
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

Revisão das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* do gênero
Batrachospermum (Rhodophyta, Batrachospermales)

Auro Silva Garcia Filho

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Vegetal).

Março - 2014



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

Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal

**Revisão das Seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e
Macrospora do gênero *Batrachospermum* (Rhodophyta,
Batrachospermales)**

Discente: Auro Silva Garcia Filho

Orientador: Orlando Necchi Júnior

589.3 Garcia Filho, Auro Silva
G216r Revisão das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e
 Macrospora do gênero *Batrachospermum* (Rhodophyta,
 Batrachospermales) / Auro Silva Garcia Filho. - Rio Claro,
 2014
 86 f. : il., figs., tabs., fots., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Orlando Necchi Junior

 1. Alga. 2. Sistemática. 3. Algas vermelhas. 4.
 Taxonomia. 5. Biologia molecular. I. Título.

Resumo

As três seções do gênero *Batrachospermum* - *Acarposporophytum* (com uma única espécie, *B. brasiliense* Necchi), *Aristata* (*B. beraense* Kumano, *B. cayennense* Montagne, *B. longiarticulatum* Necchi e *B. turgidum* Kumano) e *Macrospora* (*B. equisetifolium* Montagne, *B. hypogynum* Kumano & Ratnasabapathy e *B. macrosporum* Montagne) têm sido demonstradas como monofiléticas em estudos filogenéticos envolvendo pelo menos um representante de cada seção. As seguintes hipóteses foram testadas: 1) as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* constituem grupos monofiléticos dentro do gênero *Batrachospermum*; as seções têm sido demonstradas como monofiléticas em estudos filogenéticos e com a adição de maior número de espécies e populações essa tendência deverá ser confirmada; 2) A maioria das espécies atualmente reconhecidas em cada seção com base em caracteres morfológicos será corroborada pelos dados moleculares. A presente revisão das três seções teve como objetivos: 1) inferir as relações filogenéticas, bem como os limites de variação intraespecíficas, das espécies dentro e entre as seções, bem como com outras seções do gênero, foram utilizados os caracteres morfológicos diagnósticos atualmente aceitos e três marcadores moleculares - *rbcL*, gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO; região de “barcode” do gene mitocondrial *cox1*, que codifica a subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase; e UPA - gene plastidial “universal plastid amplicon”; 2) elaborar estudo de revisão para as três seções por meio da realização dos caracteres taxonômicos diagnósticos para espécies desses grupos, à luz dos novos dados moleculares. Foram analisadas 19 amostras provenientes das regiões sudeste, centro-oeste, norte e nordeste do Brasil, além dos espécimes-tipo de cada seção e sequências disponíveis no “GenBank” para cada um dos marcadores utilizados. Os caracteres diagnósticos para o reconhecimento das seções foram revisados, bem como os caracteres para identificação das espécies dentro das seções. Desse modo pode-se

concluir, com base em dados morfológicos e moleculares, que: as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* constituem grupos monofiléticos dentro do gênero *Batrachospermum*. Estes resultados confirmam a primeira hipótese. Foram reconhecidas as seguintes espécies em cada seção, com base em dados morfológicos e moleculares: *Acarposporophytum* (*B. brasiliense*), *Aristata* (*B. cayennense*, *B. cylindrocellulare* Kumano, *B. longiarticulatum* e *B. turgidum*) e *Macrospora* (*B. macrosporum*). Duas espécies da seção *Macrospora* (*B. equisetifolium* e *B. hypogynum*) e uma da seção *Aristata* (*B. beraense*) foram consideradas, com base em dados morfológicos, sinônimos de *B. macrosporum* e *B. cayennense*, respectivamente. A espécie *B. cylindrocellulare* que apresentava caracteres intermediários entre as seções *Aristata* e *Batrachospermum*, foi reconhecida na seção *Aristata* com base em dados morfológicos e moleculares. Estes dados confirmaram parcialmente a segunda hipótese. Complexos de espécies foram formados em *B. cayennense* (três espécies distintas) e em *B. macrosporum* (cinco espécies distintas), e as informações atualmente disponíveis indicam tratar-se de espécies crípticas. Essas espécies apresentaram limites de variação intraespecíficas muito altos, principalmente para as sequências dos marcadores *cox1* e *rbcL*, respectivamente: *B. cayennense* - 0-97 pares de bases, pb (0-14,6%) e (0-182 pb; 0-14,7%); *B. macrosporum* - (0-69 pb; 0-10,4%) e (0 a 85 pb; 0-6,6%). As espécies das três seções ocorreram predominantemente em ambientes sombreados ou parcialmente sombreados. Dentre as variáveis ambientais analisadas, observou-se que *B. brasiliense* (*Acarposporophytum*) ocorreu em águas com valores significativamente menores de temperatura e maiores de oxigênio do que as espécies das seções *Aristata* e *Macrospora*.

Palavras-chave: *Acarposporophytum*, *Aristata*, Batrachospermales, *Batrachospermum*, *cox1*, *Macrospora*, *rbcL*, sistemática, UPA

Abstract

The three sections of the genus *Batrachospermum* - *Acarposporophytum* (with the single species *B. brasiliense* Necchi), *Aristata* (*B. beraense* Kumano, *B. cayennense* Montagne, *B. longiarticulatum* Necchi and *B. turgidum* Kumano) and *Macrospora* (*B. equisetifolium* Montagne, *B. hypogynum* Kumano & Ratnasabapathy and *B. macrosporum* Montagne) – have been shown to be monophyletic in phylogenetic studies involving at least one member of each section. The following hypotheses were tested: 1) the sections *Acarposporophytum*, *Aristata* and *Macrospora* represent monophyletic groups within the genus *Batrachospermum*; the sections have been shown to be monophyletic and closely related in previous studies and with the addition of more species and populations this trend will be confirmed; 2) most species currently recognized in each section on the basis of morphological characters will be corroborated by molecular data. This revision of the three sections has the following aims: 1) to infer phylogenetic relationships and the intra-specific limits of variation of the species within and between sections, as well as with the other sections of the genus; the investigation used the morphological diagnostic characters currently applied and three molecular markers - *rbcL*, the plastidial gene encoding the large sub-unit of RUBISCO; the barcode region of the mitochondrial gene *cox1*, encoding sub-unit 1 of cytochrome c oxidase; and UPA, plastidial universal plastid amplicon; 2) to carry out a revisional study of the three sections by means of the reevaluation of taxonomic diagnostic characters for species within these groups, in the light of new molecular data. Nineteen new samples were analysed from the southeast, mid-west, north and northeast regions of Brazil, as well as the type specimens of each species and the sequences available in GenBank for each molecular marker. The diagnostic characters for section circumscription and species identification within the sections were revised. As a result,

we concluded that sections *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* are monophyletic groups within the genus *Batrachospermum*; thus, the first hypothesis was confirmed. The following species have been recognized within each section based on morphological and molecular data: *Acarposporophytum* (*B. brasiliense*), *Aristata* (*B. cayennense*, *B. cylindrocellulare* Kumano, *B. longiarticulatum* and *B. turgidum*) e *Macrospora* (*B. macrosporum*). Two species in section *Macrospora* (*B. equisetifolium* and *B. hypogynum*) and one of section *Aristata* (*B. beraense*) have been proposed, on the basis of morphological data, as synonyms of *B. macrosporum* and *B. cayennense*, respectively. The species *B. cylindrocellulare*, that presented intermediate characters between sections *Aristata* and *Batrachospermum*, have been recognized as a member of section *Aristata*, based on morphological and molecular data. These results corroborated the second hypothesis. Species complexes have been found in *B. cayennense* (three distinct species) and in *B. macrosporum* (five species) and the current available information indicates that they are cryptic species. These species had very high intra-specific variation limits, particularly for the sequences of *cox1* and *rbcL*, respectively: *B. cayennense* - 0-97 base pairs (bp), (0-14.6%) e 0-182 bp (0-14.7%); *B. macrosporum* - 0-69 bp (0-10.4%) e 0 a 85 bp (0-6.6%). The species of the three sections occurred predominantly in shaded or partly shaded stream segments. Among the environmental variables analysed, we found that *B. brasiliense* (*Acarposporophytum*) occurred in waters with significantly lower values of temperature and higher of oxygen than the species of sections *Aristata* and *Macrospora*.

Key words: *Acarposporophytum*, *Aristata*, Batrachospermales, *Batrachospermum*, *cox1*, *Macrospora*, *rbcL*, systematics, UPA

Agradecimentos

Ao Professor Orlando Necchi Junior pela orientação durante todos esses anos no desenvolvimento deste e de outros projetos.

À Coordenação do PPG em Biologia Vegetal e aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Instituto de Biociências UNESP de Rio Claro pela solicitude no desenvolvimento do Mestrado.

Aos funcionários e companheiros de trabalho do Departamento de Zoologia e Botânica pela ajuda e amizade no decorrer deste projeto.

Ao professor Luis Henrique Zanini Branco por cativar em mim o gosto pela Botânica.

Aos herbários: PC (coleção de Thuret), SP (Instituto de Botânica) e TNS-AL (Departamento de Botânica do Museu Nacional de Ciências e da Natureza) pela solicitude.

A professora Morgan Vis por disponibilizar alguns dos espécimes-tipo e sequências de algumas amostras.

As pessoas que fizeram algumas das coletas e contribuíram com exemplares para que este trabalho pudesse ser concretizado.

Aos grandes amigos do Laboratório BETA pelo apoio sempre tão valioso e pelas muitas risadas que tem uma importância incomensurável.

Nadia, Mariéllen, Monica e Douglas por serem exemplos a ser seguido no trabalho diário.

Aos meus pais Auro e Júlia, e minha irmã Lívia por sempre me apoiarem e me incentivarem.

Agradeço à FAPESP (Processos: 2012/06848-9 e 2012/12016-6) pela bolsa e pelo auxílio financeiro, respectivamente, e CAPES pela bolsa.

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. Gênero <i>Batrachospermum</i>	8
1.2. Seções <i>Acarposporophytum</i> , <i>Aristata</i> e <i>Macrospora</i>	9
1.3. Análises moleculares em Batrachospermales	12
1.4. Hipóteses.....	15
1.5. Objetivos.....	15
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Variáveis Ambientais.....	16
2.2. Preservação	19
2.3. Análises Morfológicas	20
2.4. Análises Moleculares	25
2.5. Amplificação de DNA	25
2.6. Eletroforese em gel de agarose	27
2.7. Purificação e quantificação dos produtos de PCR	28
2.8. Sequenciamento e alinhamento	28
2.9. Análises Filogenéticas	29
3. Resultados	33
3.1. Varáveis ambientais	33
3.2. Análises moleculares	36
3.2.1. Análise das sequências de UPA.....	36
3.2.2. Análise das sequências de <i>cox1</i>	40
3.2.3. Análise das sequências de <i>rbcL</i>	46
3.2.4. Comparação entre os marcadores	52
3.3. Análises morfológicas.....	55
4. Discussão e Conclusões	74
5. Referências Bibliográficas	81

1. Introdução

1.1. Gênero *Batrachospermum*

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, o gênero *Batrachospermum* Roth (família Batrachospermaceae) é o mais especioso, com pelo menos 112 espécies reconhecidas mundialmente (KUMANO, 2002), bem como bastante diverso morfológicamente. Este gênero pode ser distinguido dos demais gêneros da ordem com base nas seguintes características: talo geralmente flácido, mais ou menos mucilaginoso, e composto por filamentos axiais distintos com verticilos regulares e de ramos laterais com crescimento definido; carposporófitos (ausentes em *B. brasiliense* Necchi) esféricos ou semiesféricos, diretamente resultantes do carpogônio fecundado; e ramo carpogonial reto ou levemente curvo e radialmente simétrico (nunca torcido espiralmente ou fortemente curvado). As espécies pertencentes a esse gênero apresentam gametófito macroscópico, dominante no histórico de vida. (PUESCHEL & COLE, 1982; SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; ENTWISLE et. al., 2009).

Essas características são bastante utilizadas na discriminação taxonômica em nível específico. O gênero *Batrachospermum* apresenta reprodução oogâmica, onde o espermiócio (não flagelado) fecunda o carpogônio. Diferente de outras algas vermelhas de Florideophyceae, membros da família Batrachospermaceae não apresentam tetrasporângio, mas possuem dois estágios esporofíticos (carposporófito e estágio ‘Chantransia’) e um gametófito (SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; SHEATH, 2003).

O gênero foi proposto por Roth (1797), teve sua primeira grande revisão feita por Sirodot (1884), e desde então apresentou notória estabilidade taxonômica. manteve-se estável taxonomicamente. Algumas mudanças ocorreram mais recentemente, sendo

que todas elas ocorreram em níveis de subgêneros, seções e/ou espécies. (NECCHI & ENTWISLE 1990; VIS et al.; 1995; KUMANO 2002)

Necchi (1990b) desenvolveu um trabalho de revisão das espécies do gênero para o Brasil com base em caracteres morfológicos detalhados, onde foram incluídas descrições de 29 espécies, sendo duas delas descritas como espécies novas para a Ciência. Uma série de trabalhos semelhantes foram realizados na América do Norte , com base em análises morfológicas detalhadas (SHEATH et al., 1992, 1993a, 1993b, 1994a, 1994b, 1994c; SHEATH & VIS , 1995; VIS et al., 1995; VIS & SHEATH, 1996; VIS et al., 1996a). Também foram realizados trabalhos desta natureza para representantes deste grupo na Oceania (ENTWISLE, 1992; 1993; ENTWISLE & FOARD, 1997; 1999a; b; 2007).

1.2. Seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora*

Na revisão recente da ordem Batrachospermales as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* foram reconhecidas como grupos monofiléticos, bem como as seções *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Setacea*, *Turfosa* e *Virescentia* (ENTWISLE et al. 2009). Nesse estudo foi possível observar um distanciamento filogenético entre *B. cayennense* (seção *Aristata*) e *B. macrosporum*, (seção *Macrospora*) sendo que estas espécies eram tradicionalmente classificadas na secção *Aristata*. Além disso, *B. brasiliense* (seção *Acarposporophytum*) e *B. cayennense* se posicionaram como grupos-irmãos em um mesmo ramo na árvore filogenética, apesar de estas espécies serem morfológicamente distintas e não ocorrerem atualmente na mesma região. As relações filogenéticas entre as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora*, baseada em número representativo de espécies, bem como destas com outras seções do gênero *Batrachospermum* ainda não estão estabelecidas de maneira sólida e consistente devido

à pequena representatividade de sequências disponíveis. Estas seções são atualmente caracterizadas pelos critérios morfológicos estabelecidos nos tratamentos taxonômicos mais relevantes (NECCHI 1990a, SHEATH *et al.* 1994, KUMANO 2002, ENTWISLE *et al.* 2009).

A seção *Acarposporophytum* foi originalmente descrita como subgênero por Necchi (1987) para abrigar *B. brasiliense*. Essa espécie ocorre na América do Sul, especificamente na região de Mata Atlântica do estado de São Paulo. Esta espécie diferencia-se das demais espécies do gênero porque o carposporófito é ausente, com produção dos filamentos do estágio ‘Chantransia’ diretamente do carpogônio fecundado (NECCHI, 1990). O histórico de vida desta espécie é peculiar em Rhodophyta, consiste aparentemente de uma redução envolvendo uma das fases do histórico de vida, redução do carposporófito em zigoto, e a capacidade de uma fase se inserir na fase anterior do histórico de vida, formação do estágio “Chantransia” no gametófito (MAGNE 1972; NECCHI, 1990).

KUMANO (2002) reconheceu, em nível mundial, uma espécie para a referida seção: *B. brasiliense* Necchi. Posteriormente na revisão da ordem Batrachospermales realizada por Entwisle *et al.* (2009) com base nos marcadores moleculares *rbcL* (gene plastidial que codifica a subunidade grande da enzima RUBISCO) e SSU rDNA (gene nuclear que codifica a sub-unidade pequena do ribossomo), o status taxonômico foi rebaixado de subgênero para seção.

A seção *Aristata* foi proposta por Skuja (1933) para acomodar três espécies do gênero *Batrachospermum*: *B. breutelii* Rabenhorst, *B. cayennense* Montagne e *B. macrosporum* Montagne. Os trabalhos taxonômicos recentes mais relevantes sobre esses grupos são todos de nível alfa. KUMANO (1990) detalhou características do carpogônio e carposporófito para várias espécies descritas por MONTAGNE (1850) para a Guiana Francesa e reconheceu uma espécie adicional para a seção *Aristata* (*B.*

equisetifolium Montagne). NECCHI (1990a) realizou revisão das espécies do gênero para o Brasil, incluindo descrições detalhadas de espécies das seções *Aristata* (*B. cayennense* Montagne e *B. longiarticulatum* Necchi) e *Macrospora* (*B. macrosporum* Montagne).

KUMANO (1993) dividiu a seção *Aristata* nas subseções *Aristata*, na qual reconheceu quatro espécies (*B. beraense*, *B. cayennense*, *B. longiarticulatum* e *B. turgidum*), e *Macrospora*, na qual reconheceu três espécies (*B. hypogynum*, *B. equisetifolium* e *B. macrosporum*). SHEATH *et al.* (1994) realizaram trabalho de revisão para as espécies da seção *Aristata* representados na América do Norte, bem como tipos nomenclaturais de outras espécies da seção, com base em análises morfométricas detalhadas. Reconheceram seis espécies neste grupo, a saber: *B. breutelii* Rabenhorst *B. beraense*, *B. cayennense* (sinônimo *B. aristatum* Skuja), *B. hypogynum*, *B. longiarticulatum* e *B. macrosporum* (sinônimo *B. australe* Collins, *B. excelsum* Montagne e *B. oxycladum* Montagne). A primeira (*B. breutelii* Rabenhorst) é conhecida apenas da África do Sul e foi transferida para uma seção própria (*Gonimopropagulum*) por Sheath & Whittick (1995).

As espécies desta seção segundo Kumano (2002) apresentam hábito semelhante, caracterizadas por serem irregularmente ramificadas; ramos carpogonial reto, longo e diferenciado em fascículos; carpogônio simétrico; carposporófitos pedunculados e com formato esférico. KUMANO (2002) em estudo de revisão dividiu a seção *Aristata* em subseção *Aristata*, com quatro espécies: *B. cayennense* Montagne, *B. longiarticulatum*. Necchi, *B. turgydum* Kumano e *B. beraense* Kumano; e subseção *Macrospora*, com três espécies: *B. macrosporum* Montagne, *B. hypogynum* Kumano & Ratnasabapathy e *B. equisetifolium* Montagne. Há fortes evidências de que *B. equisetifolium* e *B. hypogynum* sejam sinônimos de *B. macrosporum*, especialmente considerando-se que não há dados morfométricos para ambas as espécies (SHEATH *et al.* 1994). Além de estudos

moleculares mais recentes com populações de *B. macrosporum*, das Américas do Norte e Sul (SHERWOOD et al. 2008; VIS et. al., 2008;) apontarem para possíveis ocorrências de espécies crípticas. KUMANO (1978) ao descrever a espécie *B. cylindrocellulare* Kumano apontou-a como intermediária entre as seções *Aristata* e *Batrachospermum*. Na revisão da ordem Batrachospermales (ENTWISLE et al. 2009), as seções *Aristata* e *Macrospora* foram separadas com base na filogenia molecular de sequências de dois marcadores *rbcL* e SSU rDNA. *B. macrosporum* foi separado e passou a constituir a única espécie com dados da seção *Macrospora*.

