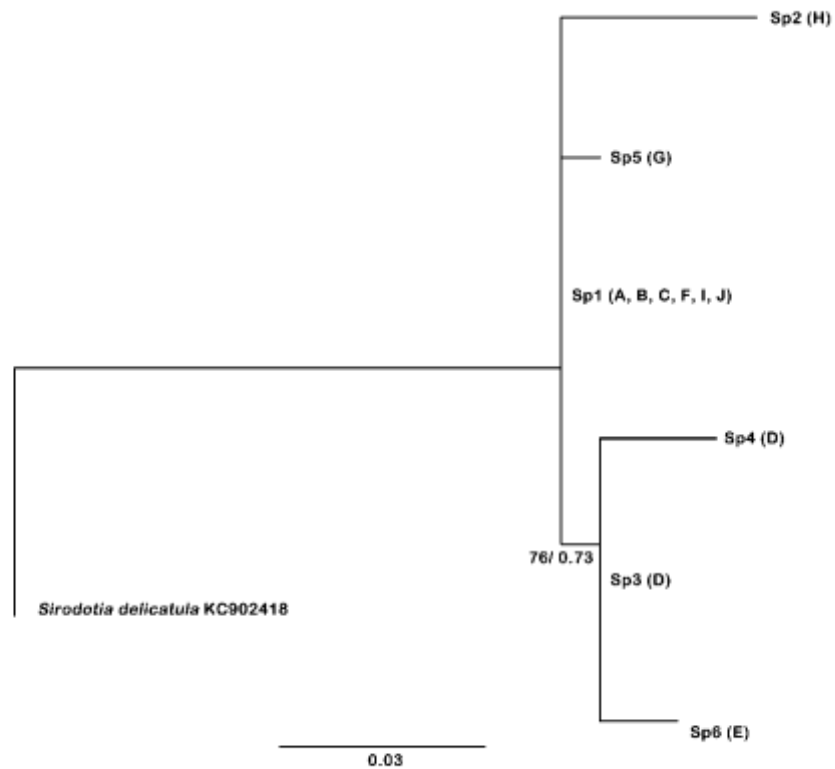


Fig. S1. Tree from maximum likelihood analysis of *cox2-3* spacer sequence data showing the relationship among *S. puiggariana* haplotypes and using *Sirodotia delicatula* (GenBank accession number KC902418) as outgroup. Location codes and haplotype designations as in Supporting Information Table S1. The numbers associated with the nodes indicate the bootstrap and posterior probability values, respectively; nodes without values indicate support < 70%.

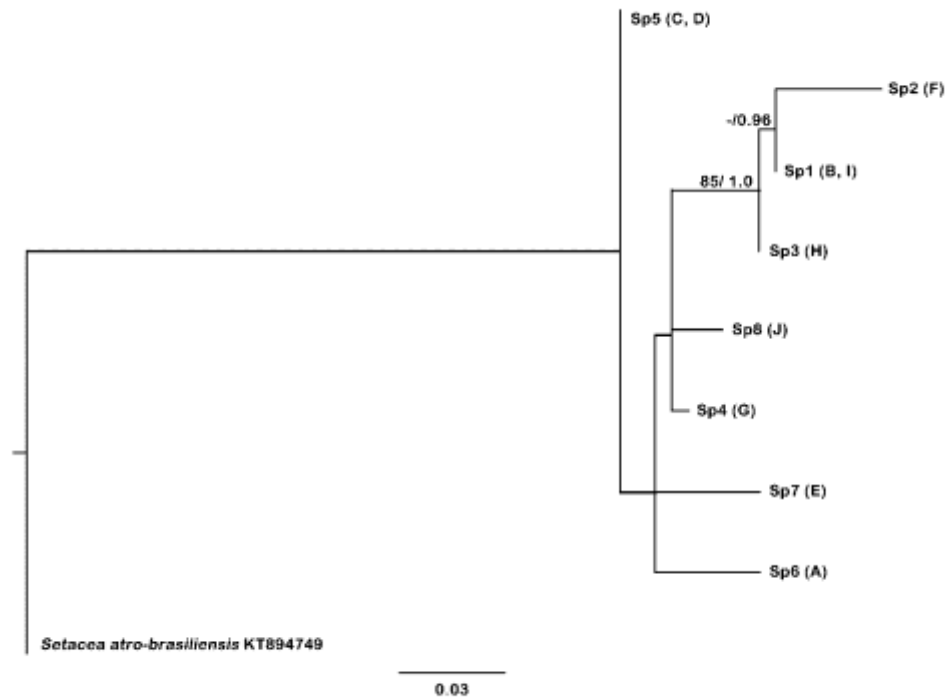


Fig. S2. Tree from maximum likelihood analysis of *cox1* barcode region sequence data showing the relationship among *S. puiggariana* haplotypes and using *S. atro-brasiliensis* (GenBank accession number KT894749) as outgroup. Location codes and haplotype designations as in Supporting Information Table S1. The numbers associated with the nodes indicate the bootstrap and posterior probability values, respectively; nodes without values indicate support < 70%.

CAPÍTULO 4

FILOGEOGRAFIA DO GÊNERO *Sirodotia* (RHODOPHYTA, BATRACHOSPERMALES) NO BRASIL

Resumo

A filogeografia de *Sirodotia*, uma das rodófitas continentais de mais ampla distribuição no Brasil, foi investigada com base em dois marcadores mitocondriais: a região espaçadora *cox2-3* e a região de “barcode” *cox1*. Um total de 160 indivíduos de 16 localidades foram analisados, revelando 11 haplótipos de *cox2-3*, dos quais seis são pertencentes a espécie *Sirodotia delicatula*, e os haplótipos restantes representam três espécies crípticas distintas. Nove haplótipos de *cox1* foram encontrados num total de 66 indivíduos, sendo cinco de *S. delicatula* e os demais pertencendo às outras três espécies. No entanto, não detectamos qualquer variação morfológica que permitisse distinguir essas espécies. De forma geral, o marcador *cox2-3* apresentou níveis de divergência intraespecífica e número de posições variáveis mais elevadas em relação a *cox1*. A maioria das localidades apresentou somente um haplótipo por população para ambos marcadores, com apenas duas das populações com dois haplótipos de *cox2-3* e de *cox1*. Os padrões distribuição encontrados para os dois grupos distintos, *S. delicatula* e *Sirodotia* spp., e suas respectivas variações sugerem que as espécies crípticas, localizadas nas regiões centro-oeste e norte do Brasil, tratam-se de espécies endêmicas, como já observado para outras espécies de Batrachospermales no país. Uma amostragem mais ampla é sugerida para essa

região para que se possa tentar preencher o “gap” genético e geográfico encontrado para *Sirodotia*, para melhor compreensão dos padrões filogeográficos para espécies de rodófitas continentais.

Palavras-chave: *cox1*. *cox2-3*. Divergência genética. Endemismo. Espécies crípticas. Variação intraespecífica.

INTRODUÇÃO

Sirodotia Skuja é um gênero de rodófitas continental, amplamente distribuído no mundo todo (LAM *et al.*, 2012). De morfologia similar aos gêneros *Batrachospermum* e *Kumanoa*, se diferencia por apresentar duas características reprodutivas distintas: seu gametófito com base carpogonial assimétrica (com uma protuberância), e carposporófitos com filamentos gonimoblásticos indeterminados que se estendem sobre os filamentos rizoidais (NECCHI *et al.*, 1993; 2007; KUMANO, 2002; LAM *et al.*, 2012). As espécies têm sido delimitadas com base em alguns caracteres, como morfologia vegetativa do gametófito, presença de espermatângios em ramos especializados, posição do ramo carpogonial, origem dos filamentos gonimoblásticos em relação ao carpogônio e tamanho do carpogônio (NECCHI *et al.*, 1993; KUMANO, 2002; NECCHI *et al.*, 2007). Kumano (2002) em sua revisão das rodófitas continentais mundiais reconheceu oito espécies, sendo cinco delas conhecidas somente de suas localidades-tipo e arredores. Atualmente, nove espécies são aceitas em *Sirodotia* (GUIRY e GUIRY, 2016), mas somente *S. suecica* Kylin, *S. huillensis* (Welwitsch ex West & G. S. West) Skuja e *S. delicatula* Skuja são registradas com ampla distribuição (KUMANO, 2002; NECCHI *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2012).