1.3. Análises moleculares em Batrachospermales

A identificação e delimitação de espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) são notoriamente difíceis devido a uma morfologia e anatomia relativamente simples e em muitos casos convergentes, grande plasticidade fenotípica, alternância de gerações heteromórficas no ciclo de vida (ROBBA et al., 2006), e muitas vezes a ausência das estruturas reprodutivas impossibilitam a identificação até mesmo do gênero (SAUNDERS, 2005). Diante de tais dificuldades, têm-se intensificado o uso ferramentas moleculares para auxílio nos estudos taxonômicos e de biogeografia de algas (SAUNDERS, 2005)

Dentre as ferramentas moleculares utilizadas para estudos dessa natureza, a região de “barcode” do gene *cox 1* (codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) tem sido utilizada como marcador clássico para estudos desse tipo com utilização de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e termociclos específicos para diferentes grupos (SAUNDERS, 2005; SAUNDERS & MCDEVITT, 2012). Assim, a utilização da região de “barcode” do gene *cox1* como marcador molecular para reconhecimento de espécies está sendo intensamente utilizada em estudos mais recentes.

Outro marcador molecular bastante utilizado é o plastidial UPA (“universal plastid amplicon”), que foi proposto como um marcador alternativo para vários grupos de algas por (SHERWOOD & PRESTING 2007). (SHERWOOD *et al.* 2008) realizaram um estudo usando ambos marcadores demonstrando níveis de variação suficientes e apropriados para avaliação de variabilidade genética específica em Batrachospermales.

Desde as primeiras tentativas para realizar análises filogenéticas moleculares de membros dessa ordem, feitas por (VIS *et al.*, 1998), o *rbcL* tem-se demonstrado de grande importância no esclarecimento das relações entre os táxons de Batrachospermales, e tem sido adotado em diversos outros estudos dessa natureza (VIS & ENTWISLE, 2000; VIS *et al.*, 2001; VIS *et al.* 2008; ENTWISLE *et al.*, 2009). Além disso, estudo recentemente concluído (VIS *et al.* 2012) indicou que a resolução no nível específico das árvores filogenéticas aumentou significativamente em análises concatenadas incluindo os marcadores *cox 1* e UPA em conjunto com sequências de *rbcL*.

O gênero *Batrachospermum* tem sido demonstrado como parafilético em todos os estudos filogenéticos moleculares realizados (VIS *et al.*, 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS *et al.* 2005, ENTWISLE *et al.*, 2009). Há evidências convincentes dessa parafilia (KAPRAUN *et al.*, 2007), e em um estágio que não permite apenas mudanças taxonômicas com pequenos ajustes. ENTWISLE *et al.* (2009) propuseram uma revisão da ordem Batrachospermales, que resultou na aceitação provisória do gênero *Batrachospermum* e reconhecimento de oito seções – *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora* Kumano, *Setacea* De Toni, *Turfosa* Sirodot e *Virescentia* Sirodot. A maioria das seções carece de análises mais amplas incluindo número representativo de espécies e de populações de cada espécie.

Estudos já publicados combinando dados moleculares e morfológicos enfocaram apenas as relações filogenéticas entre os grupos maiores (gêneros ou seções) (FRESHWATER e al., 1994; VIS et al., 1998; VIS et al., 2005) e abordagens visando avaliar o número de espécies só foram iniciados muito recentemente e são ainda escassos. Nesse aspecto, só foi publicado até o presente o tratamento monográfico do gênero *Kumanoa*, elevando a seção *Contorta* ao nível de gênero. (NECCHI & VIS, 2012; VIS et al., 2012). Os resultados encontrados para *Kumanoa*, bem como dados preliminares para outros grupos em estudo (gênero *Sirodotia*, (LAM et al., 2012); e seções *Turfosa* e *Virescentia* de *Batrachospermum*, NECCHI, VIS e colaboradores, em andamento) têm evidenciado grande conhecimento da diversidade genética no nível específico e ocorrência de espécies crípticas. Essas últimas têm sido reconhecidas com alto nível de divergência genética, porém sem a correspondente distinção morfológica, mas em alguns casos, apenas geográfica, como a ocorrência de linhagens distintas geneticamente, mas não morfolologicamente, entre continentes (LAM et al., 2012). Essa tendência certamente levará à proposição futura de espécies com base exclusivamente em dados genéticos e/ou geográficos. Outra tendência que parece inevitável é a separação do gênero *Batrachospermum* em vários gêneros distintos, conforme ocorreu com o gênero *Kumanoa* (ENTWISLE et al., 2009).

A principal motivação para a escolha das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* para abordagem neste estudo, reside no fato de terem sido apontadas como estreitamente relacionadas filogeneticamente na revisão recente de Entwisle et al. (2009). Porém, aquele estudo considerou poucos representantes de cada grupo e também número pequeno de sequências com pobre representação geográfica. Desse modo, análise mais detalhada é necessária para determinar mais claramente as relações filogenéticas entre as três seções.

1.4. Hipóteses

Com base nas informações atualmente disponíveis (morfológicas e moleculares) sobre representantes do gênero *Batrachospermum* no Brasil e em outras regiões do mundo, as seguintes hipóteses foram testadas: 1) as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* constituem, separadamente, grupos monofiléticos dentro do gênero *Batrachospermum*; as seções têm sido demonstradas como monofiléticas em estudos filogenéticos (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009) e com a adição de maior número de espécies e populações essa tendência deverá ser confirmada; 2) A maioria das espécies atualmente reconhecidas em cada seção com base em caracteres morfológicos – *Acarposporophytum* (*B. brasiliense*), *Aristata* (*B. beraense*, *B. cayennense*, *B. longiarticulatum* e *B. turgidum*) e *Macrospora* (*B. hypogynum*, *B. equisetifolium*, *B. macrosporum*), serão corroboradas pelos dados moleculares.

1.5. Objetivos

O presente trabalho encaixa-se no contexto das contribuições recentes sobre sistemática filogenética do gênero *Batrachospermum*, conforme apresentado acima, e complementa dados obtidos para outras regiões, especialmente América do Norte (SHEATH et al. 1994) e Ásia (ENTWISLE & FOARD 1997, VIS & ENTWISLE 2000). E teve como objetivos: 1) Inferir as relações filogenéticas, bem como os limites de variação intraespecífica, das espécies dentro das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* e entre essas, bem como com outras seções do gênero, com base na comparação de sequências dos marcadores *rbcL*, *cox 1* e UPA, incluindo-se novas

adições deste trabalho e aquelas já disponíveis no "Genbank"; 2) Elaborar estudo de revisão para as três seções por meio da reavaliação dos caracteres taxonômicos diagnósticos para espécies desses grupos, à luz dos novos dados moleculares

2. Materiais e Métodos

As amostras estudadas de espécies das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora*, do gênero *Batrachospermum* foram provenientes das regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (Tabela 1, Figura 1). As amostras para análises morfológicas foram incorporadas ao Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica (SJRP) (THIERS, 2014) e as amostras para análises moleculares incorporadas à coleção ficológica do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas - UNESP/SJRP. Ao todo foram coletadas 19 amostras para análise morfológica e molecular, sendo: 01 de *B. brasiliense*, 04 de *B. cayennense* e 14 de *B. macrosporum*. Os critérios morfológicos adotados para a identificação das populações brasileiras foram baseados em NECCHI (1990a).

2.1. Variáveis Ambientais

As amostragens foram todas realizadas em ambiente fluvial (rio ou riacho) e as variáveis ambientais foram medidas nos pontos de coleta utilizando a metodologia descrita no trabalho de NECCHI et al. (1999). As seguintes variáveis químicas e físicas foram analisadas: pH, temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e velocidade da correnteza. Foram utilizados os seguintes equipamentos para aferi-las: medidor digital de qualidade da água “Yellow Springs Instruments, YSI556MPS” para (pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido), e fluxômetro mecânico

“General Oceanics 2030R” (velocidade da correnteza). Para detectar diferenças dos valores médios dos dados abióticos (parâmetros ambientais) entre as espécies das diferentes seções foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA, uma via) ao nível de confiança de $< 95\%$ ($p < 0,05$), seguida do teste de comparação múltipla “*a posteriori*” de Tukey (Tabela 6). Ambos os testes foram realizados com uso do pacote estatístico Minitab, versão 16 (Minitab Inc., E.U.A.) (RYAN et al., 1985). Outras características do ambiente também foram anotadas, tais como: tipo de substrato e condições de sombreamento, também segundo procedimentos descritos por NECCHI et al. (1999).

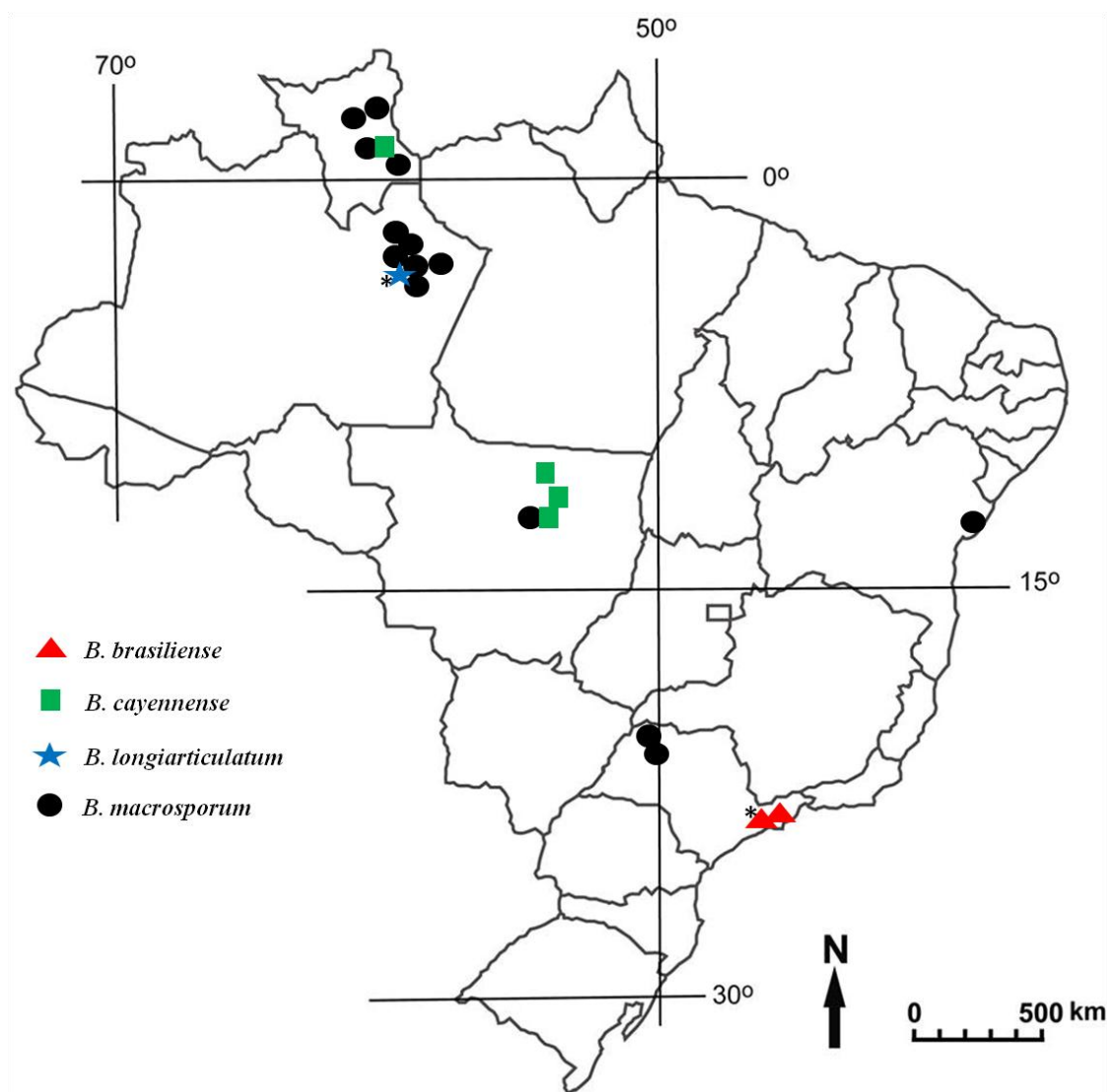


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando as localidades de coleta dos espécimes das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporum*. * indica a localidade-tipo das espécies brasileiras *B. brasiliense* e *B. longiarticulatum*.

Tabela 1. Relação das amostras de *Batrachospermum*, seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* utilizadas neste estudo.

Espécie	Código	Local, coletor e data
Seção <i>Acarposporophytum</i>		
1 - <i>Batrachospermum brasiliense</i>	SP1	SP: Paraibuna, Pousada Alto da Serra, Rio Negro, 23°33'48" S, 45°27'03" W, O. Necchi Jr., 23.ix.2006
Seção <i>Aristata</i>		
2 - <i>Batrachospermum cayennense</i>	MT1	MT: Sinop, BR-163, sentido Sinop-Santarém, 29 km da cidade, 11°36'05"S, 55°25'39"W, F.R. Borges, 25.ix.2011
3 - <i>Batrachospermum cayennense</i>	MT2	MT: Sinop, Rio Rosana, BR-163, altitude 332m 12°00'36"S, 55°31'01"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & F.R. Borges, 03.vi.2013
4 - <i>Batrachospermum cayennense</i>	MT3	MT: Claudia, Módulo I PPBio, 11°35'20"S, 55°17'35"W, F.R. Borges, 02.ix.2011
5- <i>Batrachospermum cayennense</i>	RR4	RR: Caracará, afluyente do Rio Itã, BR-174, Km 281, altitude 75m, 01°23'31"N, 60°38'39"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & D. C. Agostinho, 04.vii.2013
Seção <i>Macrospora</i>		
6 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM1	AM: Manaus, Reserva Florestal A. Ducke, Igarapé Acará, 2°57'06"S 57°57'01"W, O. Necchi Jr. & M.L. Vis, 19.viii. 2004
7 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM2	AM: Manaus, Rio Preto da Eva, 2°41'59"S 59°42'13"W, altitude 50m, O. Necchi Jr. & M.L. Vis, 20.viii.2004
8 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM4	AM: Manaus, Água Verge, 2°44'24"S 59°41'16"W, altitude 46m, O. Necchi Jr. & M.L. Vis, 20.viii.2004
9 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM11	AM: Manaus, Rio Preto, BR-174, Km 83, 2°15'20"S 60°02'08"W, altitude 87m, O. Necchi Jr. & M.L. Vis, 22.viii.2004
10 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM13	AM: Manaus, Tarumã, BR-174, Km 31, 2°41'35"S 60°02'56"W, altitude 41m, O. Necchi Jr. & M.L. Vis, 23.viii.2004
11 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	AM14	AM: Manaus, ASFRAMA 60m abaixo da cachoeira, 2°08'11"S 59°59'45"W, altitude 63m, O. Necchi Jr. & M. L. Vis, 23.viii.2004
12 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	BA	BA: Mata de São João, Rio Imbassaí, ca: 1 km do mar, 12°29'39"S, 37°57'03"W, L.H.Z. Branco & C.W.N. Moura, 23.viii.2011.
13 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	MT3	MT: Sinop, Rio Preto, BR-163 próximo ao Alto da Glória, 11°57'26"S, 55°31'03"W, altitude 371 m, O. Necchi Jr., A.S. Garcia Fo. & F.R. Borges, 03.vi.2013.
14 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	RR3	RR: Boa Vista, BR-174, Km 10, Balneário Aracati, altitude 104m, 02°49'35"N, 60°35'38"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & D. C. Agostinho, 03.vii.2013
15 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	RR4	RR: Caracará, BR-174, Km 281, afluyente do Rio Itã, altitude 75m, 01°23'31"N, 60°38'39"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & D. C. Agostinho, 04.vii.2013

Tabela 1. Continuação.

Espécie	Código	Local, coletor e data
16 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	RR5	RR: Caracaraí, BR-174, Igarapé Schuller, Km 260, 01°17'07"N, 60°31'16"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & D. C. Agostinho, 04.vii.2013
17 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	RR8	RR: Mucajaí, estrada para Roxinho, próximo ao trevo, 02°25'51"N, 61°02'23"W, O. Necchi Jr., A. S. Garcia Fo & D. C. Agostinho, 05.vii.2013
18 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	SP1	SP: Pontes Gestal, Rio Preto, Cachoeira de São Roberto, 20°11'11"S, 49°41'06"W, O. Necchi Jr. & A.S. Garcia Fo., 01.vi.2009
19 - <i>Batrachospermum macrosporum</i>	SP2	SP: Mirassol, Rio S. Jose dos Dourados, próximo Pesqueiro Apore, 20°48'45"S, 49°34'30"W, O. Necchi Jr. & M.O. Paiano, 08.v.2009

2.2. Preservação

Após a coleta, as amostras foram separadas, limpas e divididas em duas partes: 1) destinadas para análises morfológicas, e 2) destinadas para análises moleculares. Amostras para estudos morfológicos foram fixadas em solução de formaldeído a 4% (NECCHI, 1990b). Em seguida foram secas com papel toalha para redução da umidade e colocadas em frascos com sílica-gel (trocada por sílica seca uma ou duas vezes). Após o acondicionamento em frascos etiquetados, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C.

2.3. Análises Morfológicas

As análises morfológicas e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio estereoscópico binocular “Olympus SZH10” (Olympus America, Center Valley, PA, EUA) e microscópio binocular “Leica DM1000”, equipado com sistema de análise de imagem Leica composto de: câmera de vídeo digital Leica DFC 320 e software analisador de imagem Leica LAS (Leica Application Suite) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Adotou-se o critério proposto por Necchi (1990a) para análise dos caracteres quantitativos, sendo feitas 20 medições ou contagens para cada estrutura morfológica em cada uma das amostras.

Os caracteres diagnósticos para a identificação das espécies das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporum* foram analisados de acordo com a literatura relevante (KUMANO 1978, 1982; NECCHI 1990a, 1990b, 1990c; SHEATH et al. 1994, ENTWISLE & FOARD 1997, KUMANO 2002). Os seguintes caracteres foram anotados ou medidos em cada população: forma dos verticilos, abundância de fascículos secundários, disposição e número de células dos fascículos primários, origem, dimensões e número de células do ramo carpogonial, dimensões do carpogônio, forma do tricogínio, posição e dimensões do carposporófito, dimensões dos carposporângios, número de células dos filamentos gonimoblásticos (Figura 2). Alguns caracteres usualmente considerados de menor valor taxonômico também foram analisados para melhor caracterização das espécies: posição da célula apical (protrusa ou inclusa), comprimento dos internós, dimensões dos verticilos, espermatângios, células proximais e distais dos fascículos primários, e presença e diâmetro de conexões intercelulares no ramo carpogonial pós-fecundação.