Estudos moleculares anteriores de *Sirodotia* têm fornecido compreensão sobre a taxonomia infragenérica. Vis e Sheath (1999) analisaram as espécies *S. suecica*, *S. tenuissima* e *S. huillensis* da América do Norte e concluíram que *S. tenuissima* é sinônima de *S. suecica*, enquanto *S. tenuissima* é uma espécie distinta. Necchi *et al.* (2007) realizaram um estudo com base em sequências de

dois marcadores (*rbcL* e *SSU*) e observaram que *S. delicatula* também é uma espécie distinta, com a inclusão de um espécime da Costa Rica incorretamente identificado como *S. huillensis*.

Nas últimas décadas, alguns marcadores moleculares têm se mostrado de extrema utilidade em estudos filogeográficos, com destaque para os mitocondriais *cox2-3* (região espaçadora entre os genes que codificam as subunidades 2-3 da citocromo *c* oxidase) e *cox1* (região de barcode do gene que codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) (CHIASSON *et al.*, 2003; PAIANO & NECCHI, 2013). House *et al.* (2008) investigaram a filogeografia de *Batrachospermum helminthosum* na América do Norte baseada nestes três marcadores, e observaram que as sequências da região espaçadora *cox2-3* são comparáveis às sequências da região de barcode *cox1* para este tipo de abordagem, e que sequências de UPA são mais apropriadas para estudos de variação interespecífica. Lam *et al.* (2012) investigaram a filogeografia de 13 espécimes de *S. suecica*, baseados em dados da região espaçadora *cox2-3*, e encontraram uma baixa variação, apesar da ampla distribuição geográfica (Austrália, Finlândia, Nova Zelândia, África do Sul e E.U.A.). Membros de Batrachospermales têm revelado tendências filogeográficas distintas, permitindo maior compreensão da distribuição das linhagens para as espécies (CHIASSON *et al.*, 2003; HOUSE *et al.*, 2008; 2010; VIS *et al.*, 2008; 2010).

Sirodotia delicatula Skuja é uma das rodófitas continentais mais amplamente distribuídas no Brasil, com registros que vão do Sul ao Norte do país (04°08'-30°45'S) (NECCHI, 1991; NECCHI *et al.*, 1999), ocorrendo em áreas de Cerrado e Floresta Ombrófila Densa (Amazônica e Atlântica), conforme a

definição de domínios morfoclimáticos e províncias biogeográficas propostas para a América do Sul (CABRERA & WILLINK, 1973; AB'SABER, 1977). Baseado no amplo número de populações amostradas, o presente estudo foi conduzido para elucidar os padrões de variação genética inter e intrapopulacional ao longo da distribuição geográfica de populações de *Sirodotia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes identificados como *S. delicatula* foram obtidos a partir de 16 localidades (trechos com extensão variando entre 7 – 17 m), distribuídas desde a região sudeste até a norte do território brasileiro (Tabela 1, Figura 1). Em geral, 15 indivíduos foram coletados em cada localidade, os quais foram acondicionados e rotulados separadamente, sendo parte preservada em sílica-gel para as análises moleculares, parte preservada em formaldeído 4% para análises morfológicas. Observações morfológicas e identificação taxonômica foram feitas para os espécimes de cada população logo após coleta, baseando-se nos atuais caracteres diagnósticos (NECCHI, 1991; NECCHI *et al.*, 1993; 2007; KUMANO 2002; LAM *et al.* 2012). Espécimes-testemunho estão depositados no herbário institucional local (Tabela 1).

Para as análises moleculares, os indivíduos preservados em sílica gel foram macerados em nitrogênio líquido ou utilizando homogeneizador de tecidos 'Precellys™ 24' (Bertin Technologies, Montigny-Le Bretonneux, França). Para cada localidade, 10 indivíduos foram selecionados aleatoriamente; quando as extrações não geraram produtos de PCR ou uma variação genética elevada foi

encontrada, os cinco indivíduos restantes também eram analisados. Os indivíduos foram sequenciados inicialmente para a região espaçadora *cox2-3* e posteriormente três indivíduos de cada haplótipo foram sequenciados para a região de barcode *cox1*.

As extrações de DNA foram feitas utilizando-se dos kits DNeasy™ Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ou NucleoSpin™ Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), de acordo com os protocolos dos fabricantes. Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram feitas com TopTaq Master Mix (Qiagen) e Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA), com volume final de 25 µL, contendo 50 pmol de DNA genômico e 5 pmol de cada “primer” (iniciador). Foram utilizadas as amostras com melhor rendimento, com base nas bandas mais fortes no gel de eletroforese.

Para a região de barcode *cox1*, foram usados os iniciadores GazF1 e GazR1, seguindo os termociclos de Saunders (2005); e para a região espaçadora *cox2-3* o par de iniciadores utilizados foi *cox2F* e *cox3R*, e os termociclos de Zuccarello *et al.* (1999) foram usados. Os produtos de PCR foram purificados com os kits ‘Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up’ (Macherey-Nagel) ou “GFX™ PCR” (GE Healthcare), de acordo com os protocolos dos fabricantes. Posteriormente os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa “Genomic Engenharia Molecular” (<http://www.genomic.com.br>) em sequenciador automático ABI PRISM™ 3100 e Kit ABI PRISM Big Dye Terminatorv. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de sequenciamento foram conduzidas utilizando-se os mesmos iniciadores usados nas reações de PCR.

As sequências finais foram alinhadas e a variação genética calculada utilizando o software Geneious versão 7 (KEARSE *et al.*, 2012). A relação entre os haplótipos de *cox1* e de *cox2-3* foram inferidas por uma rede de parcimônia estatística com o uso do software TCS versão 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) utilizando um limite de conexão de 95%. Árvores foram construídas para as sequências de *cox1* e *cox2-3* através do ‘Phylogenetic Analysis Using Parsimony’ (PAUP 4.0b8; SWOFFORD, 2003) usando o “plug-in” do Geneious. As análises foram rodadas com o uso do modelo de evolução GTR+G+I, determinado pelo Akaike Information Criterion pelo software jModelTest 2.1.4 (DARRIBA, *et al.*, 2012). Análises de Máxima Verossimilhança (ML) e valores de bootstrap de 1000 réplicas foram inferidos usando o programa RAxMLGUI versão 1.2 (SILVESTRO & MICHALAK, 2011). Análise Bayesiana (BA) foi realizada no software MrBayes 3.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2011) com três corridas de cinco cadeias de Metropolis acopladas à cadeia de Markov Monte Carlo para 10×10^6 gerações. Associações dos haplótipos de *cox1* e *cox 2-3* com suas respectivas distâncias geográficas foram testadas pelo Teste de Mantel (SOKAL 1979; DINIZ-FILHO *et al.*, 2013) baseados em duas matrizes de dados (diferenças genéticas em pares de base e distância geográfica em km). Os testes foram realizados com o uso de ‘Isolation by Distance Web Service’ (IBDWS) (JENSEN *et al.*, 2005).

RESULTADOS

As análises evidenciaram uma alta variação genética entre alguns haplótipos, tanto para as sequências de *cox2-3*, quanto para as de *cox1*., embora

não tenham sido observadas diferenças morfológicas associadas a tal divergência. Dessa forma, deste ponto em diante, os dados serão tratados como dois grupos distintos: *S. delicatula* para o grupo de haplótipos com baixa variação, e *Sirodotia* spp., para os haplótipos com a variação bem mais elevada.

Variação intraespecífica de *cox2-3*

Um total de seis haplótipos foi observado entre os 100 indivíduos sequenciados de *S. delicatula*, com sequências de 376 pb de comprimento. (Tabela 2, Figura 2). A divergência entre os haplótipos foi baixa, variando de 0,3 até 2,2% entre as populações. Apenas a localidade H apresentou dois haplótipos (Sd1 e Sd3), que variaram em 0,6% entre si. Todas as outras localidades apresentaram somente um haplótipo. O haplótipo Sd1 ocorreu em sete das 16 localidades amostradas, sendo o mais frequente e o mais abundante com 49 indivíduos (Tabela 2). Os seis haplótipos diferiram em oito posições variáveis entre si (2,1 % - Tabela 4).