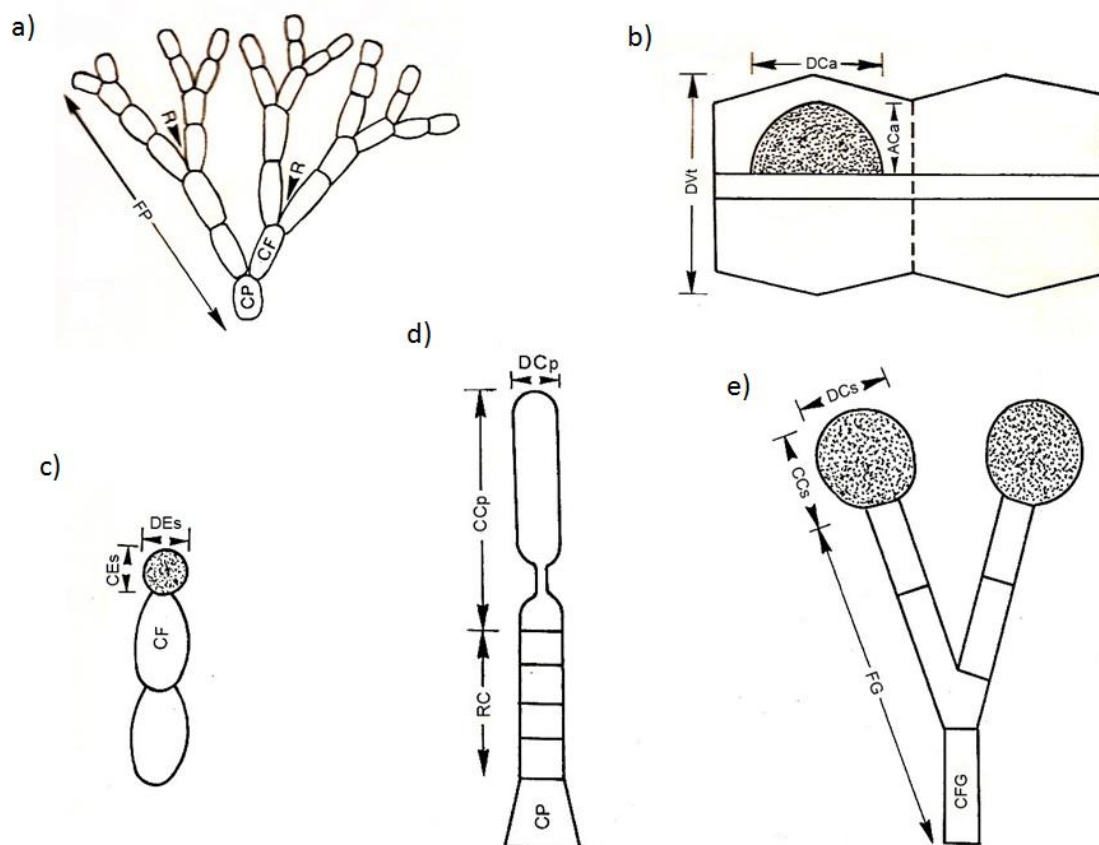


Figura 2. Representação esquemática dos caracteres morfológicos numéricos de *Batrachospermum*: a) CF - célula fascicular; CP - célula pericentral; FP - fascículo primário; R - ramificação; b) ACa - altura do carposporófito; DCa - diâmetro do carposporófito; DVt - diâmetro do verticilo; c) CEs - comprimento do espermatângio; CF - célula fascicular; DEs - diâmetro do espermatângio; d) CCp - comprimento do carpogônio; CP - célula pericentral; DCp - diâmetro do carpogônio; RC - ramo carpogonial; e) CCs - comprimento do carposporângio; CFG - célula do filamento gonimoblástico; DCs - diâmetro do carposporângio; FG - filamento gonimoblástico. Adaptado de NECCHI 1990a.

Os espécimes-tipo das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* foram analisados morfológicamente pelo exame de lâminas semipermanentes preparadas com solução de glicose de milho (diluída a 75%) e glutaraldeído, a fim de se determinar a afinidade dos espécimes brasileiros com as espécies descritas para as seções. As lâminas foram montadas a partir de exsiccatas provenientes dos herbários onde estão mantidas: Herbário PC (Museu Nacional de História Natural, Paris, França), Herbário SP (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) e Herbário do Departamento de Botânica do

Museu Nacional de Ciências e da Natureza (TNS) (Tsukuba, Japão) (THIERS, 2014 - Tabela 2). As lâminas semipermanentes foram etiquetadas e acondicionadas na exsicata junto ao seu respectivo espécime-tipo após análise morfológica.

Tablea 2. Relação dos espécimes-tipo de *Batrachospermum*, seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* do Herbário PC (coleção de Thuret), do Herbário SP (Instituto de Botânica) e do Herbário do Departamento de Botânica do Museu Nacional de Ciências e da Natureza (TNS) (Figuras 2 e 3).

Espécie		Tipo Nomenclatural	Código	Local	Coletor	Data
Seção <i>Acarposporophytum</i>						
1 -	<i>B. brasiliense</i> Necchi	holótipo	SP187180	Brasil, Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boracéia	O. Necchi Jr. & E A. Custodio Fo	13.iii.1984
Seção <i>Aristata</i>						
2 -	<i>B. beraense</i> Kumano	isótipo	TNS-AL 169181	Malásia, Pahang, Tasek Bera	S. Kumano	16.iv.1971
3 -	<i>B. cayennense</i> Montagne & Kützing	holótipo	PC348, PC0658048	Guiana Francesa, Cayenne	C. Le Prieur	...
4 -	<i>B. cylindrocellulare</i> Kumano	holótipo	TNS-AL 169083	Malásia, Pahang, Tasek Bera	S. Kumano	16.iv.1971
5 -	<i>B. longiarticulatum</i> Necchi	holótipo	SP187156	Brasil, Amazonas, Presidente Figueiredo	O. Necchi	29.i.1984
6 -	<i>B. turgidum</i> Kumano	holótipo	TNS-AL 169087	Japão, Mie, Gozaisho	R. Seto	11.v.1958
Seção <i>Macrospora</i>						
7 -	<i>B. equisetifolium</i> Montagne	holótipo	PC1109, PC0473668	Guiana Francesa, Monte Kaw, Gravier Creek	C. Le Prieur	...
8 -	<i>B. hypogynum</i> Ratnasabapathy & Kumano	isótipo	TNS-AL 169078	Malásia, Selangor, Sungai Pusu	M. Ratnasabapathy & S. Kumano	02.vi.1979
9 -	<i>B. macrosporum</i> Montagne	holótipo	PC1105	Guiana Francesa, Comté, Orapa	C. Le Prieur	...



Figura 3. Mapa mundial mostrando as localidades dos espécimes-tipo (Tabela 2), das espécies não brasileiras, das seções *Aristata* e *Macrospora*. As localidades dos espécimes-tipo brasileiros estão representadas na Figura 1. GF = Guiana Francesa; JP = Japão; MY = Malásia.

2.4. Análises Moleculares

As amostras foram trituradas isoladamente utilizando o homogeneizador de tecidos “Precellys™ 24” (Bertin Technologies, Bordeaux, França), com duas esferas de aço por tubo, em dois ciclos a 5.000 rpm durante 20s cada e intervalo entre os ciclos de 20s para extrair o DNA total (genômico). Após a maceração as extrações foram feitas com uso do kit de extração de DNA “Nucleo Spin plant II mini kit” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Alternativamente alguns outros kits foram testados, particularmente para material herborizado: “Extract-N-Amp™ Plant PCR kit” (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), “ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System” (Promega, Madison, EUA) e “PowerPlant™ Pro DNA Isolation kit” (MoBio Laboratories, Carlsbad, EUA), conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. As amostras de DNA foram armazenadas em ultra-freezer “Sanyo” (Sanyo North American Corporation, San Diego, E.U.A.), VIP™ SERIES (-86°C), modelo MDF-U33V.

2.5. Amplificação de DNA

As reações de PCR para os marcadores moleculares UPA, *rbcL* e *cox1* foram conduzidas utilizando os kits “TopTaq™ DNA Polimerase” (Qiagen, Hilden, Alemanha), Platinum™ DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) ou “puReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE HealthCare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), todos para volume total de 25 µL e concentração final de 40ng/µL. As misturas fornecidas nos kits contêm: dNTP (desoxinucleosídeos trifosfato), tampão de PCR e Taq polimerase. A essas misturas foram adicionados: água ultra pura (MiliQ),

oligonucleotídeos iniciadores 5' e 3' e DNA molde. Em cada reação de PCR foram feitos controles positivo e negativo. Foram utilizados os produtos de PCR do kit que apresentou os melhores resultados. As reações foram feitas em termocicladores “Techne Prime”, “Techgene TC-312” e “TC-512” (Techne, Burlington, Reino Unido).

Todos os kits de extração e de amplificação de DNA citados anteriormente foram testados com cinco amostras de herbário: *B. cayennense* (amostras - SP152529 e SP187907) e; *B. macrosporum* - (amostras SP177073, SP187333, SP187358). Especificamente para as amostras de herbário foram utilizados também “*primers*” para amplificar a região de “*minibarcodes*” do gene *cox1*.

Os oligonucleotídeos (iniciadores sintéticos) utilizados são descritos a seguir:

- **UPA** (SHERWOOD & PRESTING, 2007): F (5' - CGA CAG AAA GAC CCT ATG AA - 3') e R(5' - TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG - 3') para amplificar fragmentos de 370pb.

- **cox1** (SAUNDERS, 2005): GazF1 (5' - TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GG - 3') e GazR1 (5' - ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAY CA - 3') para amplificar fragmentos de 664 pb.

- **cox1 “minibarcodes”** (HUGHEY & GABRIELSON, 2012): COIm174 (5'- GAG CTA ACA CAA CCA GGT AAC - 3') e RhoR (5' - AGG AAA AGC CAT ATC WGG AC - 3') para amplificar fragmentos de 174pb; COIm264 (5' - CAA AYC AYA ARG ATA TYG GTA C - 3') e RhoR, para amplificar fragmentos de 264pb.

- **rbcL** (VIS et al., 2008): F160 (5'-CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC-3'), R897c (5'-CGT GAA TAT GTW GAR TTA CCD GC-3'), F650 (5'-ATT AAC TCT CAA CCA TTT ATG CG-3') e *rbcL* R (5'-ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC-3') para amplificar fragmentos de 1.282 pb.

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

- **UPA** (conforme SHERWOOD & PRESTING, 2007) - 94°C por 2 min (desnaturação inicial); 35 ciclos: 94°C por 20 s (desnaturação); 55°C por 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 30 s (extensão); 72°C por 10 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

- **cox1** (conforme SAUNDERS, 2005) - 94°C por 1 min (desnaturação inicial); 5 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min e 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 1 min e 30 s (extensão); 35 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min e 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 1 min (extensão); 72°C por 5 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

- **cox1 “minibarcodes”** (conforme HUGHEY & GABRIELSON, 2012) - 94°C por 4 min (desnaturação inicial); 38 ciclos: 94°C por 1 min (desnaturação); 45°C por 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 1 min (extensão); 72°C por 7 min (extensão final) e 4°C (armazenamento).

- **rbcl** (conforme VIS et al., 2008) - 95°C por 1 min (desnaturação inicial); 35 ciclos: 93°C por 30 segundos (desnaturação); 50°C por 30 s (anelamento dos “primers”); 72°C por 1 min e 30 s (extensão); 72°C por 10 min (extensão final); 4°C (armazenamento).

2.6. Eletroforese em gel de agarose

Os géis (0,7%) foram preparados com a diluição de 70 mg de agarose em 100 ml da solução-tampão TBE: tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os géis foram carregados com o produto amplificado e tampão de carregamento (azul de bromofenol 50%, EDTA 0,5 M, glicerol 30% e água destilada) na proporção de 4:1. As eletroforeses foram realizadas sob voltagem de 60 V, durante

45 minutos para UPA e *cox1* “*minibarcodes*”, e 60 minutos para *cox1* e *rbcL*. Utilizou-se marcador de tamanho “1 Kb DNA ladder” (Invitrogen, Gaithersburg, E.U.A.). A qualidade do DNA amplificado por PCR foi feita por estimativas visuais por comparação com o marcador. Os géis foram corados com “GelRedTM” (Biotium, Hayward, E.U.A.) e observações e captura de imagens em fotodocumentador “Mini Bis Pro” e software “Gel CaptureTM” (Micro Photonics, Allentown, E.U.A.).

2.7. Purificação e quantificação dos produtos de PCR

As purificações dos produtos de PCR foram feitas com uso dos kits “Nucleo SpinTM Gel and PCR Clean-Up” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e “Wizard SV Clean-up System” (Promega) e “GFXTM PCR” (GE Healthcare), conforme os protocolos dos fabricantes. Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados no espectrofotômetro “Libra Biochrom S60 Double Beam” com acessório de medidas microvolumétricas “BioDropTM 500” (Biochrom, Reino Unido).

2.8. Sequenciamento e alinhamento

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático “ABI PRISM 3130xl” (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, E.U.A.) utilizando o kit “Big Dye Terminator”, versão 3.0 (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas no Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas e as amostras precipitadas foram enviadas para sequenciamento na empresa “Genomic Engenharia Molecular” (<http://www.genomic.com.br>). Os três marcadores moleculares utilizados neste estudo (UPA, *cox1* e *rbcL*) foram sequenciados em ambas as direções. Para

sequenciamento das amostras de *rbcL* foram utilizados os primers conforme VIS et al. (1998) e descritos acima (F160, R897c, F650 e *rbcLR*).

As sequências obtidas foram carregadas diretamente no software “Geneious” versão 6.1 (DRUMMOND, et al. 2012). A qualidade das sequências foi verificada por visualização dos cromatogramas com os recursos do programa. As sequências com má qualidade foram descartadas, sendo refeita a reação de sequenciamento. Persistindo o problema novos produtos de PCR foram preparados para sequenciamento.

As sequências de cada amostra foram alinhadas individualmente para obter-se a sequência completa (consenso), e cada sequência consenso foi comparada com as demais geradas nesse estudo, bem como com aquelas disponíveis no “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As comparações foram feitas através da ferramenta “search” do software “Geneious” buscando a homologia (valor mínimo definido de 97,5%) entre as sequências geradas com as dos grupos de interesse já identificadas em outros trabalhos. Uma matriz única de dados foi construída com as sequências consenso de todas as amostras e as sequências de interesse do “GenBank”.

2.9. Análises Filogenéticas

As sequências adicionais dos marcadores moleculares utilizados neste estudo para espécies do gênero *Batrachospermum* disponíveis no “GenBank” foram utilizadas para complementar o conjunto de dados gerado (Tabelas 3 - 5), enquanto que as de outras espécies do gênero, da família Batrachospermaceae e da ordem Batrachospermales foram incluídas como grupos externos. Para as árvores de UPA e *cox1* foram utilizadas como grupo externo sequências dos respectivos marcadores geradas a partir de uma amostra de *B. helminthosum* (Paraibuna, São Paulo) ainda não

publicadas. Matrizes com as sequências de consenso para cada marcador molecular foram montadas com uso do programa “Geneious”. Na construção das matrizes foram removidas as regiões correspondentes aos “*primers*” ou de alinhamento ambíguo. As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) (SCHNEIDER 2003) para as sequências de *rbcL*, e distância (“neighbor joining”, NJ) para as de UPA e *cox1*. Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados como valores de suporte de “bootstrap” com 10.000 réplicas de buscas heurísticas, gerando árvores de consenso com o critério de > 70% de semelhança nos ramos das árvores. A construção das árvores filogenéticas foi feita utilizando o programa jModeltest 2 (DARRIBA et al. 2012, <https://code.google.com/p/jmodeltest2/>) para definição do modelo mais apropriado de evolução do DNA (substituição nucleotídica). As análises de distância (NJ) foram conduzidas utilizando o software “PAUP 4.0b8” (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2003).

Para análise de MV as matrizes de dados foram exportadas para o formato PHYLIP e analisadas no software RAxML, versão RAxMLGUI 0.9b1 (STAMATAKIS, 2006; SILVESTRO & MICHALAK 2010). A AB foi conduzida com uso do software MrBayes v3.1b4 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2003), dentro do pacote MacIntosh Genetic Data Environment (Mac GDE, Steven Smith) versão 2.4. Para estas análises foram definidos quatro cadeias de Markov e 10.000.000 de gerações, amostradas a cada 100 gerações, com probabilidades posteriores (PP) calculadas utilizando as 1.000 árvores finais. O valor mínimo (“burn-in”) foi checado com o programa Tracer v. 1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2007)

As análises de MV e AB com base nos dados de *rbcL* foram rodadas com uso do modelo de distância GTR + I + G (“General Time Reversible”), com os seguintes

parâmetros: distribuição gama = 0,8740; proporção de sítios invariáveis = 0,5060; frequência de bases A = 0,3513, C = 0,1068, G = 0,1861, T = 0,3558, e matriz da taxa de substituição A-C = 8,4196, A-G = 8,0670, A-T = 3,6351, C-G = 3,8649, C-T = 47,1938, G-T = 1,0000.

Tabela 3. Sequências de UPA obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises (Figura 4).

Espécie	Acesso "Genbank"	Localidade¹	Referência
<i>B. cayennense</i>	EU628670	Guiana Francesa, Kourou/Sinnamary, riacho na Rodovia N°1	Sherwood et al., (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU628673	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Sherwood et al., (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU628674	Brasil, SP, Parati/Ubatuba, Rio Puruba	Sherwood et al., (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU628675	E.U.A., MS, Cypress Creek	Sherwood et al., (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU628676	E.U.A., NC, Stream of Lobelia	Sherwood et al., (2008)

¹ MS = Missouri, NC = Carolina do Norte.

Tabela 4. Sequências de *cox1* obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises (Figura 5 a 7).

Espécie	Acesso "Genbank"	Localidade¹	Referência
<i>B. cayennense</i>	EU636726	Guiana Francesa, Kourou/Sinnamary, riacho na Rodovia N°1	Sherwood et al., (2008)
<i>B. cayennense</i>	EU095971	Guiana Francesa	House et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU095974	Guiana Francesa	House et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636747	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636748	Brasil, SP, Parati/Ubatuba, Rio Puruba	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636749	Brasil, SP, Parati/Ubatuba, Rio Puruba	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636750	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636751	E.U.A., AL, Seabury Creek	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636753	E.U.A., NC, Stream of Lobelia	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636756	E.U.A., AL, Seabury Creek	Sherwood et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU636757	E.U.A., MS, Leaf	Sherwood et al. (2008)

¹ AL = Alabama, MS = Missouri, NC = Carolina do Norte.

Tabela 5. Sequências de *rbcL* obtidas do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas (Figura 8 a 10).

Espécie	Acesso "Genbank "	Localidade¹	Referência
<i>B.cayennense</i>	AF209980	Austrália, NT, Wangi Falls	Vis & Entwisle (2000)
<i>B.cayennense</i>	AY423392	Guiana Francesa, Cayenne, cachoeira próximo a rodovia N2	Vis et al. (2005)
<i>B. cylindrocellulare</i>	KF557568	Malásia, Pahang, Tasek Bera	Vis et al. (2013)
<i>Audouinella macrospora</i>	AB503216	Japão, OK, Senbaru-ike	Kato et al. (2008)
<i>Chantransia macrospora</i>	AY423410	Guiana Francesa, Cayenne, Crique Boulanger Carbet	Chiasson et al. (2003)
<i>Chantransia macrospora</i>	AY423417	Bolívia, Coroico, Rio Bagate	Chiasson et al (2003)
<i>Chantransia macrospora</i>	JF701678	Brasil, ES, Domingos Martins, Pedra Azul, Rodovia ES-165	Necchi & Oliveira (2011)
<i>B. macrosporum</i>	AY423406	Guiana Francesa, Le Bagne des Annamites, riacho próximo a rodovia	Vis et al. (2005)
<i>B. macrosporum</i>	EU106051	E.U.A., MS, Biloxi River	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106052	E.U.A., AL, Mobile, Creek Crossing Country	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106054	E.U.A., NC, Fort Bragg, Lobelia Road	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106057	Brasil, SP, Parati/Ubatuba, Rio Puruba	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106059	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106060	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Vis et al. (2008)
<i>B. macrosporum</i>	EU106063	Brasil, AM, Manaus, Rio Preto da Eva	Vis et al. (2008)

¹ AL = Alabama, MS = Missouri, NC = Carolina do Norte, NT = Território Norte, OK = Okinawa.

3. Resultados

3.1. Variáveis ambientais

As variáveis ambientais foram medidas para 16 dos 19 pontos de coleta (Tabela 6). As espécies das três seções foram coletadas em rios/riachos com as seguintes condições:

B. brasiliense (Seção *Acarposporophytum*) - água levemente ácida (pH 6,2), temperatura moderada (18,3°C), concentração iônica bastante baixa (condutividade 5 $\mu\text{S.cm}^{-1}$), alta oxigenação (oxigênio dissolvido 9,1 mg.L^{-1} , saturação de 95,7%), e correnteza moderada (velocidade 40 cm.s^{-1}). Esta espécie foi encontrada apenas em Floresta Ombrófila Densa (Tabela 6), em trecho parcialmente sombreado.

B. cayennense (Seção *Aristata*) - águas ácidas (pH $5,9 \pm 0,0$, média $\pm$ desvio-padrão), temperaturas elevadas ($25,2 \pm 2,5$ °C), concentração iônica predominantemente baixa (condutividade $15,2 \pm 25,9$ $\mu\text{S.cm}^{-1}$), moderada a alta oxigenação (oxigênio dissolvido $5,6 \pm 1,1$ mg.L^{-1} , saturação de $63,5 \pm 11,4\%$), e correnteza rápida (velocidade 70 ± 32 cm.s^{-1}). Os pontos de amostragem foram parcialmente sombreados e situados apenas em Floresta Ombrófila Densa (Tabela 6).

B. macrosporum (Seção *Macrospora*) - águas ácidas a levemente ácidas (pH $5,3 \pm 0,7$), temperaturas elevadas ($24,8 \pm 2,2$ °C), concentração iônica predominantemente baixa (condutividade $15,5 \pm 27$ $\mu\text{S.cm}^{-1}$), moderada a elevada oxigenação (oxigênio dissolvido $5,5 \pm 1,2$ mg.L^{-1} , saturação de $66,5 \pm 14,8\%$) e correnteza lenta a moderada (velocidade $37,8 \pm 27,6$ cm.s^{-1}). Os pontos de amostragem foram parcialmente

sombreados (61,5%), menos frequentemente sombreados (23%) e abertos (15,5%). Os espécimes foram encontrados em três biomas brasileiros: Floresta Ombrófila Densa (77%), Floresta Estacional Semidecidual (15,5%) e Cerrado “*senso lato*” (7,7%) (Tabela 6).

Os resultados de ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey revelaram diferenças significativas entre as espécies *B. cayennense* e *B. macrosporum* em relação à *B. brasiliense* para temperatura ($F = 4,55$) e concentração de oxigênio dissolvido ($F = 4,27$), ambos com $p < 0,05$. As espécies *B. cayennense* e *B. macrosporum* ocorrem em águas com temperaturas mais elevadas e de moderada a alta oxigenação; enquanto que *B. brasiliense* ocorre preferencialmente em águas de temperatura moderada e de alta oxigenação. As demais variáveis (pH, condutividade e velocidade de correnteza) não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 6. Condições ambientais e biomas em cada ponto amostrado. Códigos das amostras conforme Tabela 1.

Amostra	pH	Temperatura	Condutividade	Oxigênio dissolvido	Velocidade	Condição de	Bioma**
		(°C)	(μS.cm ⁻¹)	(mg.L ⁻¹) ;	correnteza*	Sombreamento	
				Saturação (%)	(cm.s ⁻¹)		
Seção <i>Acarposporophytum</i>							
<i>B. brasiliense</i> Bb-SP1	6,2	18,3	5	9,1; 52,6	40	Parcialmente	FOD
Seção <i>Aristata</i>							
<i>B. cayennense</i> Bc-MT2	5,9	25,1	1	5,9; 71,6	93	Parcialmente	FOD
<i>B. cayennense</i> Bc-RR4	5,9	25,9	8	4,5; 55,4	44	Parcialmente	FOD
Seção <i>Macrospora</i>							
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM1	4,3	24,4	4	4,6; 54,4	20	Sombreado	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM2	4,7	25,5	1	4,4; 55,4	25	Parcialmente	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM4	4,5	24,4	2	7,1; 83,2	40	Parcialmente	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM11	4,9	26,8	3	6,7; 82, 6	60	Sombreado	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM13	4,6	24,3	3	6,6; 77, 9	17	Aberto	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-AM14	4,6	25,1	3	8,1; 96,9	3	Parcialmente	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-MT3	5,8	24,8	2	5,5; 66,2	24	Aberto	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-RR3	5,6	28,8	6	4,7; 60	40	Parcialmente	CER
<i>B. macrosporum</i> Bm-RR4	5,9	25,9	8	4,5; 55,4	44	Parcialmente	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-RR5	5,5	25,6	9	4,7; 57	23	Sombreado	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-RR8	5,9	25,9	8	5,9; 72,9	110	Parcialmente	FOD
<i>B. macrosporum</i> Bm-SP1	---	21,3	79	4,7; 52,4	----	Parcialmente	FES
<i>B. macrosporum</i> Bm-SP2	6,7	20	73	4,6; 49,7	48	Parcialmente	FES

* Média (n = 5)

** CER - Cerrado “senso lato”; FES - Floresta Estacional Semidecidual; FOD - Floresta Ombrófila Densa (conforme Ab’Saber 2006)

3.2. Análises moleculares

No presente estudo foi gerado um total de 46 novas sequências envolvendo os três marcadores moleculares utilizados, consistindo de 19 sequências para UPA, 14 sequências para *cox1* e 12 sequências de *rbcL*. Para as amostras das seguintes espécies não foi possível obter produtos de PCR minimamente satisfatórios mesmo após várias tentativas: *B. cayennense* (amostras MT2, MT3, SP152529 e SP187907) e *B. macrosporum* (amostras AM2, AM4, AM11, BA, RR3, RR4, RR5, RR8, SP177073, SP187333 e SP187358). Nas novas tentativas foram experimentados novos kits de extração, “primers” e/ou *taq* polimerase (conforme especificados em material e métodos) e alguns ajustes nos ciclos de temperatura das reações de PCR. Ainda assim não tivemos sucesso na amplificação dessas amostras para alguns marcadores, inclusive para o *cox1* “minibarcodes” para as amostras em exsiccatas provenientes de herbário.

3.2.1. Análise das sequências de UPA

As sequências das amostras das duas seções estudadas (com 370 pb de extensão) formaram grupos monofiléticos distintos com alto suporte (“bootstrap” > 95%) (Figura 4): o complexo de espécies *B. cayennense*, representando a seção *Aristata* e *B. macrosporum* representando a seção *Macrospora*. Não foi possível obter sequência de *B. brasiliense* deste marcador.

As sequências dos espécimes identificados morfológicamente como *B. cayennense* (Seção *Aristata*) apresentaram variação muito ampla 0-32 pb (0-8,6%) e posicionaram-se na árvore formando três grupos distintos, sendo um deles sustentado

por alto suporte, outro com suporte moderado e um deles sem suporte (Tabela 6; Figura 4). Esta topologia e níveis de divergência registrados indicam tratar-se de um complexo com pelo menos duas espécies molecularmente distintas, possivelmente crípticas. As sequências das amostras de *B. cayennense* (MT3 e EU628670 - Guiana Francesa) foram idênticas e apresentaram grande divergência em relação às demais sequências, sendo de 32 pb (8,7%) em relação à amostra de RR4 e de 27-29 pb (7,3-7,9%) em relação às amostras de MT1 e MT2. As sequências das amostras MT1 e MT2 divergiram entre si em apenas 2 pb (0,5%), e em relação à amostra RR4 em 6-8 pb (1,6-2,2%).

Dentre as sequências de *B. macrosporum* para este marcador (14 geradas neste estudo e quatro disponíveis no “GenBank”) houve uma variação intraespecífica de 0-3 pb (0-0,8%), que sugere possivelmente tratar-se de uma única espécie (Tabela 6; Figura 4). Apesar de algumas sequências apresentarem aparente tendência de agrupamento biogeográfico (continentes e regiões), esses ramos não tiveram valores de suporte suficientemente altos (< 70%) para serem tratadas como grupos. As amostras de *B. macrosporum* provenientes da América do Norte (EU628675 e EU628676) divergiram entre si em apenas 1 pb (0,3%), e quando comparadas com as sequências da América do Sul divergiram em 1-3 pb (0,3-0,8%). A divergência constatada entre as sequências da América do Sul foram de 0-3 pb (0-0,8%). As sequências provenientes de São Paulo (SP1 e SP2 e EU628674) foram idênticas entre si e posicionaram-se separadas das sequências das amostras provenientes das regiões norte e nordeste do Brasil.

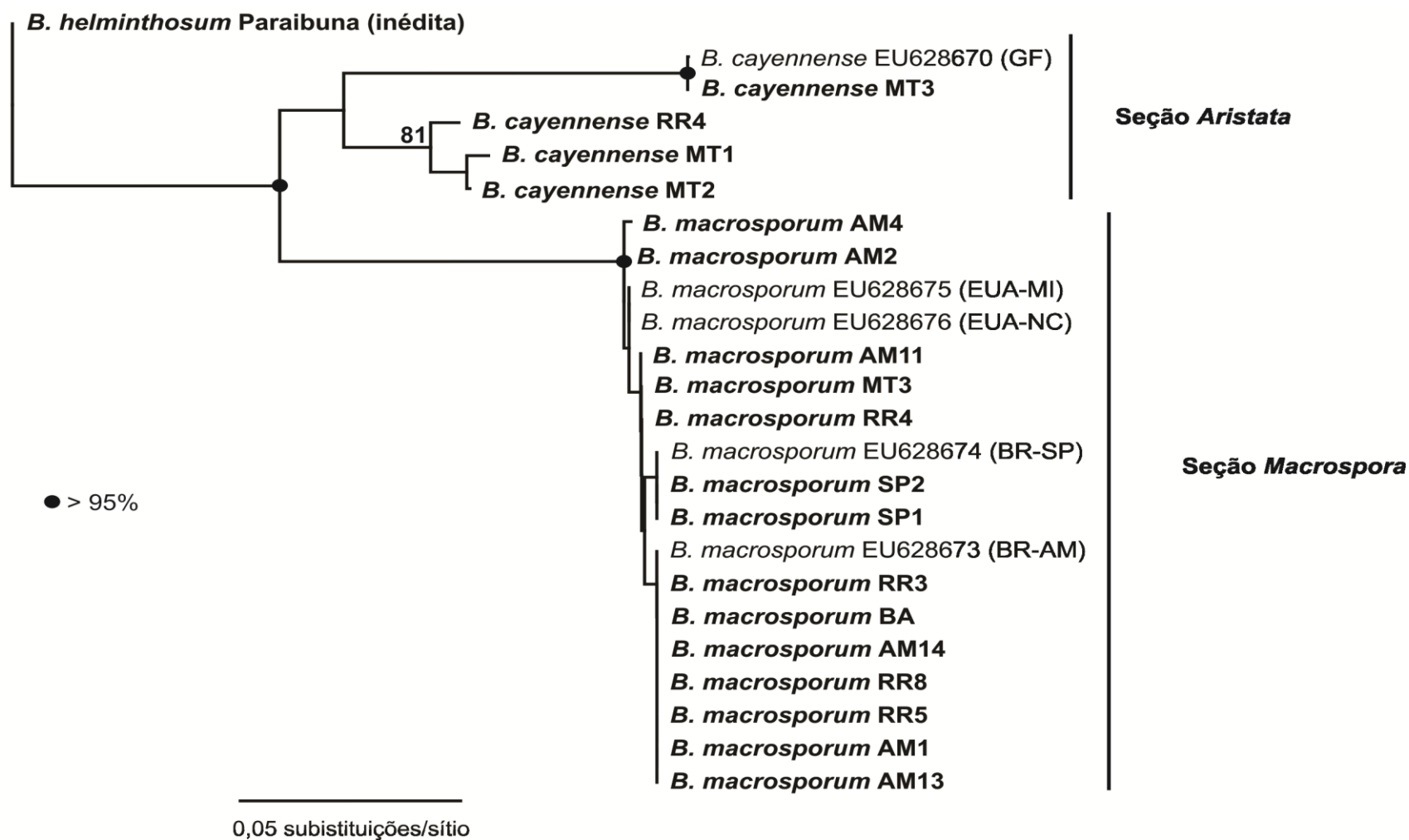


Figura4: Árvore de distância (“neighbor joining”) gerada com base nas sequências do marcador plastidial UPA. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”, nós sem valores de “bootstrap” indicam suporte < 70%.

Tabela 6. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências de UPA dos espécimes das seções *Aristata* e *Macrospora* do Brasil, Guiana Francesa* e Estados Unidos**. As sequências geradas neste estudo estão em negrito (códigos conforme Tabela 1).

Sequência	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Seção <i>Aristata</i>																							
1 - <i>B. cayennense</i> EU628670 *	...	0	32	27	29	37	38	39	39	39	39	39	39	38	39	38	39	39	39	37	37	37	39
2 - <i>B. cayennense</i> MT3	0	...	32	27	29	37	38	39	39	39	39	39	39	38	39	38	39	39	39	37	38	37	39
3 - <i>B. cayennense</i> RR4	8,6	8,6	...	8	6	28	29	30	30	30	30	30	30	29	30	29	30	30	30	28	29	28	30
4 - <i>B. cayennense</i> MT2	7,3	7,3	2,2	...	2	30	31	32	32	32	32	32	32	31	32	31	32	32	32	30	31	30	32
5 - <i>B. cayennense</i> MT1	7,8	7,8	1,6	0,5	...	30	31	32	32	32	32	32	32	31	32	31	32	32	32	30	30	30	32
Seção <i>Macrospora</i>																							
6 - <i>B. macrosporum</i> EU628676**	10	10	7,6	8,1	8,1	...	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
7 - <i>B. macrosporum</i> EU628675**	10,3	10,3	7,8	8,4	8,4	0,3	...	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3
8 - <i>B. macrosporum</i> EU628674	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	...	2	0	0	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
9 - <i>B. macrosporum</i> EU628673	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	...	2	2	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	2	0
10 - <i>B. macrosporum</i> SP1	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0	0,5	...	0	2	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2	2
11 - <i>B. macrosporum</i> SP2	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0	0,5	0	...	2	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2	2
12 - <i>B. macrosporum</i> RR8	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	...	0	1	0	1	0	0	0	2	3	2	0
13 - <i>B. macrosporum</i> RR5	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	...	1	0	1	0	0	0	2	3	2	0
14 - <i>B. macrosporum</i> RR4	10,3	10,3	7,8	8,4	8,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	...	1	0	1	1	1	1	2	1	1
15 - <i>B. macrosporum</i> RR3	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0,3	...	1	0	0	0	2	3	2	0
16 - <i>B. macrosporum</i> MT3	10,3	10,3	7,8	8,4	8,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0	0,3	...	1	1	1	1	2	1	1
17 - <i>B. macrosporum</i> BA	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0,3	0	0,3	...	0	0	2	3	2	0
18 - <i>B. macrosporum</i> AM14	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0,3	0	0,3	0	...	0	2	3	2	0
19 - <i>B. macrosporum</i> AM13	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0,3	0	0,3	0	0	...	2	3	2	0
20 - <i>B. macrosporum</i> AM11	10	10	7,6	8,1	8,1	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	...	3	2	2
21 - <i>B. macrosporum</i> AM4	10	10,3	7,8	8,4	8,1	0,5	0,8	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,8	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	...	1	3
22 - <i>B. macrosporum</i> AM2	10	10	7,6	8,1	8,1	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	...	2
23 - <i>B. macrosporum</i> AM1	10,5	10,5	8,1	8,6	8,6	0,5	0,8	0,5	0	0,5	0,5	0	0	0,3	0	0,3	0	0	0	0,5	0,8	0,5	...

3.2.2. Análise das sequências de *cox1*

Todas as sequências utilizadas nesta análise e a matriz final possuem 664 pb. As sequências das seções *Aristata* e *Macrospora* formaram dois grupos monofiléticos distintos na árvore com alto suporte (bootstrap > 95%) (Figuras 4 e 5), que consistem em dois grupos de espécies: o complexo *B. cayennense*, representando a seção *Aristata*, e o complexo *B. macrosporum*, representando a seção *Macrospora*. (Figuras 5 a 7). Não foi possível obter sequência de *B. brasiliense* deste marcador.

As sequências dos espécimes identificados morfologicamente como *B. cayennense* (seção *Aristata*), apresentaram ampla variação 0-97 pb (0-14,6%) e posicionaram-se na árvore formando três grupos distintos (grupos 1-3), sendo dois deles sustentados por alto suporte e outro, porém, sem suporte (Tabela 7; Figuras 5 e 6).

Estes níveis de divergência e topologia registrados indicam tratar-se de um complexo com três espécies molecularmente distintas, possivelmente crípticas. As sequências de *B. cayennense* do grupo 1 (MT3; EU636726 e EU095971 - Guiana Francesa) apresentaram pequena divergência entre si 0-4 pb (0-0,6%), que indica MT3 como população brasileira muito semelhante aos espécimes coletados próximos a localidade-tipo para esta espécie. As sequências deste grupo divergiram substancialmente das demais, sendo de 43-48 pb (6,5-7,3%) em relação à amostra de MT1 (grupo 2) e de 96-97 pb (14,4-14,6%) em relação às amostras de MT2 e RR4 (grupo 3). As sequências das amostras do grupo 3 (MT2 e RR4) divergiram entre si em apenas 6 pb (0,9%), e em relação à amostra MT1 (grupo 2) em 43-48 pb (6,6-7,3%).