Um total de cinco haplótipos foi observado entre os 60 indivíduos sequenciados de *Sirodotia* spp, todos com 376 pb de comprimento (Tabela 3, Figura 3). A divergência entre os haplótipos foi alta, variando de 0,3 até 7,0% entre as populações. A localidade P apresentou dois haplótipos (Ssp4 e Ssp5), que divergiram em 0,3%, enquanto todas as outras localidades apresentaram somente um haplótipo. O haplótipo Ssp1 ocorreu em duas localidades (L e N), sendo o mais frequente e abundante, com 20 indivíduos (Tabela 3). Os haplótipos diferiram em 33 posições variáveis entre si (8,8%, Tabela 5).

A rede de haplótipos para *S. delicatula* (Figuras 2) mostrou o haplótipo Sd1 (localidades A-C, E-H) como provável ancestral (conforme determinado pelo TCS), com os haplótipos Sd2 (localidade D) e Sd6 (localidade K) variando em um e quatro pb, respectivamente; e os haplótipos Sd3-Sd5 (localidades H-J) formando um grupo mais proximamente relacionado tanto genética como geograficamente (Figuras 2 - 6). As diferenças genéticas da região espaçadora *cox2-3* apresentaram correlação significativa com as distâncias geográficas, com valores do teste de Mantel de $r=0.309$, $p=0.018$.

A rede de haplótipos de *Sirodotia* spp. (Figura 3) mostrou duas localidades geograficamente distantes (L e N) apresentando o haplótipo Ssp1, definido como provável ancestral, e próximo genética e geograficamente ao haplótipo Ssp2 (localidade M). O haplótipo Ssp3 (localidade O), apesar de próximo geograficamente dos haplótipos Ssp1 e Ssp2, se mostrou geneticamente distante dos demais, assim como os haplótipos Ssp4 e Ssp5 (localidade P). Não houve correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, conforme os valores para o teste de Mantel $r=0.186$, $p=0.617$.

Variação intraespecífica de *cox1*

Um total de cinco haplótipos foi observado entre os 42 indivíduos sequenciados de *S. delicatula*, com sequências de 664 pb de comprimento (Tabela 6, Figura 4). A divergência entre os haplótipos foi consideravelmente baixa, de 0,2 a 0,4 % entre as populações. As localidades C e E apresentaram dois

haplótipos cada (Sd1 e Sd2, Sd1 e Sd3, respectivamente), enquanto todas as outras localidades apresentaram somente um haplótipo. O haplótipo Sd5 foi encontrado nas localidades H e I, e o haplótipo Sd1 em quatro localidades (A, C, E e J), sendo o mais frequente e abundante, com 15 indivíduos (Tabela 6). Os cinco haplótipos de *cox1* tiveram apenas quatro posições variáveis (0,6%, Tabela 8). Não foi possível a amplificação para a região de barcode *cox1* de indivíduos das localidades B, F, G e K.

Um total de quatro haplótipos foi observado entre os 24 indivíduos sequenciados de *Sirodotia* spp. (Tabela 7, Figura 5). A divergência entre os haplótipos foi alta, de 0,2 até 6,2%. Os haplótipos Ssp1 e Ssp2 (localidades L e M) foram os mais similares, divergindo em apenas uma posição. Todas as localidades apresentaram somente um haplótipo. Os haplótipos diferiram em 48 posições variáveis entre si (7,2% - Tabela 9). Não foi possível a amplificação de indivíduos das populações O e P.

A rede de haplótipos (Figura 4) apresentou Sd1 sendo como o provável ancestral de *S. delicatula*, com os demais haplótipos divergentes em apenas 1 pb, mesmo mais distantes geograficamente. Não houve correlação entre as distâncias genéticas e geográficas (correlação de Mantel $r=0.075$, $p=0.666$).

A rede de haplótipos de *Sirodotia* spp. (Figuras 4 - 7) mostrou o haplótipo Ssp3 (localidade N) como provável ancestral. O haplótipo Ssp2 (localidade L) conectou-se somente ao ancestral, e os haplótipos Ssp1 e Ssp4 foram distantes genética e geograficamente do ancestral e entre si. As diferenças genéticas não apresentaram correlação com as distâncias geográficas pelo teste de Mantel ($r=0.208$, $p=0.911$).

DISCUSSÃO

Os dados obtidos mostraram claramente a existência de quatro espécies para as populações estudadas de *Sirodotia* no Brasil: *S. delicatula*, com níveis de divergência relativamente baixos entre os haplótipos; e mais três espécies crípticas, com alta divergência, tratadas aqui como *Sirodotia* spp.. As três espécies crípticas estão representadas pelos seguintes haplótipos de *cox1*: 1) Ssp1; 2) Ssp4; 3) Ssp2 e Ssp3; com variação intra-específica de 0,2% e inter-específica de 2,6-6,2%. Para os haplótipos de *cox2-3*, as espécies crípticas são representadas por: 1) Ssp1 e Ssp2; 2) Ssp3; 3) Ssp4 e Ssp5; com variação intra-específica de 0,3% e inter-específica de 4,0-6,9%. O estudo de Paiano & Necchi (2013) já havia sugerido a existência de duas espécies crípticas baseadas em sequências dos dois marcadores deste estudo, confirmada pela análise filogenética de sequências de *rbcL*.

Os dois marcadores utilizados apontaram dois padrões de dispersão de *Sirodotia* no Brasil, evidenciando um grupo de haplótipos de *S. delicatula* mais proximamente relacionados geografica e geneticamente na região sudeste do Brasil; e outro nas regiões centro-oeste e norte do país, representando as três outras espécies. A variação relativamente baixa dos haplótipos de *S. delicatula* pode ser comparada com estudo filogeográfico de *Batrachospermum viride-brasiliense* (PAIANO & NECCHI, 2016), que apresentou níveis similares de variação para os haplótipos de *cox2-3* e *cox1* (Tabela 10). A alta variação genética encontrada para as espécies de *Sirodotia* spp. pode ser comparada a estudo realizado para *Batrachospermum macrosporum* na América do Sul (VIS *et al.*;

2008), embora a abrangência geográfica seja consideravelmente menor no presente estudo.

Os dois marcadores analisados neste estudo revelaram níveis de variação intra e interespecífica similares, com valores levemente mais altos para a região espaçadora *cox2-3*, para os dois grupos de espécies (*S. delicatula* e *Sirodotia* spp.). Em termos de posições variáveis, os haplótipos de *cox2-3* foram duas vezes maiores em relação aos haplótipos de *cox1* (oito e quatro, respectivamente) (Tabelas 4 e 6). A divergência encontrada para *S. delicatula* foi baixa para *cox2-3*, considerando a abrangência geográfica amostrada (distância máxima ~ 1.000 km), se comparada com estudos anteriores realizados em áreas geográficas maiores (> 2.500 km): até 6,5% para *B. helminthosum* na América do Norte (CHIASSON *et al.*, 2003), até 13,1% para *B. macrosporum* na América do Sul (VIS *et al.*, 2008), até 6,2% para *Sheathia arcuata* na América do Norte e 14,8% em localidades da Europa (VIS *et al.*, 2010) (Tabela 10). Para os haplótipos da região de barcode *cox1*, a variação foi mais baixa, considerando estudos anteriores. Para o complexo de espécies *Sirodotia* spp., uma das três espécies crípticas encontradas apresentou dois haplótipos, de localidades distintas (M e N), variando em 0,3% (haplótipos Ssp1 e Ssp2 para o marcador *cox2-3*) porém a distância geográfica foi bem menor quando comparada às demais (~12 km).

Os estudos com espécies de Batrachospermales realizados até o momento mostraram variação intraespecífica entre indivíduos de localidades distintas relativamente baixo, com considerável número de haplótipos encontrados, tanto para a região espaçadora *cox2-3* como para a região de barcode *cox1*, variando entre cinco e 15 haplótipos (Tabelas 11 - 12). No entanto, pequena variação é

encontrada na mesma localidade, tipicamente um raramente dois ou mais haplótipos. O presente estudo também confirma esse padrão, pois foram diagnosticados um, raramente dois haplótipos para cada localidade amostrada. Não foi encontrada correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, com indivíduos relativamente distantes geograficamente apresentando o mesmo haplótipo tanto para *S. delicatula*, quanto para *Sirodotia* spp. Estudos realizados para outras espécies de Batrachospermales apresentaram correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas (*B. viride-brasiliense*, PAIANO & NECCHI, 2016; *K. ambigua*, este trabalho), sugerindo que cada espécie possui padrão filogeográfico distinto.