As sequências dos espécimes identificados morfologicamente como *B. macrosporum* (seção *Macrospora*), tiveram uma variação ampla de 0-69 pb (0-10,4%), e posicionaram-se na árvore formando oito grupos distintos (grupos 4-11), todos eles

sustentados por alto suporte (Tabela 7; Figuras 5 e 7). Estes níveis de divergência e topologia registrados indicam tratar-se de um complexo com sete espécies molecularmente distintas, possivelmente crípticas. A maioria destes grupos apresentou tendência de agrupamento biogeográfico (continentes, biomas e regiões), todos sustentados por alto suporte. As amostras de *B. macrosporum* provenientes da América do Norte (EU636751, EU636753, EU636756 e EU636757 - grupo 4) divergiram entre si em 2-5 pb (0,3-0,8%), e quando comparadas com as sequências da América do Sul (demais grupos) divergiram em 59-69 pb (8,9-10,4%). As sequências da América do Sul divergiram entre si em 26-57 pb (3,9-8,6%). As sequências provenientes de São Paulo (SP1, SP2, EU636748 e EU636749 - grupo 7) apresentaram divergência entre si de 3-4 pb (0,4-0,5%) e divergiram em 41-57 pb (6,2-8,3%) das sequências das amostras provenientes da região amazônica (Guiana Francesa e das regiões centro-oeste - Mato Grosso e norte - Amazonas e Roraima) do Brasil (grupos 5, 6, 8, 9, 10 e 11). A sequência da amostra proveniente de Mato Grosso (MT3 - grupo 5) posicionou-se relativamente distante e mais basal em relação as demais sequências sul-americanas, divergindo em 28-43 pb (4,4-6,5%). As sequências do grupo 6 (EU095974 - Brasil e EU636747 - Guiana Francesa) foram idênticas, e divergiram em 35-52 pb (5,2-8,2%) dos demais grupos de sequências com amostras brasileiras (grupos 7-11).

Os grupos 8-11 contêm apenas sequências de amostras de regiões amazônicas e podem ser resumidos da seguinte maneira: grupo 8 (amostras de Roraima - RR4, RR5 e RR8) apresentaram pequena divergência entre si 4-6 pb (0,7-1%), e 26-43 pb (3,9-6,5%) de divergência em relação aos grupos 9-11; o grupo 9 (amostras de Amazonas - AM1, AM13 e AM14 e de Roraima - RR3) apresentaram pequena divergência entre si 2 pb (0,3%), e 30-35 pb (4,5-5,3%) em relação aos grupos 10 e 11; e o grupo 10 (apenas uma amostra de Amazonas - AM1) divergiu em 27-28 pb (4,0-4,3%) em relação ao grupo

11; e, o grupo 11 (amostras de Amazonas - AM13 e AM14) apresentaram divergência entre si de 7 pb (1,0%)

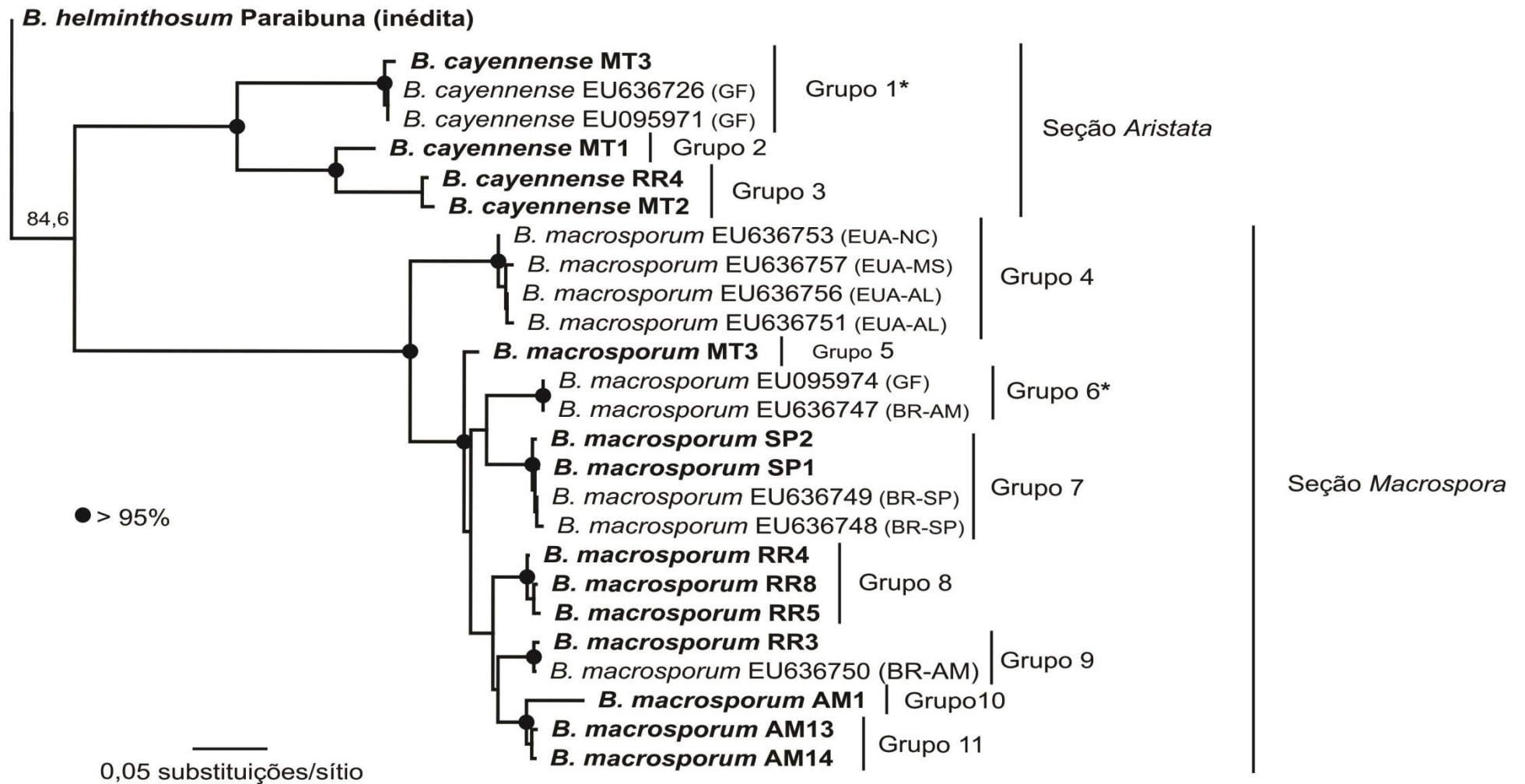


Figura 5. Árvore de distância (“neighbor joining”) gerada com base nas sequências da região de “barcode” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”, nós sem valores de “bootstrap” indicam suporte < 70%. * indica o grupo que contém sequências obtidas a partir de espécimes coletados próximo a localidade-tipo de *B. cayennense* e *B. macrosporum*.

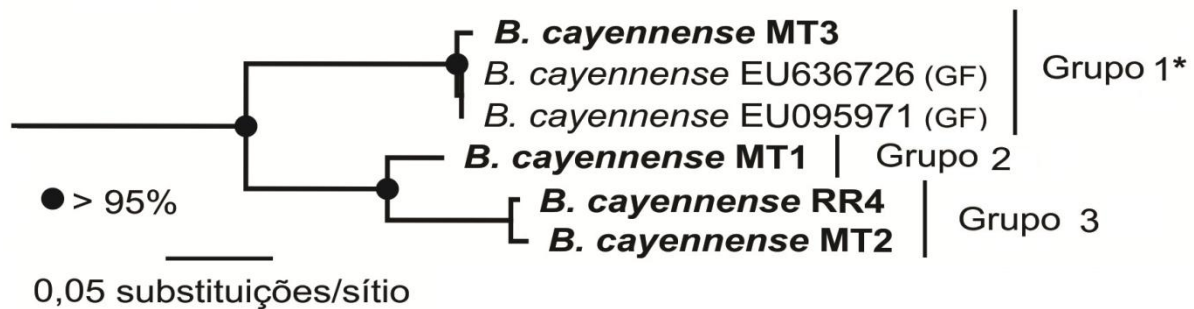


Figura 6. Árvore de distância (idem Figura 5) destacando a seção *Aristata* com três grupos (Complexos 1, 2 e 3) principais contendo sequências do Brasil e Guiana Francesa (GF). * indica o grupo que contém sequências obtidas a partir de espécimes coletados próximo a localidade-tipo de *B. cayennense*.

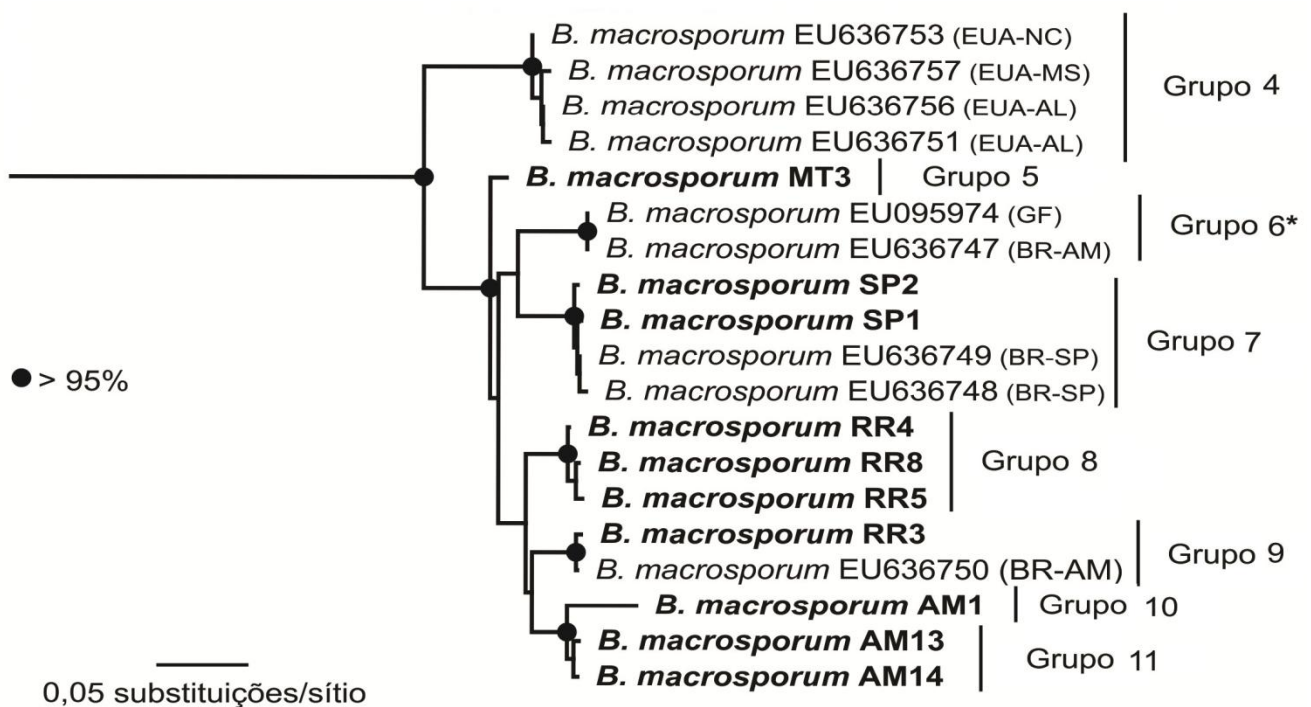


Figura 7. Árvore de distância (idem Figura 5) destacando o complexo *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) com sete grupos (Grupos 4 - 11) contendo sequências do Brasil, Estados Unidos e Guiana Francesa (GF). * indica o grupo que contém uma sequência obtida a partir de um espécime coletado próximo a localidade-tipo de *B. macrosporum*. AL = Alabama, MS = Missouri, NC = Carolina do Norte

Tabela 7. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre os grupos de sequências dos espécimes pertencentes aos complexos *B. cayennense* (seção *Aristata*) e *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) do Brasil, Estados Unidos e Guiana Francesa da região de “barcode” do gene *cox1*. As células em destaque apresentam os valores de variação interna (porcentagem/número de nucleotídeos) de cada grupo.

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Seção Aristata</i>											
1	0-0,6 / 0-4	96-96	56-59	130-132	127	128	126-128	126-128	131-132	136	133-135
2	14,4-14,5	0	48	124-127	130	128	125-126	12-131	127-128	134	131-133
3	8,4-8,9	7,2	0,9 / 6	126-130	133-135	133-136	130-133	131-135	131-134	141-142	137-143
<i>Seção Macrospora</i>											
4	19,6-19,9	18,7-19,2	19,0-19,6	0,3-0,8 / 2-5	62-65	65-69	63-67	59-65	65-68	68	62-68
5	19,2	19,6	20,1-20,4	9,3-9,8	0	35	28-30	35-39	39	43	38-43
6	19,3	19,3	20,1-20,5	9,8-10,4	5,2	0	36-37	35-41	46	52	50-52
7	19,0-19,3	18,9-19	19,6-20,1	9,5-10,1	4,4-4,8	5,4-5,6	0,4-0,5 / 3-4	41-46	46-48	55-57	45-50
8	19,0-19,3	19,3-19,8	19,8-20,4	8,9-9,8	5,2-5,9	5,2-6,2	6,2-6,9	0,7-1,0 / 4-6	26-30	39-43	34-40
9	19,8-19,9	19,2-19,3	19,8-20,2	9,8-10,2	5,9	6,9	6,9-7,2	3,9-4,5	0,3 / 2	35	30-35
10	20,5	20,2	21,3-21,4	9,8-10,3	6,5	8,2	8,3-8,6	5,9-6,5	5,3	0	27-28
11	20,1-20,4	19,8-20,1	20,7-21,6	9,3-10,2	5,7-6,5	7,5-8,1	6,8-7,5	5,1-6,0	4,5-5,3	4,0-4,3	1,0 / 7

3.2.3. Análise das sequências de *rbcL*

As sequências utilizadas nesta análise são parciais, possuem 1.282 pb, com exceção das sequências de *B. brasiliense* (seção *Acarposporophytum*) que tem 1.256 pb, *B. cayennense* AF209980 com 1.281 pb (seção *Aristata*), *Audouinella macrospora* com 1.226 pb, *Chantransia macrospora* e *B. macrosporum* KF557556 com 1.252 pb (seção *Macrospora*); a matriz final possui 1282 pb. As árvores de consenso MV e de BA evidenciaram as seções *Aristata* e *Macrospora* como dois clados com alto suporte de bootstrap (BS > 95%) e de probabilidade posterior (> 0,95) (Figuras 8 e 10), e a seção *Acarposporophytum* como um clado com bom suporte BS (84%) e alto valor de PP (> 0,95). Dentro das seções *Aristata* e *Macrospora*, pode-se distinguir dois grupos de espécies: o complexo *B. cayennense* e *B. cylindrocellulare*, representando a seção *Aristata*, e o complexo *B. macrosporum*, representando a seção *Macrospora*. As seções *Acarposporophytum* e *Aristata* posicionaram-se como grupos irmãos em um ramo longo com alto suporte, divergiram entre si em 178-198 pb (14,0-15,7%; Tabela 8). As análises revelaram que os grupos irmãos dessas duas foram as seções *Turfosa* e *Virescentia*. A seção *Macrospora* posicionou-se em um ramo longo com alto suporte e como grupo mais basal dentre os membros de Batrachospermaceae, exceto o gênero *Kumanoa* (Figura 8).

Tabela 8. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre os conjuntos de sequências de *rbcL* dos espécimes das seções *Acarposporophytum* e *Macrospora*, *Aristata* analisadas neste estudo. As células em destaque apresentam os valores de variação interna (porcentagem/número de nucleotídeos) de cada grupo

Seções	1	2	3
1 - <i>Acarposporophytum</i>	...	178-198	201-218
2 - <i>Aristata</i>	14,0-15,7	6,5-12,1 / 83-155	166-259
3 - <i>Macrospora</i>	16,6-17,3	12,9-20,2	0-6,6 / 0-85

As sequências dos espécimes identificados morfologicamente como *B. cayennense*, apresentaram variação muito ampla 0-182 pb (0-14,7%) e posicionaram-se na árvore formando três clados distintos, todos eles sustentados por alto suporte de PP e alguns de BS suporte (Figuras 8 e 9; Tabela 8). Dentre eles o clado com a sequência da amostra RR4 (com alto suporte), e situou-se isolada e basalmente em relação aos clados com espécimes das seções *Acarposporophytum* e *Aristata*. A sequência da amostra RR4 divergiu em 180 pb (14,3%) em relação às sequências de *B. brasiliense* (seção *Acarposporophytum*) e da seção *Aristata* em 177-184 pb (13,9-14,4%). A divergência entre RR4 e as sequências da seção *Aristata* foram de 162-182 pb (12,7-14,7%; Tabela 8).

As sequências dos espécimes pertencentes à seção *Aristata* (o complexo *B. cayennense* - AF20998, AY423392 e MT1 - e *B. cylindrocellulare*) apresentaram variação ampla de 83-155 pb (6,5-12,1%; Tabela 8). A sequência de *B. cylindrocellulare* posicionou-se em um ramo longo, com alto suporte de probabilidade posterior (PP > 0,95), compartilhando um ancestral comum com a amostra australiana identificada como *B. cayennense* (AF209980), com divergência entre si de 131 pb (10,1%). A divergência dessa amostra em relação às do complexo *B. cayennense* (AY423392 e MT1) foi de 149-155 pb (11,6-12,1%). As sequências das amostras MT1 e AY423392 posicionaram-se em um clado com alto suporte, porém em ramos longos e distintos com alta divergência entre si (83 pb, 6,5%; Figuras 8 e 9). Estes níveis de divergência e topologia registrados indicam tratar-se de um complexo com três espécies molecularmente distintas, possivelmente crípticas.

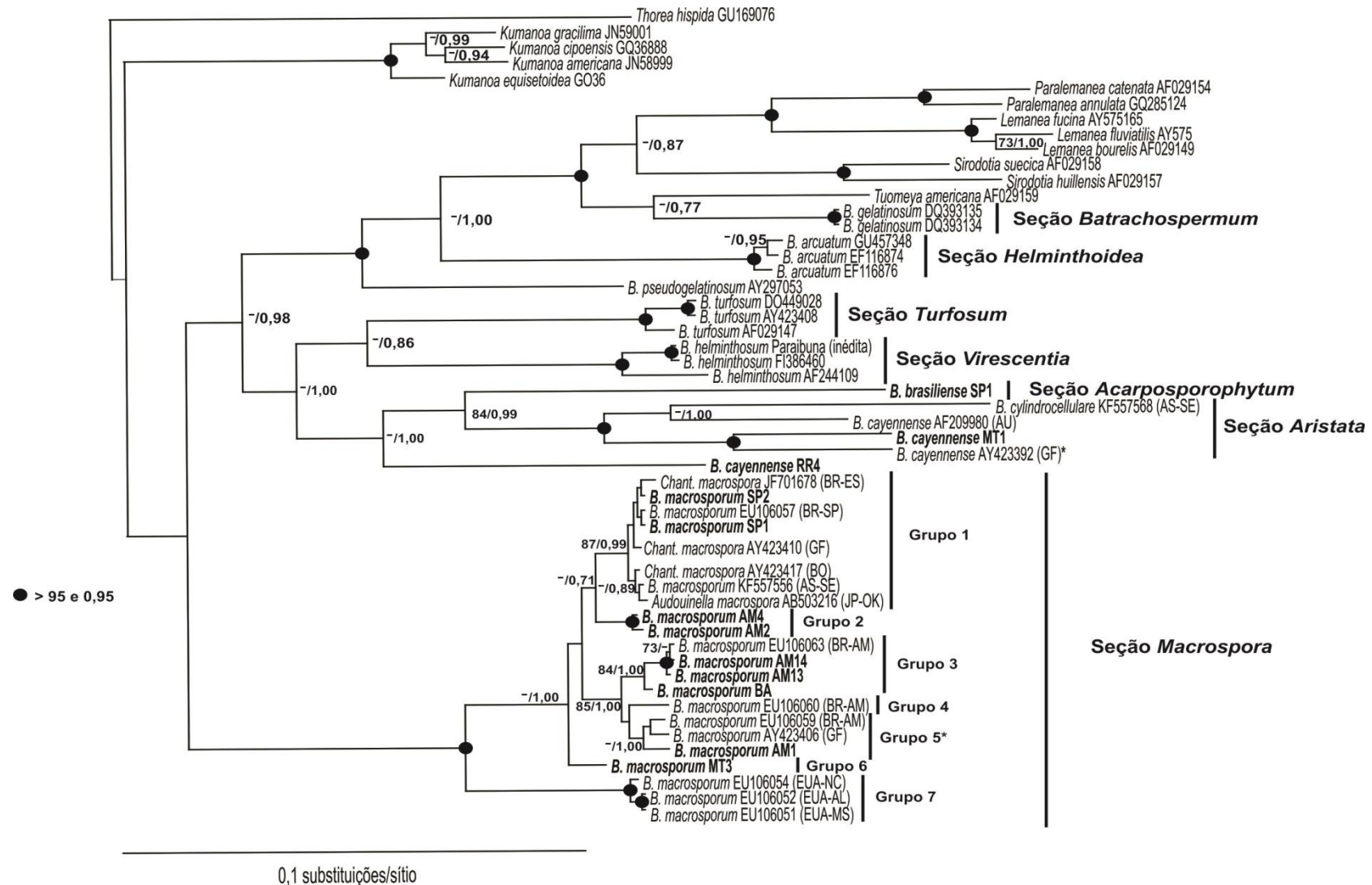


Figura 8. Árvore filogenética (máxima verossimilhança, $-\ln L = 7310,9414$) gerada com base nas sequências parciais do gene *rbcL*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 70$ ou $PP \leq 0,70$, - indica valor de $BS \leq 70$. Os grupos que contem sequências obtidas a partir de espécimes coletados próximo a localidade-tipo de *B. cayennense* e *B. macrosporum* possuem um * para identificá-los. AS-Ásia = sudeste asiático, AU = Austrália, BO = Bolívia, BR = Brasil (AM - Amazonas, ES - Espírito Santo e SP - São Paulo), EUA = Estados Unidos (AL - Alabama, MC - Missouri e NC - Carolina do Norte), GF = Guiana Francesa e JP-OK - Okinawa = Japão.

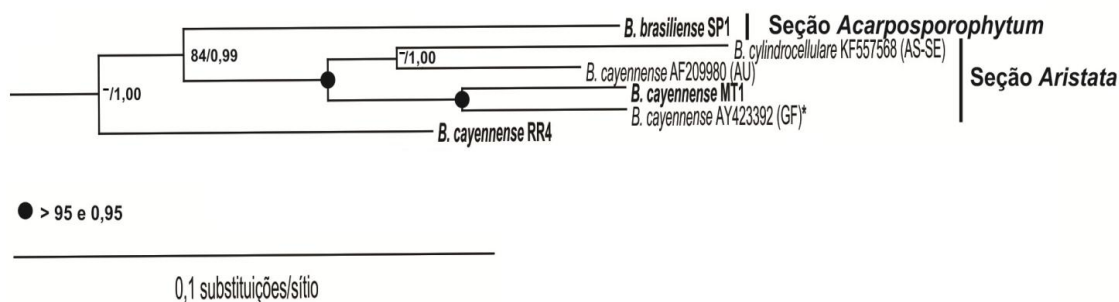


Figura 9. Árvore filogenética (idem Figura 8) destacando *B. brasiliense* (seção *Acarposporophytum*) e o conjunto de espécies do complexo *B. cayennense*, além de *B. cylindrocellulare* (ambas pertencentes à seção *Aristata*). Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam BS ≤ 70 ou PP $\leq 0,70$, - indica valor de BS ≤ 70 . Os grupos que contêm sequências obtidas a partir de espécimes coletados próximo a localidade-tipo de *B. cayennense* e *B. macrosporum* possuem um * para identificá-los. AS-SE = sudeste asiático, AU = Austrália, e GF = Guiana Francesa.

Dentre as 22 sequências de *rbcL* das amostras da seção *Macrospora*, nove geradas neste estudo e mais 13 do GenBank (*Audouinella macrospora* - 1, *B. macrosporum* - 9, e *Chantransia. macrospora* - 3) houve uma variação ampla de 0 a 85 pb (0–6,6%) e estas posicionaram-se na árvore formando um grande clado com alto suporte, dentro do qual pode-se evidenciar sete grupos distintos (grupos 1-7), todos eles sustentados por alto suporte de PP e alguns de BS (Tabela 9; Figuras 8 e 10). Os valores de divergência das sequências das amostras AB503216 e KF557556 não foram considerados, pois são incompletas e poderiam enviesar a delimitação dos níveis de variações entre e dentro dos grupos.

A maioria dos grupos apresentou tendência de agrupamento biogeográfico (continentes, biomas e regiões), todos sustentados por alto suporte de PP e alguns também por BS. As sequências do grupo 1 (EU106057, JF701678, SP1 e SP2 - São Paulo) dispuseram-se em um clado com alto suporte separado das demais sequências do mesmo grupo provenientes tanto da região amazônica como do sudeste da Ásia. As

sequências do grupo 1 (AB503216 e KF557556 - Ásia, AY324217 - Bolívia, EU106057, JF701678, SP1 e SP2 - Brasil, AY423410 - Guiana Francesa) divergiram entre si em 0-5 pb (0-0,4%). As sequências de *A. macrospora* e *C. macrospora* utilizadas nas análises deste marcador agruparam-se junto com sequências de espécimes identificados como *B. macrosporum*, indicando que não são espécies, mas apenas o estágio esporofítico (diploide, denominado estágio “Chantransia”) do histórico de vida de *B. macrosporum* (Tabela 9; Figuras 8 e 10). O grupo 1 posicionou-se como irmão do grupo 2 (AM2 e AM4) e as sequências deste último com pequena divergência entre si (5 pb-0,4%). Os dois grupos divergiram em 19-35 pb (1,5-1,8 %). As sequências do grupo 1 apresentaram divergência em relação às sequências dos demais grupos da América do Sul (3-6) de 19-35 pb (1,5-2,7%) (Tabela 9; Figuras 8 e 10).

Os grupos 2-6 são formados por sequências de amostras provenientes principalmente da região amazônica (Amazonas e Mato Grosso - Brasil e Guiana Francesa) e uma amostra proveniente do nordeste brasileiro (Bahia). Os grupos 3-5 dispuseram-se juntos num clado maior e com médio a alto suporte, divergindo entre si em 11-33 pb (0,9-2,6%). As sequências do grupo 3 (AM13, AM14, BA e EU106063) posicionaram-se em um clado menor com alto suporte e apresentaram pequena variação entre si de 1-9 pb (0,1-0,7%), bem como as sequências do grupo 5 (AM1, AY423406 e AM1) com divergência de 6-10 pb (0,5-0,8%). Os espécimes destes três grupos ocorreram predominantemente em Floresta Ombrófila Densa (Tabelas 6 e 9; Figura 8 e 10).

A sequência da amostra MT3 (grupo 6) formou um clado com alto suporte de PP, posicionando-se isolada e basalmente aos grupos 1-5, com razoável divergência com as sequências daqueles grupos (19-35 pb, 1,5-2,2%). As sequências do grupo 7 (EU106051, EU106052 e EU106054 - América do Norte) posicionaram-se em um clado

mais basal com alto suporte divergindo entre si em 0-5 pb (0-0,4%). Porém divergiram substancialmente (76-85 pb, 5,9-6,6%) das demais sequências provenientes dos grupos 1-6 de amostras da América do Sul e Ásia (Tabela 9; Figuras 8 e 10).

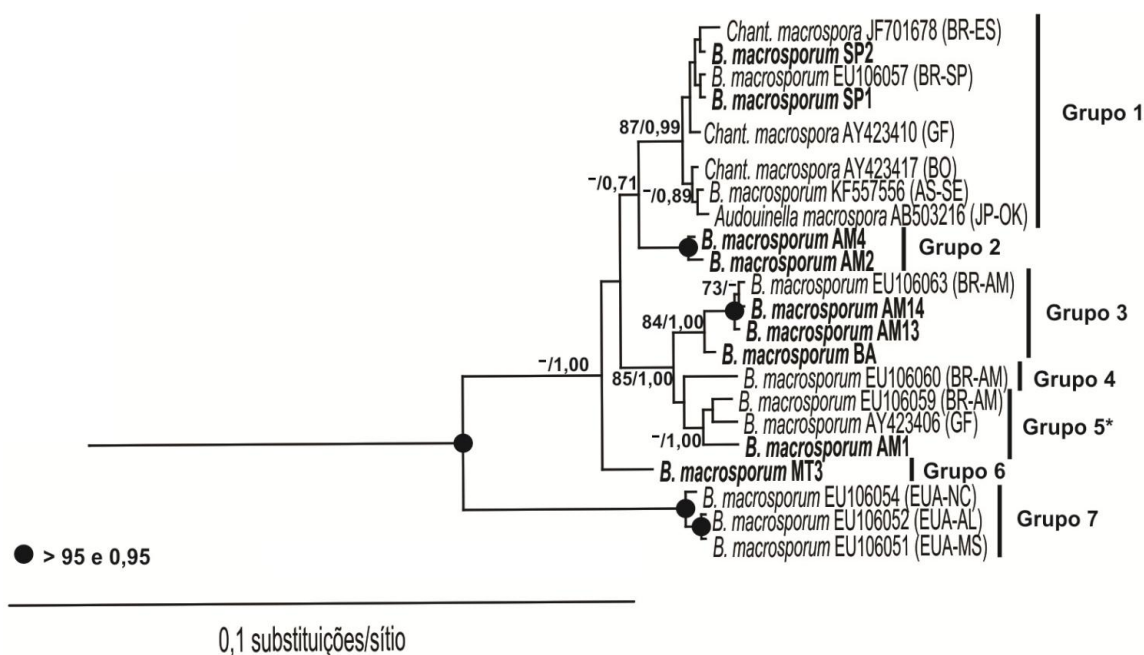


Figura 10. Árvore filogenética (idem Figura 8) destacando o complexo *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) com sete grupos (1-7). Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 70$ ou $PP \leq 0,70$, - indica valor de $BS \leq 70$. O grupo que contém sequência obtida a partir de espécime coletados próximo à localidade-tipo de *B. macrosporum* possuem um * para identificá-los. AS-SE = sudeste asiático, AU = Austrália, BO = Bolívia, BR = Brasil (AM - Amazonas, ES - Espírito Santo e SP - São Paulo), EUA = Estados Unidos (AL - Alabama, MC - Missouri e NC - Carolina do Norte), GF = Guiana Francesa e JP-OK - Okinawa = Japão.

Tabela 9. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre os grupos (1-7) de sequências dos espécimes pertencentes ao complexo *B.macrosporum* (seção *Macrospora*) do sudeste da Ásia, Bolívia, Brasil, Estados Unidos, Guiana Francesa e Japão de *rbcL*. As células em destaque apresentam os valores de variação interna (porcentagem/número de nucleotídeos) de cada grupo

Grupos	1	2	3	4	5	6	7
1	0-0,4 / 0-5	19-35	28-33	32-35	28-33	19-35	76-78
2	1,5-1,8	0,4 / 5	24-29	28-30	23-29	22-23	78
3	2,2-2,6	1,9-2,3	0,1-0,7 / 1-9	19-23	11-33	24-27	81-82
4	2,5-2,7	2,2-2,4	1,5-1,8	0	18-19	30	85
5	2,2-2,6	1,8-2,3	0,9-2,6	1,4-1,5	0,5-0,8 / 6-10	27-28	78-80
6	1,5-1,8	1,7-1,8	1,9-2,1	2,4	2,1-2,2	0	78
7	5,9-6,1	6,1	6,3-6,4	6,6	6,1-6,2	6,1	0-0,4 / 0-5

3.2.4. Comparação entre os marcadores

Não foi possível realizar análise concatenada dos três marcadores envolvendo sequências de espécimes das três seções em estudo, pois foi pequeno o número de amostras com sequências para todos eles, sendo apenas duas amostras de *B. cayennense* (seção *Aristata*) e seis amostras de *B. macrosporum* (seção *Macrospora*). Além disso, os dados disponíveis no GenBank para táxons destes grupo *cox1* e UPA são escassos e igualmente disponíveis apenas para poucas amostras. Diante da inviabilidade da realização da análise concatenada e da importância de comparar os resultados obtidos entre os três marcadores, a seguir são feitas comparações dos dados resultantes das análises separadas de cada um dos marcadores.

A comparação entre as análises com base nas sequências dos três marcadores em conjunto (*rbcL*, *cox1* e UPA) foram essencialmente congruentes, resultando em árvores com topologias semelhantes: 1) as seções *Aristata* e *Macrospora* formaram dois grupos monofiléticos bem definidos e com alto suporte; 2) as sequências de *B. cayennense* (seção *Aristata*) formaram três grupos monofiléticos com suporte de alto a moderado de PP e BS; 3) as sequências das amostras MT1 e RR4 posicionaram-se em grupos

distintos e externas ao grupo contendo sequência(s) de espécimes coletados próximos a localidade-tipo; 4) as mesmas tendências de agrupamento biogeográfico foram observadas nas árvores dos três marcadores, porém foram melhor detalhadas nas árvores de *cox1* e *rbcL*.

As análises com base nas sequências dos marcadores *cox1* e UPA foram congruentes, pois resultaram em árvores com topologias muito semelhantes: 1) as seções *Aristata* e *Macrospora* formaram dois grupos monofiléticos bem definidos e com alto suporte; 2) as sequências de *B. cayennense* (seção *Aristata*) formaram três grupos monofiléticos com alto suporte; 3) uma amostra de *B. cayennense* do Brasil (MT3) posicionou-se no mesmo grupo (1) que as amostras provenientes da Guiana Francesa (próximas da localidade-tipo); 4) as tendências de agrupamento biogeográfico observadas na árvore de UPA foram corroboradas e complementadas na árvore de *cox1*. No entanto, algumas incongruências também foram observadas: 1) as sequências de algumas amostras de *B. cayennense* (seção *Aristata*) de Mato Grosso (MT1 e MT2) posicionaram-se no mesmo grupo (3), separadas da sequência de uma amostra de Roraima (RR4 - grupo 2) na árvore de UPA, enquanto que na árvore de *cox1* as amostras MT1 e MT2 posicionaram-se em grupos distintos (2 e 3); 2) as sequências de *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) dispuseram-se separadas em oito grupos (4-11), com níveis de divergências altos (26-69 pb; 3,9-10,4%) e descontínuos entre os grupos, mas menores dentro de cada grupo (0-28 pb, 0-4,2%). Estes grupos evidenciaram que *B. macrosporum* constitui um complexo de espécies com base na análise de *cox1*, enquanto que as sequências posicionaram-se formando um único grande grupo com variação relativamente pequena e contínua na de UPA (0-3 pb, 0-0,8 %).

A comparação das análises baseadas nas sequências dos marcadores *cox1* e *rbcL* foram igualmente congruentes, particularmente pelas grandes semelhanças na topologia

das árvores: 1) as seções *Aristata* e *Macrospora* foram evidenciadas como dois grupos monofiléticos bem definidos e com alto suporte (BS e PP); 2) as sequências de *B. cayennense* (seção *Aristata*) formaram três grupos monofiléticos com alto suporte de PP e dois deles com médio ou alto suportes de BS; 3) as sequências de *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) dividiram-se em sete grupos monofiléticos com alto suporte (PP) e alguns deles com médio suporte de BS; 4) os mesmos seis dos sete grupos evidenciados na árvore de *cox1* também apareceram na de *rbcL*; 5) os agrupamentos biogeográficos registrados na árvore de *cox1* foram confirmados e complementados na de *rbcL*; 6) as sequências das amostras provenientes de Amazonas (AM1, AM13 e AM14) posicionaram-se próximas com suportes alto de PP e médio de BS; 7) a sequência da amostra MT3 posicionou-se em um clado distinto dos demais (grupos 1-5 e 7), com alto suporte (PP e BS); 8) as sequências das amostras do estado de São Paulo (SP1 e SP2) formaram um grupo com alto suporte de (PP e BS), junto com sequências de outras amostras provenientes da região sudeste; 9) As sequências norte-americanas dispuseram-se em um clado mais basal com alto suporte (PP e BS) em relação as demais sequências dos grupos 1-6, provenientes de amostras da América do Sul e Ásia.

Os grupos do complexo *B. macrosporum* (seção *Macrospora*) formados simultaneamente nas análises de *rbcL* e *cox1* foram, respectivamente: 1) grupos 4 e 7, com amostras exclusivamente da América do Norte; 2) grupos 5 e 6, formados apenas pela amostra MT3; 3) grupos 1 e 7, contendo as amostras provenientes da região sudeste do Brasil (São Paulo e Espírito Santo); 4) grupos 4 e 9, com uma amostra coletada numa localidade do estado do Amazonas; 5) grupos 5 e 10, formados por amostras amazônicas (Amazonas - AM1, EU106059 e Guiana Francesa - AY423406) em *rbcL* e a amostra AM1 na árvore de *cox1* e 6) grupos 3 e 11, contendo duas amostras do Amazonas (AM13 e AM14).

3.3. Análises morfológicas

No presente estudo foram analisadas morfológicamente 16 populações envolvendo representantes das três seções investigadas, consistindo de 1 população de *B. brasiliense*, (seção *Acarposporophytum*), 4 populações de *B. cayennense* (seção *Aristata*) e 11 populações de *B. macrosporum* (seção *Macrospora*). Os espécimes-tipo de cada uma das espécies que compõem as seções também foram analisados, exceto de *B. brasiliense* (seção *Acarposporophytum*) e *B. longiarticulatum* (seção *Aristata*).