A existência de três diferentes espécies encontradas nas regiões centro-oeste e norte do país, com alta divergência genética, sugere tratarem-se de espécies endêmicas. Outros táxons endêmicos de Batrachospermales também foram registrados para algumas regiões do Brasil, como é o caso de *Kumanoa amazonensis* Necchi e Vis (NECCHI & VIS, 2012) e *Batrachospermum orthostichum* Skuja (NECCHI, 1990), sugerindo que possam haver também espécies endêmicas crípticas (NECCHI, 1990; NECCHI *et al.*, 2010; VIS, 2016).

A distribuição geográfica de *Sirodotia*, apesar de ampla, é limitada a três domínios morfoclimáticos (AB'SABER, 1977), ou províncias biogeográficas (CABRERA e WILLINK, 1973) da América do Sul: Florestas Ombrófilas Densas (Atlântica e Amazônica) e Cerrado. A alta divergência indica a existência de padrões distintos para as espécies: *S. delicatula* em Floresta Ombrófila Densa (Atlântica) e Cerrado; *Sirodotia* spp. em Floresta Ombrófila Densa (Amazônica) e Cerrado. O pequeno número de estudos com enfoque filogeográfico para

Batrachospermales na América do Sul (VIS *et al.*, 2008; PAIANO & NECCHI, 2016; este estudo), dificulta uma melhor interpretação de padrões. Amostragens adicionais nas regiões de Floresta Amazônica e Cerrado são fortemente recomendadas para tentar preencher o “gap” geográfico encontrado na distribuição entre os grupos *S. delicatula* e *Sirodotia* spp., a fim de contribuir para melhor compreensão dos padrões de distribuição geográfica de espécies de Batrachospermales no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AB’SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia* 53: 1-23, 1977.
- CABRERA A.L.; WILLINK, A. Biogeografia de America Latina. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, Washington, 120 pp, 1973.
- CHIASSON, W.B.; MACHESKY, N.J.; VIS, M. L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta) in North America. *Phycologia* 42: 654-660, 2003.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1659, 2000.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772, 2012.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; SOARES, T.N.; LIMA, J.S.; DROBOVOLSKY, R.; LANDEIRO, V. L.; TELLES, M. P. C.; RANGEL, T. F.; BINI, L. M. Mantel test in population genetics. *Genet. Mol. Biol.* 36: 475-85, 2013.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 26 Setembro, 2016.

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.* 56: 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* 49: 501-507, 2010.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755, 2001.

JENSEN, J.L.; BOHONAK, A.J.; KELLEY, S.T. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 6-13, 2005.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARROWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-9, 2012.

KEIL, E.J.; MACY, T.T.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; TOMA'S, P.; ABOAL, M.; VIS, M.L. Phylogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) shows postglacial expansion in Europe. *Phycologia* 54: 176–182, 2015.

KUMANO, S. Freshwater Red Algae of the World. Biopress Limited, Bristol, 375, 2002.

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

50, 2012.

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

NECCHI, O. JR. The Section *Sirodotia* of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermaceae) in Brazil. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 62: 17–30, 1991.

NECCHI, O. JR; SHEATH, R.G.; COLE, K.M. Distribution and systematics of the freshwater genus *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. *Journal of Phycology*, 29: 236–243, 1993.

NECCHI O. JR., BRANCO, C. C. Z., BRANCO, L. H. Z. Distribution of Rhodophyta in streams from São Paulo State, southeastern Brazil. *Arch Hydrobiol.* 147: 73–89, 1999.

NECCHI, O. JR; VIS, M.L.; OLIVEIRA, M.C.. Phylogenetic relationship of *Sirodotia* species (Batrachospermales, Rhodophyta) in North and South America. *Cryptogamie, Algologie*, 28: 117–127, 2007.

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

PAIANO, M. O.; NECCHI, O. JR. Phylogeography of the freshwater red alga *Sirodotia* (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil. *Phycol. Res.* 61: 248–255, 2013.

PAIANO, M. O.; NECCHI, O. JR. Phylogeography of the freshwater red alga *Batrachospermum viride-brasiliense* (Rhodophyta, Batrachospermales). *Phycol. Res.* 64: no prelo, 2016.

SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Phil. Trans. Roy. Soc. B360*: 1879–1888, 2005.

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

SOKAL, R. R. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* 28: 227-32, 1979.

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

VIS, M. L.; SHEATH, R. G. A molecular investigation of the systematic relationship of *Sirodotia* species (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. *Phycologia* 38: 261–6, 1999.

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

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

VIS M. L. Biogeography of River Algae. In: *River Algae*. (Ed. by O. Necchi Jr.), pp. 219-243. Springer International Publishing, Cham, 2016.

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

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Descrição dos locais de coleta para as populações de *Sirodotia* spp. analisadas neste estudo.

Espécie/Código	Localidade, data e n° herbário
<i>Sirodotia delicatula</i> – A^a	SP: Paraguaçu Paulista, Maracaí, Córrego Km 487-488 (SP-374), 22°33'08"S, 50°48'26"W; 16.xi.2007 (SJRP 32190).
<i>S. delicatula</i> – B^a	SP: Paraibuna, Pousada Alto da Serra, 23°33'48''S, 45°27'31''W; 23.ix.2006 (SJRP 32191).
<i>S. delicatula</i> – C	SP: Guapiaçu, próximo da cidade, Córrego Cavenague, 20°47'14"S, 49°13'23"W; 02.vi.2008 (SJRP 32192).
<i>S. delicatula</i> – D^b	SP: Mirassol, Rio S.J. dos Dourados, junto ao pesqueiro Aporé, 20°48'45"S, 49°34'29"W; 25.vi.2008 (SJRP 32193).
<i>S. delicatula</i> – E^c	SP: Américo de Campos, Ribeirão Águas Paradas, 20°17'41"S, 49°46'35"W; 01.vi.2009 (SJRP 32194).
<i>S. delicatula</i> – F^d	SP: São José do Rio Preto, Córrego da Lagoa, 20°49'00''S, 49°20'00''W; 27.viii.1999.
<i>S. delicatula</i> – G^d	SP: São José do Rio Preto, Córrego Talhadinho, 20°43'00''S, 49°13'00''W; 05.ix.1999.
<i>S. delicatula</i> – H^b	ES: Domingos Martins, Pedra Azul, Estrada Rota do Lagarto, 20°24'49"S, 41°02'23"W; 05.vii.2009 (SJRP 32195).

Tabela1. Continuação.

Espécie/Código	Localidade, data e n° herbário
<i>S. delicatula</i> – I	ES: Domingos Martins, Pedra Azul, Rio Jucu (Braço Norte) Rod. 165, Km 137, 20°19'15"S; 41°02'41"W, 04.vii.2009 (SJRP 32196).
<i>S. delicatula</i> – J	ES: Afonso Cláudio, Comunidade de Lajinha, próximo Rod. ES-165, 20°15'01"S, 41°03'43"W; 04.vii.2009 (SJRP 32197).
<i>S. delicatula</i> – K	MG: Santana do Riacho, Rodovia MG-10, Córrego das Três Pontinhas, 19°16'03.2"S, 43°32'50.0"W, 24.ix.2013 (SJRP 32201).
<i>Sirodotia</i> sp. - L	GO: Alto Paraíso de Goiás, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, 14°09'58"S, 47°50'39"W; 06.iv.2010 (SJRP 32198).
<i>Sirodotia</i> sp.- M	MT: Rio Rosana, BR-163, trecho entre Sinop e Sorriso, 11°57'26"S, 55°31'01"W; 27.ix.2010 (SJRP 32199).
<i>Sirodotia</i> sp.- N	MT: Baixada Morena, Rio Roquete, BR-163, sentido Santarém, 11°32'20"S, 55°31,14"W; 19.ix.2010.
<i>Sirodotia</i> sp. - O	MT: Sinop, BR-163, sentido Santarém; 11°36'04"S, 55°25'38" W; 25.ix.2010 (SJRP 32200).
<i>Sirodotia</i> sp - P^e	RR: Mucajaí, estrada paraRoxinho,02°25'51"S, 61°02'23"W, 05.vii.2013 (SJRP 32139).
a. N=5 indivíduos; b. N=11 indivíduos; c. N=14 indivíduos; d. N=7 indivíduos; e. N=20 indivíduos	

Tabela 2. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipo para a região espaçadora *cox2-3* de *S. delicatula*.