Com base nas características diagnósticas aplicadas para separação das espécies das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporum* (presença, forma e disposição do carposporófito; origem do desenvolvimento do estágio “Chantransia”; origem, dimensões, forma, arranjo e número de células do ramo carpogonial; número, forma, disposição e número das células dos filamentos involucreis; dimensões e forma dos carposporângios; forma e número de células do fascículo primário; abundância de fascículos secundários; presença de ramos espermatangiais especializados; e presença de divisão endógena do carpogônio) foi possível distinguir claramente as três seções e dentro de cada uma delas, as espécies que foram reconhecidas, conforme descritas abaixo. Dois caracteres adicionais foram analisados: posição das células apicais (inclusas ou protrusas) e presença de conexões celulares expandidas nas células dos ramos carposporofíticos. Porém, não demonstraram valor taxonômico diagnóstico para a diferenciação das espécies dentro de cada seção. O segundo caráter pode ser considerado como critério adicional para distinguir a seção *Macrospora*, mas necessita ainda de mais e mais amplas informações.

Chave de identificação para as seções estudadas neste trabalho

1. - Carposporófito ausente; estágio “Chantransia” desenvolve-se diretamente do carpogônio fecundado.....seção *Acarposporophytum*
- 1.- Carposporófito presente; estágio “Chantransia” desenvolve-se a partir de carposporângios.....2
2. - Células terminais do ramo carpogonial produzem filamentos involucrais dispostos em coroa.....seção *Macrospora*
2. – Células terminais do ramo carpogonial não produzem filamentos involucrais dispostos em coroa.....seção *Aristata*

Seção *Acarposporophytum*

Uma única espécie foi reconhecida nesta seção, a qual está descrita abaixo.

Batrachospermum brasiliense Necchi, Rev. bras. Biol. 47: 446. 1987

Plantas monóicas, verticilos doliformes ou esféricos, com 330-680 µm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais protrusas. Fascículos primários com 6-10 células; células proximais cilíndricas 20,0-48,0 µm de comprimento e 6,0-12,0 µm de diâmetro; células distais obovóides a elípticas 8,0-16,0 µm de comprimento e 5,0-11,0 µm de diâmetro. Fascículos secundários numerosos, dispostos ao longo de todo o internó. Espermatângios esféricos com 5,0-7,2 µm de diâmetro. Carpogônios com 30,0-51,0 µm de comprimento e 10,0-15,0 µm de diâmetro; tricogínios claviformes; ramos carpogoniais com 3-4 células e 28,0-53,0 µm de comprimento; filamentos involucrais formados por 1-3 células, proximais formados por 1-3 células elípticas ou fusiformes e

distais (terminais) formados por uma célula disposta em coroa. Conexões intercelulares expandidas das células presentes no ramo carpogonial após a formação do zigoto. Carposporófitos ausentes. Filamentos gonimoblásticos ausentes. Carposporângios ausentes (Tabelas 10 e 11; Figura 11).

Observações: esta espécie apresenta como característica única entre as espécies de Batrachospermaceae a ausência de carposporófitos e o desenvolvimento do estágio “Chantransia” se dar diretamente a partir de carpogônios fecundados.

A variação dos caracteres morfológicos e os valores dos caracteres morfométricos descritos (Tabelas 10 e 11, Figura 11) estão dentro dos limites reportados na descrição original desta espécie (NECCHI, 1990a).

Seção *Aristata*

Quatro espécies foram reconhecidas na seção e podem ser identificadas pela chave abaixo.

Chave de identificação para as espécies da seção *Aristata* estudadas neste trabalho

1. Fascículos primários formados por células exclusivamente cilíndricas; espermatângios dispostos em ramos especializados.....*B. cylindrocellulare*
1. Fascículos primários formados por células cilíndricas, elípticas, obovóides e/ou semiesféricas; espermatângios não dispostos em ramos especializados.....2

2. Carpogônios fecundados com porção basal túrgida e divisão endógena; ramos carpogoniais com 5-8 células.....*B. turgidum*
2. Carpogônios fecundados sem porção basal túrgida e sem divisão endógena; ramos carpogoniais com 8-30 células.....3
3. Fascículos primários com 20-32 células; filamentos involucrais mais longos, proximais com 10-25 células e distais com 2-5 células.....*B. longiarticulatum*
3. Fascículos primários com 8-19 células; filamentos involucrais mais curtos, proximais com 5-10 células e distais com 1-3 células.....*B. cayennense*

Batrachospermum cayennense Montagne in Kützinger, Spec. algar. 537. 1849. (Figura12)

Sinônimo: *B. beraense* Kumano, Bot. Mag. 91: 98. 1978

Plantas monóicas, dióicas ou polióicas, verticilos doliformes, esféricos ou obcônicos, com 650,0-1.225,0 µm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais inclusas ou protrusas. Fascículos primários 8-19(-22) células; células proximais cilíndricas com (16,0-)35,0-77,0(-110,0) µm de comprimento e 6,0-12,0(-19,0) µm de diâmetro; células distais obovóides a semi-esféricas com 6,0-15,0(-21,0) µm de comprimento e 4,0-10,0 µm de diâmetro. Fascículos secundários poucos, esparsos e dispostos ao longo de todo o internó. Espermatângios esféricos com 3,8-8,0 de diâmetro. Carpogônios com 20,0-36,0(-44,0) µm de comprimento e 5,0-14,0 µm de diâmetro; tricóginio claviforme; ramos carpogoniais (8-)12-22 células e 108-270 µm de comprimento; filamentos involucrais formados por 1-10 células elípticas ou fusiformes, proximais com 5-10 células e distais com 1-3 células. Carposporófitos subesféricos com 80,0-183,0(-284,0) µm de diâmetro. Ramos carposporofíticos sem conexões

intercelulares expandidas. Filamentos gonimoblásticos com 2-4(-6) células. Carposporângios obovóides com 9,0-24,0 μm de comprimento e 5,0-12,0 μm de diâmetro (Tabelas 10 e 11; Figura 12).

Observações: As características descritas para as novas populações examinadas concordaram com as obtidas do espécime-tipo (Tabelas 10 e 11) e também com aquelas reportadas por Vis et al. (2004) para a Guiana Francesa. Houve sobreposição dos caracteres de *B. cayennense* em relação a *B. beraense*, não sendo possível diferenciá-las morfológicamente. Porém, *B. beraense* apresentou algumas características pouco diferentes quando comparada com *B. cayennense*: 1) ramos carpogoniais com 8-12 células; 2) carposporófitos com menor diâmetro 88,0-90,0 μm ; e 3) filamentos gonimoblásticos com 2-3 células (Kumano, 1978) (Tabelas 10 e 11). Porém, não consideramos tais diferenças suficientes para justificar a separação das duas espécies, pois os valores situam-se no limite inferior da variação observada para a espécie.

A população proveniente de Mato Grosso (MT3) foi a única com fascículos primários com até 22 células, apresentando leve sobreposição em relação a *B. longiarticulatum*, porém tratada aqui como uma exceção (Tabelas 10 e 11).

Batrachospermum cylindrocellulare Kumano, Bot. Mag. 91: 100. 1978.

Plantas monóicas, verticilos doliformes, esféricos ou elípticos, com 330-450 μm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais inclusas. Fascículos primários 7-12 células; células proximais cilíndricas 14,0-18,0 μm de comprimento e 6,0-7,0 μm de diâmetro; células distais cilíndricas 7,0-15,0 μm de comprimento e 3,0-8,0 μm de diâmetro. Fascículos secundários numerosos, esparsos e dispostos ao longo de todo o internó. Espermatângios esféricos com 4,0-8,0 μm de diâmetro, dispostos em ramos

especializados, mais curtos do que os fascículos. Carpogônios com 17,0-25,0 µm de comprimento e 6,0-9,0 µm de diâmetro; tricogínios claviformes ou obovóides; ramos carpogoniais 6-8 células e 25,0-40,0 µm de comprimento; filamentos involucreais numerosos. Carposporófitos esféricos a subesféricos com 105-126 µm de diâmetro. Ramos carposporofíticos sem conexões intercelulares expandidas. Filamentos gonimoblásticos com 1-3 células. Carposporângios claviformes ou obovóides com 20,0-29,0 µm de comprimento e 8,0-14,0 µm de diâmetro (Tabelas 10 e 11).

Observações: no protólogo, Kumano (1978) comentou que a espécie apresentava características intermediárias entre as seções *Aristata* e *Batrachospermum*. Dados moleculares evidenciaram que a espécie posicionou-se dentro da seção *Aristata* e foi, portanto, reconhecida nesta seção.

Batrachospermum longiarticulatum Necchi. Bibl. Phycol., 84: 31. 1990.

Plantas monóicas, verticilos doliformes com 1200-2500 µm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais inclusas. Fascículos primários 20-32 células; células proximais cilíndricas ou elípticas 30,0-120 µm de comprimento e 6,0-18,0 µm de diâmetro; células distais elípticas, obovóides ou semi-esféricas com 8,0-15,0 µm de comprimento e 5,0-8,0 µm de diâmetro. Fascículos secundários poucos, esparsos e dispostos ao longo de todo o internó. Espermatângios esféricos ou obovóides com 5,0-7,0 µm de diâmetro. Carpogônios com 22,0-32,0 µm de comprimento e 7,0-9,0 µm de diâmetro; tricogínios claviformes; ramos carpogoniais 12-22 células e 120-250 µm de comprimento; filamentos involucreais formados por 10-25 células elípticas, doliformes ou obovóides, proximais com 10-25 células e distais com 2-5 células. Carposporófitos subesféricos com 80,0-160 µm de diâmetro. Ramos carposporofíticos sem conexões

intercelulares expandidas. Filamentos gonimoblásticos com 3-5 células. Carposporângios obovóides ou claviformes com 13,0-18,0 µm de comprimento e 6,5-10,0 µm de diâmetro (Tabelas 10 e 11).

Batrachospermum turgidum Ratnasabapathy & Kumano Jap. J. Phycol. 30: 291. 1982.

Plantas monóicas ou polióicas, verticilos elípticos, com 353-470 µm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais inclusas. Fascículos primários 7-15 células, células proximais cilíndricas 14,7-24,0 µm de comprimento e 4,5-6,7 µm de diâmetro, células distais obovóides 6,7-17,0 µm de comprimento e 3,4-6,0 µm de diâmetro. Fascículos secundários numerosos, dispostos ao longo de todo o internó. Espermatângios esféricos com 4,7-7,0 µm de diâmetro. Carpogônios com 30-50 µm de comprimento e 3,0-6,0 µm de diâmetro; tricogínios claviformes; ramos carpogoniais com 5-8 células e 40,0-60,0 µm de comprimento; filamentos involucrais numerosos e curtos; carpogônios fecundados com porção basal túrgida e divisão endógena. Carposporófitos esféricos com 120-210 µm de diâmetro. Ramos carposporofíticos sem conexões intercelulares expandidas. Filamentos gonimoblásticos com 1-2 células. Carposporângios obovóides com 16,0-20,0 µm de comprimento e 9,0-12,0 µm de diâmetro (Tabelas 10 e 11).

Observações: esta espécie tem o caráter pós-fecundação único entre espécies da família Batrachospermaceae de apresentar carpogônio túrgido (que dá nome a espécie) e divisão endógena antes da formação dos filamentos gonimoblásticos.

Seção *Macrospora*

Uma única espécie foi reconhecida nesta seção, a qual está descrita abaixo.

Batrachospermum. macrosporum Montagne, Ann. Sci. nat., ser. 3, 14: 293. 1850.

(Figura 13)

Sinônimos: *B. equisetifolium* Montagne, Ann. Sci. nat., ser. 3, 14: 295. 1850.

B. hypogym Ratnasabapathy & Kumano Jap. J. Phycol. 30: 291. 1982.

Plantas monóicas, dióicas ou polióicas, verticilos doliformes, ou obcônicos, com (160-)500-2400 µm de diâmetro. Células apicais dos ramos principais inclusas ou protrusas. Fascículos primários com 4-10 células; células proximais cilíndricas, obovóides ou semi-esféricas com 30,0-121(-165) µm de comprimento e 5,0-22,0 µm de diâmetro, células distais esféricas, obovóides ou semi-esféricas com 8,0-37,0(-48,0) µm de comprimento e 4,0-15,0(-19,0) µm de diâmetro. Fascículos secundários de poucos a numerosos, esparsos e dispostos por todo o internó. Espermatângios esféricos com 4,0-11,0 µm de diâmetro. Carpogônios obpiriformes ou obovóides com 37,0-102 µm de comprimento e 15,0-20,0 µm de diâmetro; ramos carpogoniais com 4-12(-16) células e (14,0-)65,0-170(-260) µm de comprimento; filamentos involucrais formados por 1-10 células, proximais formados por 4-10 células elípticas ou fusiformes e distais formados por uma célula disposta em coroa. Carposporófitos subesféricos com (55,0-)80,0-210(-460) de diâmetro. Ramos carposporofíticos com conexões intercelulares expandidas. Filamentos gonimoblásticos com 1-3(-5) células. Carposporângios esféricos, obpiriformes ou obovóides com (21,0-)30,0-66,0 µm de comprimento e (10,0-)19,0-

44,0 μm de diâmetro. Monosporângios obpiriformes com 22,0-53,0(-92,0) μm de comprimento e 10,0-26,0(-34,5) μm de diâmetro (Tabelas 10 e 11; Figura 13).

Observações: O espécime-tipo de *B. equisetifolium* foi analisado morfológicamente, porém não foi possível observar a maioria dos caracteres, o que restringiu bastante à análise. Os valores das medidas das estruturas observados estão de acordo com Kumano (1990). Esta espécie foi reconhecida como sinônima neste trabalho, pois houve sobreposição dos caracteres com os de *B. macrosporum*, em relação a ela, não sendo possível diferenciá-las morfológicamente. A análise do espécime-tipo de *B. hypogynum* também mostrou uma sobreposição dos caracteres. O caráter considerado diagnóstico - presença de células terminais dos ramos carpogoniais dispostas em coroa, assemelhando-se à uma célula hipogínica de Florideophyceae mais complexas (Guiry, 1990) - é observado também em *B. macrosporum*. Portanto, esta espécie também foi considerada como sinônima de *B. macrosporum* (Tabelas 10 e 11).

As características descritas para as populações brasileiras examinadas concordaram de maneira geral com as obtidas do espécime-tipo (Tabelas 10 e 11) e também com aquelas reportadas por Vis et al. (2004) para a Guiana Francesa. No entanto, foram observadas algumas particularidades: 1) verticilos mais espessos (500-2400 μm), ramos carpogoniais mais longos (até 270 μm) e carposporângios mais longos (até 66,0 μm); 2) presença de monosporângios em três populações da região amazônica (AM4, RR3 e RR4); 3) a população proveniente da Bahia (BA) apresentou verticilos reduzidos (140-158 μm), número reduzido de células dos fascículos primários (4-6), poucos fascículos secundários distribuídos esparsamente e ramos carpogoniais mais curtos (14,0-29,0 μm); 4) a população RR3 apresentou apenas caracteres vegetativos (Tabelas 10 e 11). Apesar das discrepâncias apontadas, as amostras RR3 e BA foram reconhecidas como *B. macrosporum* nas análises moleculares e foram, portanto, incluídas na espécie.

Este é o primeiro registro de monosporângios para espécie da seção. Monosporângios foram anteriormente reportados somente para espécies da seção *Turfosa* (Sheath *et al.* 1994) e do gênero *Kumanoa* (Necchi & Vis 2012) em Batrachospermaceae.

.

Tabela 10. Caracteres taxonômicos dos espécimes das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporium* das amostras do Brasil e reportada em trabalhos relevantes (dimensões em μm). Códigos das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média $\pm$ desvio-padrão (linha inferior). CI: cilíndricas; CO: cônico; DO: doliforme; EL: elípticas; ES: esférico; FU: fusiforme; NU: numerosos; OBc: obcônico; OBv: obovoide; OBp: obpiriforme; PO: poucos; SE: subesferico

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fascículo Primário			Fascículo Secundário	Célula apical	Monosporangio
				(n° células)	proximais	distais			(comp x diâm.)
<i>B. brasiliense</i> SP1	monóico	DO, ES	330-680 (506±104,8)	6-10 (7,1±1,0)	CI 20-48 x 6-12 (30,5±5,6 x 9,2±1,5)	OBv, EL 8-16 x 5-11 (12,5±3,5 x 7,1±1,5)	NU - todo internó	Protrusa	...
<i>B. cayennense</i> MT1	monóico	OBc	660-1210 (936±162,6)	12-18 (15,2±1,7)	CI 60-110 x 7-12 (77,1±21 x 8,6 1,9)	SE 7-15 x 5-9 (10,3±2,1 x 7,1±1,2)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. cayennense</i> MT2	dióico	DO, ES	810-1225 (1075±136)	11-16 (14±2,3)	CI 35-64(71) x 8-19 (50,8±10 x 11,8±4,2)	OBv 7-12 x 5-9 (9,6±2,1 x 7,2±1,6)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. cayennense</i> MT3	monóico	OBc	650-910 9780±88,3)	13-22 (17,5±2,3)	CI 16-45 x 6-10 (31,6±8,2 x 8,2±1,4)	SE 8-21 x 4-10 (12,5± 3,2 x 7,1±1,6)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. cayennense</i> RR4	polióico	OBc	688-960 (806,4±75,7)	10-16 (13,5±1,6)	CI 37-77 x 6-12 (54,3±12 x 8,6±1,5)	SE 6-16 x 5-9 (11,5±3,4 x 7,3±1,5)	NU - todo internó	Protrusa	...
<i>B. macrosporum</i> AM2	dióico	OBc	900-1770 (1181±243,3)	7-10 (8,4±1,1)	CI 60-100 x 6-17 (78,8±12,7 x 9,4±2,9)	OBv 10-45 x 5-11 (26±11,6 x 7,4±1,5)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. macrosporum</i> AM4	dióico	OBc	550-1600 (948±262,1)	7-11 (8,9±1,1)	CI 50-121 x 5,5-10 (86,6±16 x 6,9±1,0)	OBv 8-26 x 4-8 (14,9±5,1 x 6,3±1,1)	NU - dois terços do internó	Inclusa	...
<i>B. macrosporum</i> AM11	polióico	OBc	650-940 (795,8±80)	6-8 (6,9±0,7)	CI 46-76 x 5,5-9 (59,9±7,6 x 7,2±1,1)	SE, OBv 13-37 x 5-7,2 (25±6,6 x 6,3±0,6)	NU - todo internó	Inclusa	OBp 22-26 x 11-19 (26±214,8±3,0)
<i>B. macrosporum</i> AM13	monóico	OBc	518-1200 (662±174,7)	6-8 (6,8±0,5)	CI 32-54 x 5,5-9 (45,7±6,6 x 7,5±1,1)	OBv 11-33 x 6-7,8 (20±6,2 x 7,2±0,5)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. macrosporum</i> AM14	monóico	OBc	651-932 (752,6±71,3)	6-8 (7±0,8)	30-80 x 7-10 (54,6±12,8 x 8,5±1,1)	OBv 16-33 x 7-15 (23±5,1 x 10,7±2,3)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. macrosporum</i> BA	dióico	OBc, DO	140-158 (145±7,6)	4-6 (4,8±0,8)	ES, OBv 46-64 x 16-22 (55,4±4,6 x 18,2±2,1)	SE,OBv 25-48 x 13-19 (35,1±6,6 x 15,9±2,1)	PO - todo internó	Protrusa	...
<i>B. macrosporum</i> MT3	monóico	OBc	833-2400 (1140,7±377)	7-9 (7,5±0,7)	CI 60-120(160) x 5-11 (95,2±24,3 x 7,2±1,8)	ES 10-25 x 6-10 (17,8±5,8 x 7,8±0,9)	NU - todo internó	Protrusa	...