Localidades	n	Haplótipos					
		Sd1	Sd2	Sd3	Sd4	Sd5	Sd6
A	05	05					
B	05	05					
C	10	10					
D	11		11				
E	14	14					
F	07	07					
G	07	07					
H	11	1		10			
I	10					10	
J	10				10		
K	10						10
Total	100	49	11	10	10	10	10

Tabela 3. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipo para a região espaçadora *cox2-3* de *Sirodotia spp.*

Localidades	n	Haplótipos				
		Spp1	Spp2	Spp3	Spp4	Spp5
L	10	10				
M	10		10			
N	10	10				
O	10			10		
P	20				10	10
Total	60	20	10	10	10	10

Tabela 4. Haplótipos de *S. delicatula* definidos por oito posições variáveis de nucleotídeos em 376 pb da região espaçadora *cox2-3*. A sequência para o haplótipo Sd1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Sd1.

Haplótipos						
Posições	Sd1	Sd2	Sd3	Sd4	Sd5	Sd6
9	T					C
45	T					A
189	T					C
269	G		C	C	C	
272	C					T
312	C		T	T	T	
350	T		G		A	
354	A	C			C	

Tabela 5. Haplótipos de *Sirodotia spp.* definidos por 33 posições variáveis de nucleotídeos em 376 pb da região espaçadora *cox2-3*. A sequência para o haplótipo Ssp1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Ssp1.

Haplótipos					
Posições	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4	Ssp5
6	C		T		
30	C			T	T
57	T		C	C	C
81	T		C		
120	T		A		
138	C		T		
150	T		C		
156	T		C		
160	T			C	C
169	C		T		
171	A		G		
185	T		C		
213	A			G	G
222	G		A	A	A
246	T		C		
248	T			C	C
250	G			A	A

Tabela 5. Continuação.

Posições	Haplótipos				
	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4	Ssp5
254	C		T		
255	T		C		
261	A		G		
267	T		C		
276	T		C		
280	T		C	C	C
299	T	G		G	
302	C			T	T
313	T		C		
327	C		T		
351	A		G	G	G
369	C		T	T	T
370	A			G	G
371	C			T	T
372	A		G	G	G
375	G		A	A	A

Tabela 6. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipo para a região espaçadora *cox1* de *S. delicatula*.

Localidades	n	Haplótipos				
		Sd1	Sd2	Sd3	Sd4	Sd5
A	02	02				
C	10	04	06			
D	05				05	
E	10	04		06		
H	05					05
I	05					05
J	05	05				
Total	42	15	06	06	05	10

Tabela 7. Localidade, número de indivíduos (n) e frequência de cada haplótipo para a região espaçadora *cox1* de *Sirodotia spp.*

Localidades	n	Haplótipos			
		Spp1	Spp2	Spp3	Spp4
L	05			05	
M	05		05		
N	05	05			
O	09				09
Total	24	05	05	05	09

Tabela 8. Haplótipos de *S. delicatula* definidos por quatro posições variáveis de nucleotídeos em 664 pb da região espaçadora *cox1*. A sequência para o haplótipo Sd1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Sd1.

Haplótipos					
Posições	Sd1	Sd2	Sd3	Sd4	Sd5
13	G				A
128	C		T		
341	G	A			
559	G			A	

Tabela 9. Haplótipos de *Sirodotia spp.* definidos por 48 posições variáveis de nucleotídeos em 664 pb da região espaçadora *cox1*. A sequência para o haplótipo Ssp1 é mostrada para todas as posições variáveis e para os outros haplótipos somente para aquelas que diferem do haplótipo Ssp1.

Posições	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4
1	C			T
43	T	C	C	
49	T	C	C	
55	A			G
58	C	T	T	T
59	T	C	C	T
73	A			G

Tabela 9. Continuação.

Posições	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4
94	C	T	T	T
101	C	T	T	C
106	C	T	T	C
116	T	C		
118	A	G	G	
121	A	G	G	
124	T	C	C	
136	A	T	T	
169	A	G	G	
178	C	T	T	
187	T			C
208	G	T	T	A
211	G	A	A	
220	C	T	T	
259	C	T	T	T
271	G	A	A	
304	T	C	C	C
322	C	G	G	
334	T	C	C	
337	A			G
340	G	A	A	

Tabela 9. Continuação.

Posições	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4
349	A	G	G	
370	C	T	T	T
388	C	T	T	
406	C	T	T	
421	C	T	T	
433	T			C
439	A	C	C	
469	C	T	T	
496	T	C	C	
523	C	T	T	
532	A			C
538	T	C	C	
541	A	G	G	
556	T	C	C	
558	T	C	C	C
580	G	A	A	A
587	C	T	T	
652	T	C	C	

Tabela 10: Estudos anteriores de variação intraespecífica em espécies de Batrachospermata para os dois marcadores moleculares utilizados neste estudo. Todas as sequências de *cox1* tem comprimento de 664 pb.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>Batrachospermum helminthosum</i>	<i>cox2-3</i>	USA, 13 localidades, 234 indivíduos (13 haplótipos), 370-371 pb, 0.3-6.5%	Chiasson <i>et al.</i> (2003)
<i>Sirodotia delicatula</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 3 localidades, 18 indivíduos (1 haplótipo), 376 pb, 0%	Necchi & Vis (2005)
<i>Batrachospermum macrosporum</i>	<i>cox2-3</i>	Brazil, Guiana Francesa e USA, 11 localidades, 149 indivíduos (16 haplótipos), 334-348 pb, 0-11.9%	Vis <i>et al.</i> (2008)
<i>Batrachospermum arcuatum</i>	<i>cox2-3</i>	Bulgária, China, Havaí, Nova Zelândia, Taiwan, USA, 16 localidades, 107 indivíduos (12 haplótipos), 374-395 pb, 0-14.8%	Vis <i>et al.</i> (2010)
<i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 9 localidades, 87 indivíduos (10 haplótipos), 376 pb, 0.3-2.4%	Paiano & Necchi (2016)
<i>Sirodotia suecica</i>	<i>cox2-3</i>	Austrália, Finlândia, Nova Zelândia, África do Sul, USA, 13 indivíduos (12 haplótipos), 378 pb, 0-4.8%	Lam <i>et al.</i> (2012)

Tabela 10. Continuação.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>Sirodotia delicatula</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 11 localidades, 100 indivíduos (11 haplótipos), 376 pb, 0.3-2.2%	Este estudo
<i>K. ambigua</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 5 localidade, 43 indivíduos (3 haplótipos), 0.6-2.4%	Este estudo
<i>Setacea puiggariana</i>	<i>cox2-3</i>	Brasil, 10 localidades, 65 indivíduos (6 haplótipos), 376 pb, 0.3-2.4%	Este estudo
<i>B. helminthosum</i>	<i>cox1</i>	USA, 15 localidades, 85 indivíduos (16 haplótipos), 0-6.6%	House <i>et al.</i> (2008)
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	USA e Canadá, 16 localidades, 193 indivíduos(7 haplótipos), 0-0.6%	House <i>et al.</i> (2010)
<i>B. viride-brasiliense</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 9 localidades, 43 indivíduos(9 haplótipos), 0.6-1.8%	Paiano & Necchi (2016)
<i>S. delicatula</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 7 localidades, 42 indivíduos (9 haplótipos), 0.2-0.4%	Este estudo
<i>B. gelatinosum</i>	<i>cox1</i>	Bélgica, Estônia, Finlândia, França, Grã-Bretanha, Itália, Letônia, Lituânia, Polônia, Espanha, 10 localidades, 71 indivíduos (12 haplótipos), 0.2-1.2%	Keil <i>et al.</i> (2015)

Tabela 10. Continuação.

Espécie	Marcador molecular	Local, comprimento e variação	Referência
<i>K. ambigua</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 5 localidades, 43 indivíduos (3 haplótipos), 1.3-2.0%	Este estudo
<i>S. puiggarianna</i>	<i>cox1</i>	Brasil, 10 localidades, 30 indivíduos (8 haplótipos), 0.2-2.4%	Este estudo

Tabela 11. Comparação da variação intra e interespecífica para os dois marcadores moleculares analisados para as populações de *S. delicatula*.

Características	<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
Número de haplótipos	6	5
Variação intrapopulacional (%)	0,6	0,2
Variação interpopulacional (%)	0,3 – 2,2	0,2 – 0,4
Posições variáveis (%)	2,1	0,6

Tabela 12. Comparação da variação intra e interespecífica para os dois marcadores moleculares analisados para as populações de *Sirodotia spp.*.

Características	<i>cox2-3</i>	<i>cox1</i>
Número de haplótipos	5	4
Variação intrapopulacional (%)	0,3	0
Variação interpopulacional (%)	0,3 – 7,0	0,2 – 6,2
Posições variáveis (%)	8,8	7,2

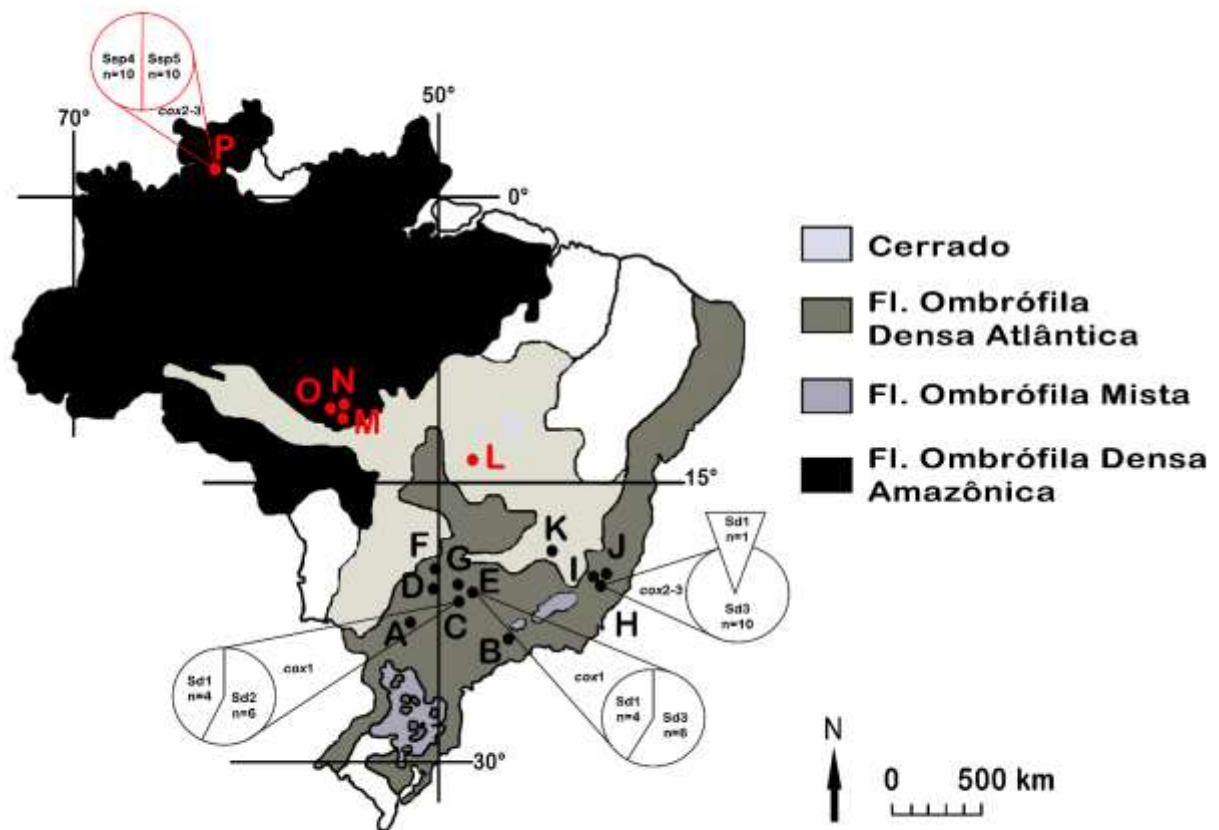


Figura 1. Mapa mostrando as localidades amostradas de *Sirodotia* spp. no Brasil. Descrições e códigos de cada localidade estão apresentados na Tabela 1. Localidades representadas em vermelho contem espécies crípticas. Localidades com mais de um haplótipo são indicadas pelos gráficos em pizza

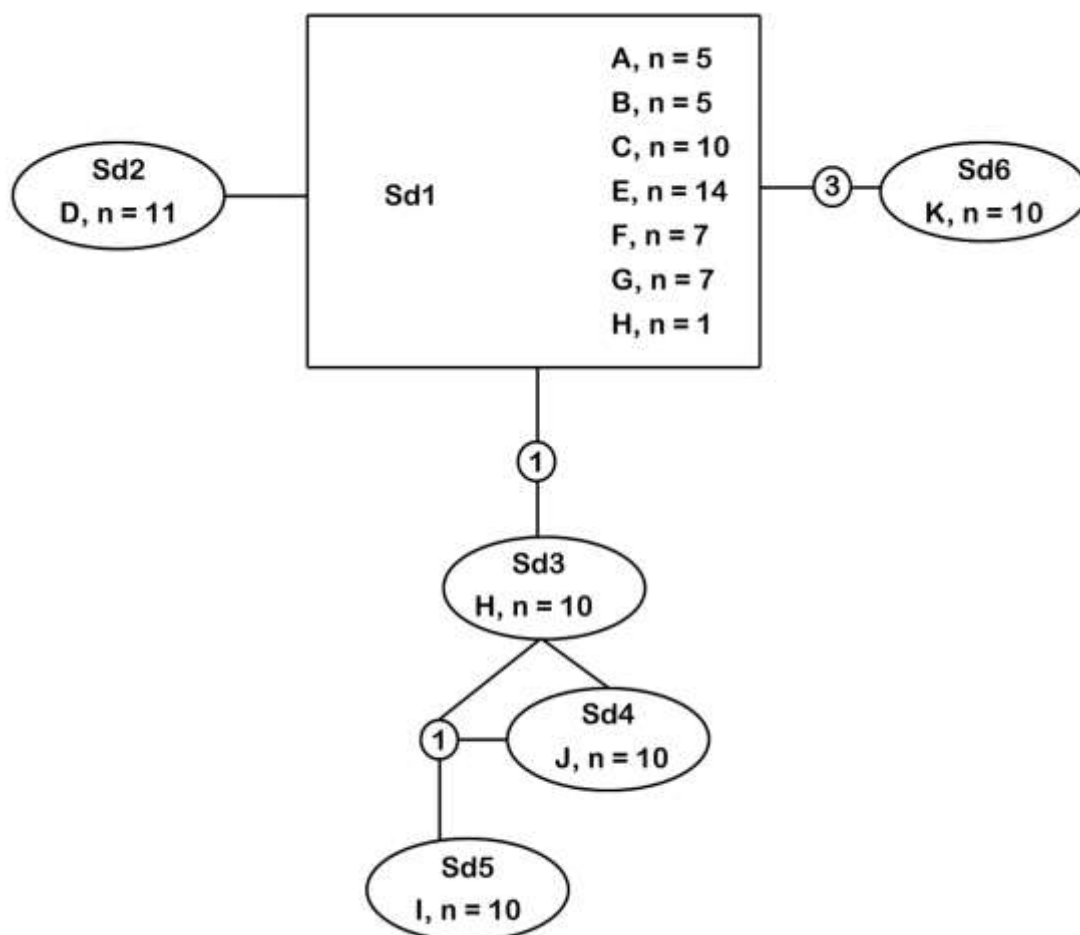


Figura 2. Rede de haplótipos da região espaçadora *cox2-3* para populações de *Sirodotia delicatula* no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

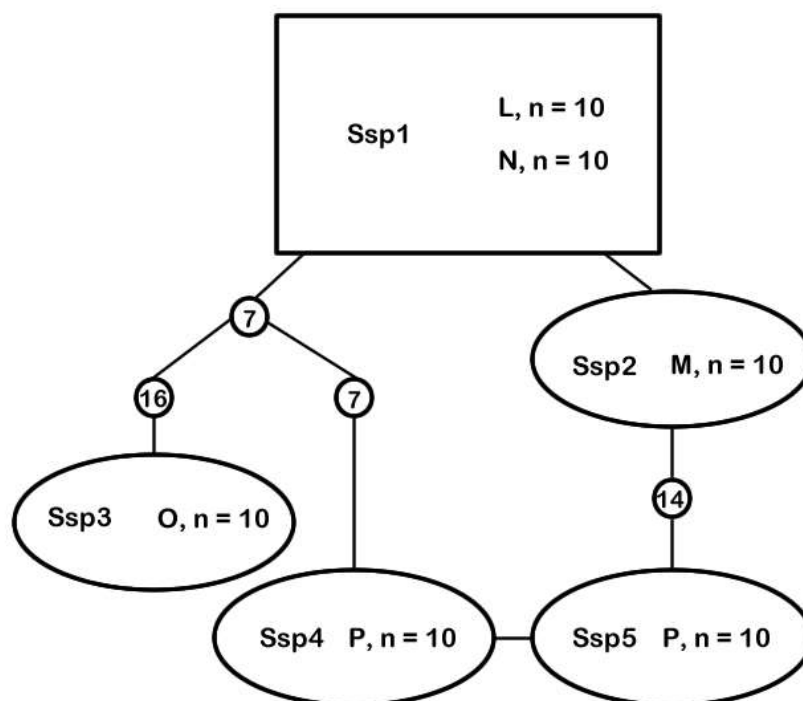


Figura 3. Rede de haplótipos da região espaçadora *cox2-3* para populações de *Sirodotia* spp no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 3, respectivamente.

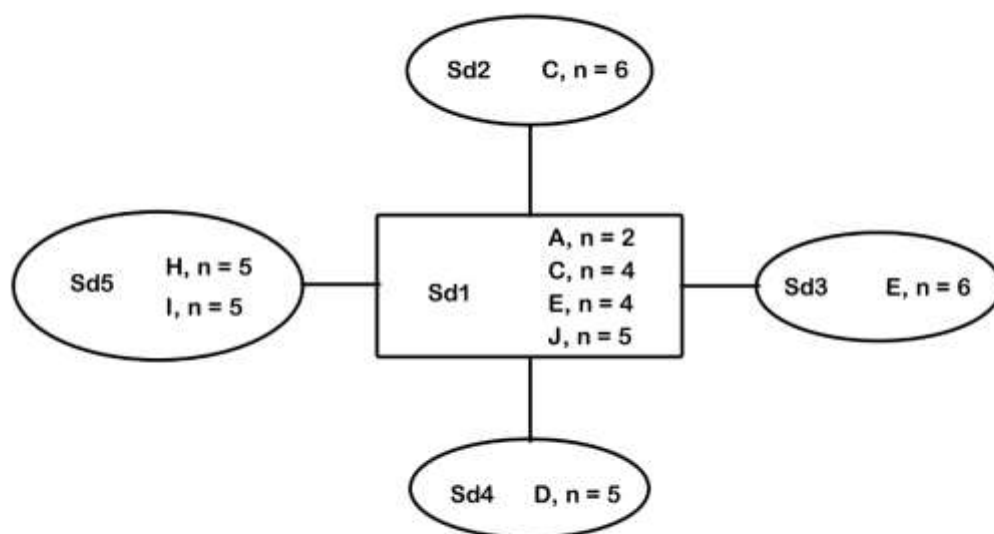


Figura 4. Rede de haplótipos para a região de barcode *cox1* para populações de *S. delicatula* no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 6, respectivamente.

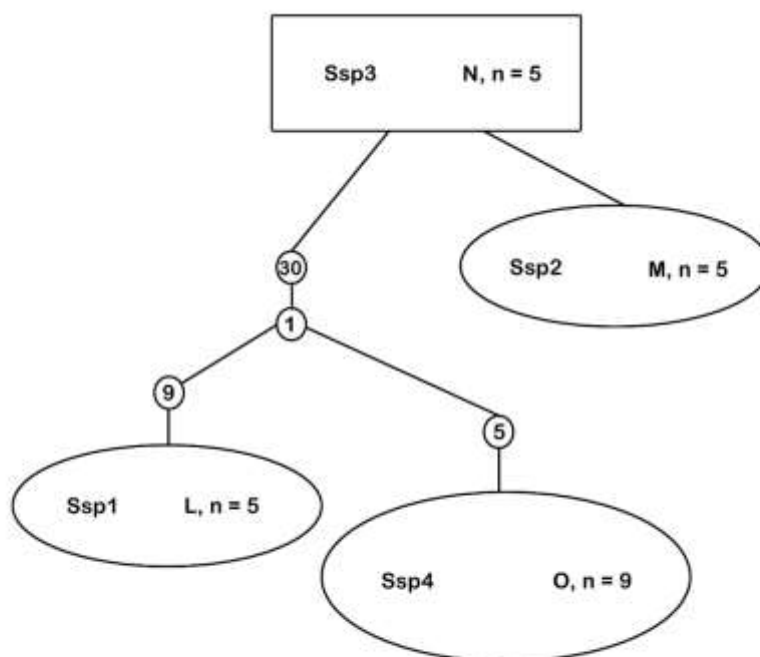


Figura 5. Rede de haplótipos para a região de barcode *cox1* para populações de *Sirodotia spp.* no Brasil. Linha simples indica diferença de 1 pb, círculos abertos indicam intermediários perdidos; números dentro dos círculos indicam número de intermediários; *n* – número de indivíduos idênticos; designação dos haplótipos e códigos das localidades são apresentados na Tabela 1 e Tabela 7, respectivamente.

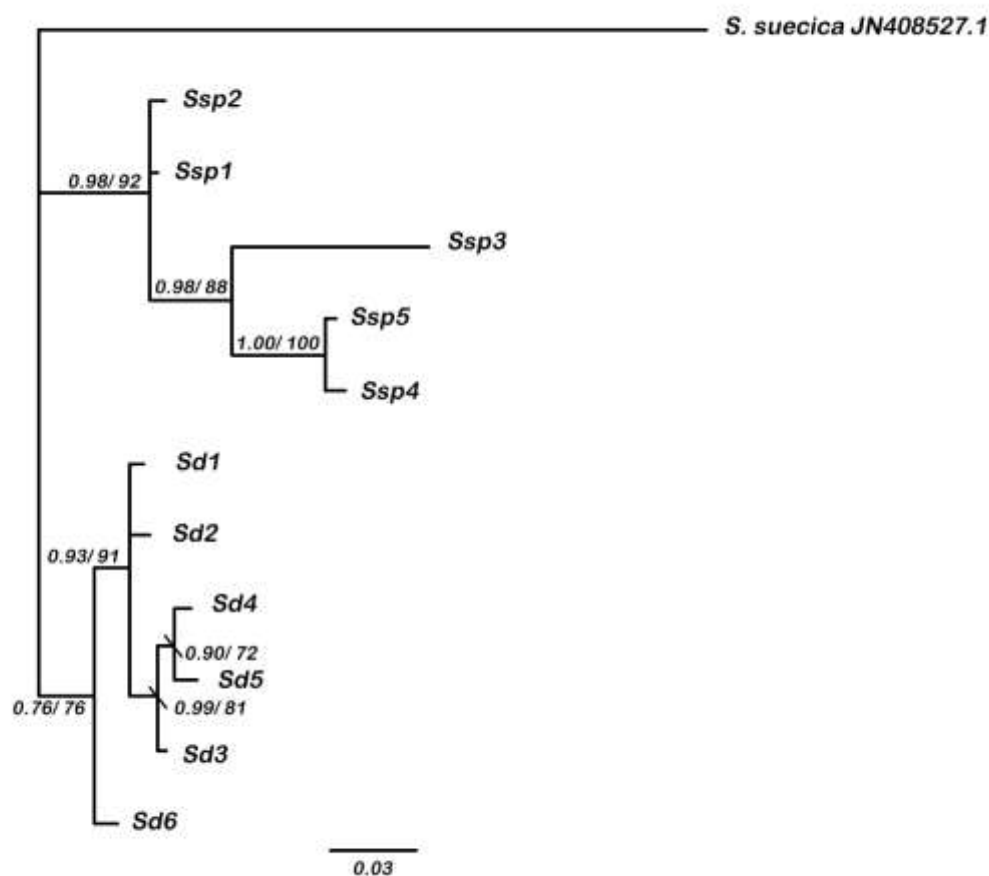


Figura 6. Árvore da análise Máxima Verossimilhança das sequências da região espaçadora *cox2-3* mostrando as relações entre os haplótipos de *S. delicatula* e *Sirodotia* spp., usando *S. suecica* como grupo externo (JN408527.1). Código das localidades e designação dos haplótipos estão nas Tabelas 2 - 3. Os valores nos nós indicam os valores de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente; nós sem valores indicam suporte < 70%.

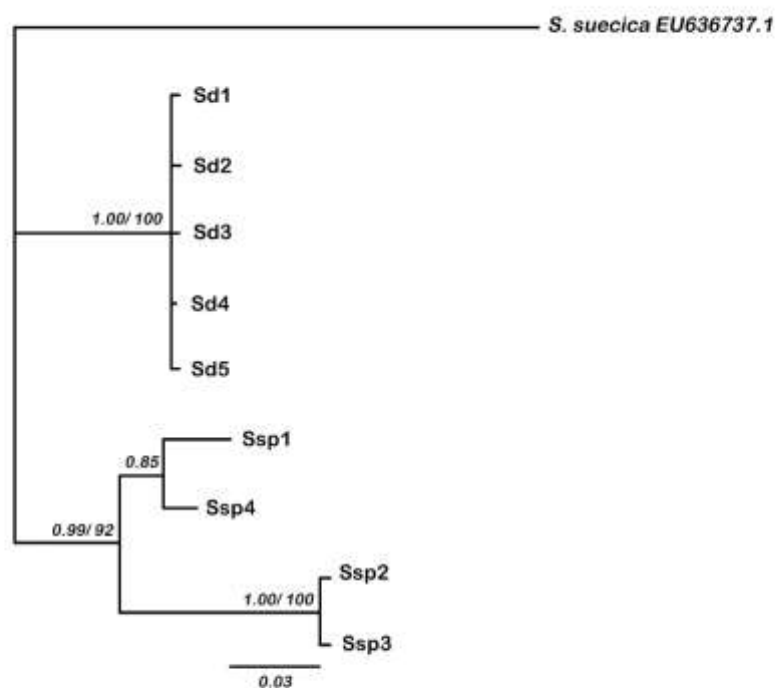


Figura 7. Árvore da análise Máxima Verossimilhança das sequências da região de barcode *cox1* mostrando as relações entre os haplótipos de *S. delicatula* e *Sirodotia* spp., usando *S. suecica* como grupo externo (EU636737.1). Código das localidades e designação dos haplótipos estão nas Tabelas 6 - 7. Os valores nos nós indicam os valores de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente; nós sem valores indicam suporte < 70%.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram a existência de estruturas filogeográficas distintas entre as espécies de Batrachospermales analisadas. A partir das análises populacionais realizadas, foram inferidas algumas conclusões sobre os padrões de distribuição de cada espécie, baseadas em dados de variação genética intra e inter-populacional dos marcadores mitocondriais *cox2-3* e *cox1*. Algumas generalizações ou inferências também foram feitas com base nos domínios morfo-climáticos e províncias biogeográficas onde as respectivas populações ocorreram. O presente estudo é o primeiro a caracterizar as espécies de Batrachospermales com este enfoque.

Com base nos resultados obtidos para as sete espécies analisadas neste estudo, pudemos concluir que a hipótese 1 foi corroborada, pois cada espécie apresentou um padrão distinto de variação genética, de acordo com a distribuição geográfica das populações amostradas. Considerando que todas as populações amostradas para as sete espécies apresentaram apenas um ou dois haplótipos em cada população, com baixa ou nenhuma variação intra-populacional, a hipótese 2 também foi corroborada. O número de haplótipos de *cox2-3* para cada espécie variou de cinco a dez. A única exceção foi *K. ambigua*, que teve apenas três haplótipos para ambos os marcadores, fato que talvez possa ser explicado pelo pequeno número de populações amostradas (cinco). O número de haplótipos de *cox1* variou entre cinco e nove. A hipótese 3 não foi corroborada, pois a maioria das espécies não apresentou correlação positiva entre divergência genética e distância geográfica, com exceção de *B. viride-brasiliense* e dos haplótipos de *cox1* de *K. ambigua*, que apresentaram valores significativos para o teste de

Mantel. Para as sete espécies estudadas, geralmente os mesmos haplótipos foram encontrados em algumas localidades distantes geograficamente, assim como haplótipos relativamente divergentes ocorreram em localidades próximas. *Sirodotia delicatula* foi o caso mais evidente, com sete localidades distintas apresentando o mesmo haplótipo de *cox2-3*. E por fim, a hipótese 4 foi corroborada, pois as tendências de divergência genética dos haplótipos foram essencialmente congruentes para ambos os marcadores, com todas as espécies apresentando um valor de divergência inter e intra-populacional mais elevado para *cox2-3*.

Os valores de divergência intra e inter-populacional foram semelhantes para as espécies analisadas neste estudo (Tabela 1). *K. ambigua* não apresentou divergência intra-populacional para ambos os marcadores, assim como *S. puiggariana* para *cox1*. Para as outras espécies, os níveis de divergência foram relativamente baixos em comparação a estudos anteriores para a ordem Batrachospermales (Tabela 1). A divergência inter-populacional apresentou valores mais elevados para ambos os marcadores utilizados. Em relação ao número de posições variáveis, *B. viride-brasiliense* apresentou a maior variação tanto para as sequências de *cox2-3* quanto de *cox1*. Para o complexo *Sirodotia* spp., somente uma das espécies crípticas apresentou mais de um haplótipo, não sendo possível a comparação com as demais espécies.

As populações de *Kumanoa ambigua* foram coletadas exclusivamente em áreas de Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), enquanto *B. viride-brasiliense* e *S. puiggariana* apresentaram distribuição em três domínios morfo-climáticos: Cerrado, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa

(Atlântica), *Sirodotia* spp. apresentaram populações em áreas de Cerrado e Floresta Ombrófila Densa (Amazônica). Novas amostragens para *K. ambigua* foram propostas para uma melhor compreensão dos padrões filogeográficos da espécie. Em geral, sugere-se ainda investigações de outras espécies da ordem Batrachospermales com ampla distribuição no Brasil, para que se possa formular idéias e padrões gerais relacionando a filogeografia das espécies.

Tabela1. Dados comparativos dos marcadores utilizados neste estudo entre as sete espécies de Batrachospermales.

Espécie	cox2-3	cox1
<i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>		
Número de haplótipos	10	9
Variação intrapopulacional (%/ pb)	0,3 – 0,6	0,1 – 0,4
Variação interpopulacional (%/ pb)	0,3 – 2,4	0,6 – 2,0
Posições variáveis (%)	3,5	4,2
<i>Kumanoa ambigua</i>		
Número de haplótipos	3	3
Variação intrapopulacional (%/ pb)	0	0
Variação interpopulacional (%/ pb)	0,6 – 2,4	1,3 – 2,0
Posições variáveis (%)	2,7	2,4

Tabela 1. Continuação.

Espécie	cox2-3	cox1
<i>Setacea puiggariana</i>		
Número de haplótipos	6	8
Variação intrapopulacional (%/ pb)	0,8	0
Variação interpopulacional (%/ pb)	0,3 – 2,4	0,2 – 2,4
Posições variáveis (%)	3,2	3,6
<i>Sirodotia delicatula</i>		
Número de haplótipos	6	5
Variação intrapopulacional (%/ pb)	0,6/ 2	0,2/ 1
Variação interpopulacional (%/ pb)	0,3 – 2,2/ 1 - 8	0,2 – 0,4/ 1 - 2
Posições variáveis (%)	2,1	0,6
<i>Sirodotia</i> spp.		
Número de haplótipos	5	4
Variação intrapopulacional (%/ pb)	0,3/ 1	0
Variação interpopulacional (%/ pb)	0,3 – 7,0	0,2 – 6,2
Posições variáveis (%/ pb)	8,8	7,2