Tabela 10. Continuação.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fascículo Primário			Fascículo Secundário	Célula apical	Monosporangio (comp x diâm..)
				(n° células)	proximais	distais			
<i>B. macrosporum</i> RR3	...	OBc, DO	720-1220 (999±160,4)	4-7 (5,7±0,9)	CI 54-84 x 5-10 (68,8±9,2 x 7±1,6)	SE 14-36 x 5,6-8 (24,2±4,4 x 6,6±0,6)	NU - todo internó	Protrusa	OBp 36-53 x 10-26 (41,7±4,9 x 19,5 ±4,0)
<i>B. macrosporum</i> RR4	monóico	OBc	820-1290 (1068±145,2)	5-7 (6,2±0,9)	CI 85-165 x 7-12 (128,4±21 x 9±1,3)	SE 5-30 x 6-9 (12,2±6,4 x 6,4±11)	NU - todo internó	Protrusa	OBp 92 x 34,5
<i>B. macrosporum</i> RR5	monóico	OBc	658-1110 (839±133,5)	5-6 (5,1±0,5)	CI 58-125 x 8-14 (96,7±18,5 x 10±1,8)	ES 8-40 x 4-8 (19,8±7,9 x 6±1,2)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. macrosporum</i> RR8	monóico	OBc	790-1080 (903,5±77,4)	6-9 (7,2±1,2)	CI 50-115 x 5-16 (80±17 x 11,4±2,6)	EL 11-34 x 4-10 (20±7,8 x 7,3±1,6)	NU - todo internó	Protrusa	...
<i>B. macrosporum</i> SP1	dióico	OBc	500-1200 (792±219)	6-10 (8,2±1,1)	CI 70-116 x 10-20 (95,7±17 x 14,4±3,2)	SE 10-35 x 7-12 (17,4±6 x 9±1,8)	NU - todo internó	Protrusa	...
Tipos nomenclaturais									
<i>B. beraense</i> (holótipo)	monóico	OBc, DO	417-486 (446,7±30)	9-13 (11±1,5)	CI 30-62 x 4-11 (45,2±13,9 x 7,7±2,3)	OBv 8,5-18 x 5-6,5 (11,5±3,6 x 5,7±0,5)	PO - todo internó	Inclusa	...
<i>B. cayennense</i> (lectótipo)	...	OBv	538-1119 (779)	8-17	...	...	NU - todo internó	...	...
<i>B. cylindrocellulre</i> (holótipo)	monóica	DO	330-450 (360,6±50,2)	9-12 (10,6±0,8)	CI 14-18 x 6-6,8 (16,1±1,1 x 6,3±0,3)	CI 10-15 x 3-8 (12,5±1,7 x 4,8±1,2)	NU - todo internó	Inclusa	...
<i>B. hypogynum</i> (isótipo)	monóico	OBc	440	6-8 (7±0,8)	CI, OBv 16-32 x 6-8 (22,7±4,9 x 9,2±2,1)	OBv 5-11 x 5-7 (9,1±2 x 5,6±1,1)	NU - todo internó	...	...
<i>B. macrosporum</i> (lectótipo)	...	OBv	433-1134 (837)	5-10	...	...	NU - todo internó	...	...
<i>B. turgidum</i> (holótipo)	monóico	...	353-452 (414,2±42,6)	7-10 (8,3±1,4)	CI 14,7-24 x 4,5-6,7 (19,9±3,3 x 5,1±0,7)	OBv 6,7-17 x 3,4-6 (12±3,2 x 4,9±0,9)	NU - todo internó	...	...

Tabela 10. Continuação.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fascículo Primário		Fascículo Secundário	Célula apical	Monosporangio (comp x diâm.)
				(n° células)	proximais	distais		
Trabalhos anteriores								
<i>B. beraense</i> (KUMANO, 1978; SHEATH et al., 1994b)	monóico	EL	600-1000	10-13	CI 50-90 x 8-10	FU, EL 8-25 x 6-8	NU - todo internó	...
<i>B. brasiliense</i> (NECCHI, 1990b)	monóico	DO	400-650	6-10	CL, EL (40-80 x 6-120)	OBv, SE (14-20 x 4-10)	NU - todo internó	Protrusa
<i>B. cayennense</i> (NECCHI, 1990b)	polióico ou monóico	OBc, OBp	800-2300	10-17(19)	CL, EL (25-60 x 5-10)	EL, OBv, SE (6-20 x 4-10)	NU - todo internó	...
<i>B. cayennesne</i> (KUMANO, 1990)	monóico	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. cayennesne</i> (SHEATH et al., 1994b)	...	OBv	538-1119 (779)	8-17	...	...	NU - todo internó	...
<i>B. cylindrocellulre</i> (KUMANO, 1978)	monóica	EL	300	7-11	CI 7-15 x 4-7	CI 7-15 x 4-7	NU - todo internó	...
<i>B. equisetifolium</i> (KUMANO, 1990; SHEATH et al., 1994b)	dióica	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. hypogynum</i> (KUMANO, 1982 II; SHEATH et al., 1994b)	monóico	EL	300-570	8-11	CL 17-23 x 5-7	FU, EL 6-10 x 3-5 (9,1±2 x 5,6±1,1)	PO - todo internó	...
<i>B. longiarticulatum</i> (NECCHI, 1990b)	monóico	DO	1200-2500	20-32	CI, EL 30-120 x 6-18	EL, OBv, SE 8-15 x 5-8	PO - todo internó	...
<i>B. macrosporum</i> (KUMANO, 1982)	dióico	ES, EL	270-400	8-12	LA	EL	PO - todo internó	...
<i>B. macrosporum</i> (NECCHI, 1990b)	dióico ou polióico	OBc, OBp, ES	600-2500	5-10	EL, CI (40-180 x 6-25)	OBv, SE, EL (8-15 x 5-8)	NU - todo internó	...
<i>B. macrosporum</i> (SHEATH et al., 1994b)	...	OBv	433-1134 (837)	5-10	...	...	NU - todo internó	...
<i>B. turgidum</i> (KUMANO, 1982)	polióico	EL	400-470	8-15	EL, FU	FU, OBv	PO - todo internó	...

Tabela 11. Caracteres taxonômicos dos espécimes das seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporum* das amostras do Brasil e reportadas em trabalhos relevantes. Códigos das amostras conforme Tabela 1. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média $\pm$ desvio-padrão (linha inferior). CI: cilíndricas; CO: cônico; DO: doliforme; EL: elípticas; ES: esférico; FU: fusiforme; NU: numerosos; OBc: obcônico; OBv: obovóide; OBp: obpiriforme; PO: poucos; SE:subesferico.

Amostra	Tricogínio	Carpogônio	Ramo Carpogonial		Carposporófito	Ramo Carposporofítico	Carposporângio		Filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio
		(comp x diâm.)	(n° de células)	comp.	(diâmetro)	(conexões intercelulares ampliadas)	dimensões	forma	(n° de células)	(diâmetro)
<i>B. brasiliense</i> SP1	CL	30-51 x 10-15 (39 $\pm$ 8,3 x 12 $\pm$ 1,8)	3-4 (3,6 $\pm$ 0,5)	28-53 (37,7 $\pm$ 8,8)	...	presente	...	...	...	5-7,2 (6,1 $\pm$ 0,8)
<i>B. cayennense</i> MT1	CL	25-34 x 8-12 (29,5 $\pm$ 2,2 x 10 $\pm$ 1,3)	15-20 (17,3 $\pm$ 1,6)	120-190 (158,5 $\pm$ 28,5)	95-183 (140 $\pm$ 25,8)	ausente	12-22 x 5-10 (17,2 $\pm$ 3 x 7,5 $\pm$ 1,4)	OBv	2-4 (2,8 $\pm$ 0,8)	5-7 (6,2 $\pm$ 0,8)
<i>B. cayennense</i> MT2	CL	28-36 x 7-14 (31,9 $\pm$ 2,6 x 11,1 $\pm$ 2,0)	12-17 (14,3 $\pm$ 1,5)	108-245 (175,6 $\pm$ 37,3)	152-284 (239,2 $\pm$ 34,7)	ausente	16-24 x 7-12 (19,8 $\pm$ 2,4 x 9 $\pm$ 1,5)	OBv	3-5 (3,5 $\pm$ 0,7)	5-8 (6,8 $\pm$ 0,9)
<i>B. cayennense</i> MT3	CL	20-27 x 5-9 (23,7 $\pm$ 2,5 x 7,3 $\pm$ 1,2)	16-22 (18,8 $\pm$ 1,7)	158-270 (206,3 $\pm$ 30)	100-150 (126 $\pm$ 14,6)	ausente	9-16 x 5-11 (12,6 $\pm$ 2,1 x 6,9 $\pm$ 1,7)	OBv	3-6 (3,9 $\pm$ 0,8)	3,8-6 (4,8 $\pm$ 0,6)
<i>B. cayennense</i> RR4	CL	32-44 x 8-11 (39,3 $\pm$ 3,6 x 9,8 $\pm$ 2,3)	14-20 (17,3 $\pm$ 1,6)	138-185 (154,4 $\pm$ 13,7)	...	...	...	...	...	5-8 (6,4 $\pm$ 0,8)
<i>B. macrosporum</i> AM2	OBp	28-38 x 12-16 (32,4 $\pm$ 3,3 x 13,8 $\pm$ 1,4)	6-12 (8,7 $\pm$ 1,8)	74-145 (108,3 $\pm$ 20,6)	100-195 (156,5 $\pm$ 27)	ausente	38-66 x 28-44 (8,8 $\pm$ 7,7 x 33,3 $\pm$ 15,4)	OBp	1-3 (2,1 $\pm$ 0,8)	5-7 (6,4 $\pm$ 0,6)
<i>B. macrosporum</i> AM4	OBp	28-42 x 11-14 (35,7 $\pm$ 4,1 x 12,3 $\pm$ 1,0)	7-9 (7,9 $\pm$ 1,2)	85-150 (103,5 $\pm$ 15,9)	80-176 (115,6 $\pm$ 27,3)	ausente	30-55 x 20-42 (43,7 $\pm$ 6,1 x 29,2 $\pm$ 6,2)	OBp	1-3 (1,7 $\pm$ 0,8)	5-7,5 (6,3 $\pm$ 0,7)
<i>B. macrosporum</i> AM11	OBp	27-44 x 11-19 (33,1 $\pm$ 4,4 x 13,5 $\pm$ 2,0)	5-10 (6,6 $\pm$ 1,2)	78-136 (105,2 $\pm$ 16,6)	115-210 (157,5 $\pm$ 29,4)	ausente	21-55 x 10-33 (41,7 $\pm$ 10,4 x 23,4 $\pm$ 7,1)	OBp	1-3 (1,9 $\pm$ 0,7)	5,5-8 (6,7 $\pm$ 0,7)
<i>B. macrosporum</i> AM13	OBp	28-41 x 11-17 (33,3 $\pm$ 3,3 x 14 $\pm$ 1,6)	5-8 (6,7 $\pm$ 0,7)	76-130 (102,8 $\pm$ 16)	108-164 (134,1 $\pm$ 16)	ausente	32-56 x 19-32 (44,8 $\pm$ 6,9 x 25,8 $\pm$ 3,7)	OBp	1-3 (2 $\pm$ 0,7)	5,5-9 (6,9 $\pm$ 0,9)
<i>B. macrosporum</i> AM14	OBp	28-38 x 10-15 (32,6 $\pm$ 3,6 x	5-6 (5,5 $\pm$ 0,5)	65-99 (74,9 $\pm$ 8,7)	110-210 (167,5 $\pm$ 27,6)	ausente	35-60 x 23-40 (45 $\pm$ 6,5 x 29,1 $\pm$ 4,5)	OBp	1-3 (2,1 $\pm$ 0,8)	6-7 (6,5 $\pm$ 0,5)
<i>B. macrosporum</i> BA	OBv	38-50 x 15-20 (43,8 $\pm$ 13,5 x 17,8 $\pm$ 3,4)	4-6 (4,4 $\pm$ 0,6)	14-29 (19,7 $\pm$ 4,1)	95-165 (139 $\pm$ 25,3)	presente	45-62 x 30-42 (56 $\pm$ 5,5 x 34 $\pm$ 3,5)	ES	1-3 (1,4 $\pm$ 0,7)	6,4-8,8 (7,6 $\pm$ 0,6)
<i>B. macrosporum</i> MT3	OBv	28-38 x 14-16 (33,8 $\pm$ 3,7 x 15,2 $\pm$ 1,1)	7-11 (9,0 $\pm$ 1,4)	98-170(260) (130 $\pm$ 42,5)	...	...	...	...	...	6-11 (9,1 $\pm$ 1,0)

Tabela 11. Continuação.

Amostra	Tricogínio	Carpogônio	Ramo Carpogonial		Carposporófito	Ramo Carposporofítico	Carposporângio		Filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio
		(comp x diâm.)	(n° de células)	comp.	(diâmetro)	(conexões intercelulares ampliadas)	dimensões	forma	(n° de células)	(diâmetro)
<i>B. macrosporum</i> RR4	OBv	...	...	...	...	...	...	...	...	4-7 (5,6±0,8)
<i>B. macrosporum</i> RR5	OBv	28-48 x 12-18 (34±5,9 x 15,6±1,7)	6-16 (10,9±3,5)	66-110(120) (92,8±15,6)	55-60 (59±3,6)	presente	38-52 x 23-28 (45±9,8 x 25,5±3,5)	OBv	3-5 (3,6±0,8)	5-8 (6,7±1,2)
<i>B. macrosporum</i> RR8	OBv	...	...	...	...	...	...	...	...	5-7,5 (6,4±0,8)
<i>B. macrosporum</i> SP1	OBv	30-48 x 12-16 (38,5±5,5 x 15±1,4)	6-10 (7,5±1,0)	98-160(215) (135,7±38)	...	...	...	...	...	...
Tipos nomenclaturais										
<i>B. beraense</i> (holótipo)	OBp	29 x 12,3	10-12 (11,2±0,9)	100-118 (109,7±8,6)	88-90 (89±1,4)	...	17-18 x 10-12 (7,2±0,8 x 11±0,8)	OBp	...	3,7-8 (4,4±0,8)
<i>B. cayennense</i> (lectótipo)	OBv	21-41 x 6,2-10,8 (28,9 x 8,3)	6-10 (7,5)	...	93-254 (158)	...	5,6-11,1 x 9,5-20 (7,7 x 16,5)	OV, OBv	2-5 (2,6)	...
<i>B. cylindrocellulre</i> (holótipo)	...	...	...	...	105-126 (113,4±6,7)	...	20-29 x 8-14 (23,3±2,6 x 11,4±1,9)	CL	1-3 (2,2±0,8)	6-8 (6,7±0,9)
<i>B. hypogynum</i> (isótipo)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	4,8-6 (5,4±0,6)
<i>B. macrosporum</i> (isótipo)	OBv	22,8-63,4 x 7,7-19,4 (31,8 x 9,6)	15-21 (17,7)	...	87-221 (179)	...	17,5-36 x 21,4-59,2 (26,7 x 48,5)	OBv	1-5 (3,7)	...
<i>B. turgidum</i> (holótipo)	CL	...	...	...	105-112	...	18-25 x 8-16 (21,7±2,6 x 13±3,5)	OBv	...	4,7-6,8 (5,5±0,9)

Tabela 11. Continuação.

Amostra	Tricogínio	Carpogônio	Ramo Carpogonial		Carposporófito	Ramo Carposporofítico	Carposporângio		Filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio
		(comp x diâm.)	(n° de células)	comp.	(diâmetro)	(conexões intercelulares ampliadas)	dimensões	forma	(n° de células)	(diâmetro)
Trabalhos anteriores										
<i>B. beraense</i> (KUMANO, 1978; SHEATH et al., 1994b)	CL	20-27 x 6-8	8-11	60-90	...	ausente	19-22 x 10-12	OV	2-3	4-5
<i>B. brasiliense</i> (NECCHI, 1990b)	CL, OV	30-45 x 10-15	3-6 (5)	15-30 (22)	...	presente	...	...	...	6-7
<i>B. cayennense</i> (NECCHI, 1990b)	CL	27-40 x 7-9	8-30 (14)	30-200 (130)	80-220	ausente	12-18 x 8-10,5 (14 x 9,5)	CL, OBv	3-6	5-6
<i>B. cayennesne</i> (Kumano, 1990)	EL, ESp	29-38 x 9-13	12-17	...	...	...	20-30 x 10-13	OBv, EL	...	6-7
<i>B. cayennesne</i> (SHEATH et al., 1994b)	OBv	21-41 x 6,2-10,8 (28,9 x 8,3)	6-10 (7,5)	...	93-254 (158)	...	5,6-11,1 x 9,5-20 (7,7 x 16,5)	OV, OBv	2-5 (2,6)	...
<i>B. cylindrocellulre</i> (KUMANO, 1978)	OV	17-25 x 6-9	6-8	25-40	...	...	...	...	2-3	4-6
<i>B. equisetifolium</i> (KUMANO, 1990; SHEATH et al., 1994b)	EL, CL	25-35 x 9-11	4-7	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. hypogynum</i> (KUMANO, 1982 II; SHEATH et al., 1994b)	OBp	40-45 x 10-13	5-9	40-70	...	presente	50-65 x 18-35	OV, CL	1	4,8-6 (5,4±0,6)
<i>B. longiarticulatum</i> (NECCHI, 1990b; SHEATH et al., 1994b)	CL	22-32 x 7-9	12-22	120-250	80-160	...	13-18 x 6,5-10	OBv, CL	3-5	5-7
<i>B. macrosporum</i> (KUMANO, 1982)	OBp	30-40 x 7-12	5-7	55-100	...	presente	23-27 x 16-23	OV	1-2	...
<i>B. macrosporum</i> (NECCHI, 1990b)	CL, OV	30-58(58) x 12-18	3-16 (6)	40-200 (98)	90-220	...	32,5-60 x 20-45 (45 x 27)	CL, OBv	1-3	5-6
<i>B. macrosporum</i> (SHEATH et al., 1994b)	OBv	22,8-63,4 x 7,7-19,4 (31,8 x 9,6)	15-21 (17,7)	...	87-221 (179)	...	17,5-36 x 21,4-59,2 (26,7 x 48,5)	OBv	1-5 (3,7)	...
<i>B. turgidum</i> (KUMANO, 1982)	CI	35-50 x 3-6	5-8	40-60	...	presente	18-25 x 8-16 (21,7±2,6 x 13±3,5)	OV	1-2	5-7

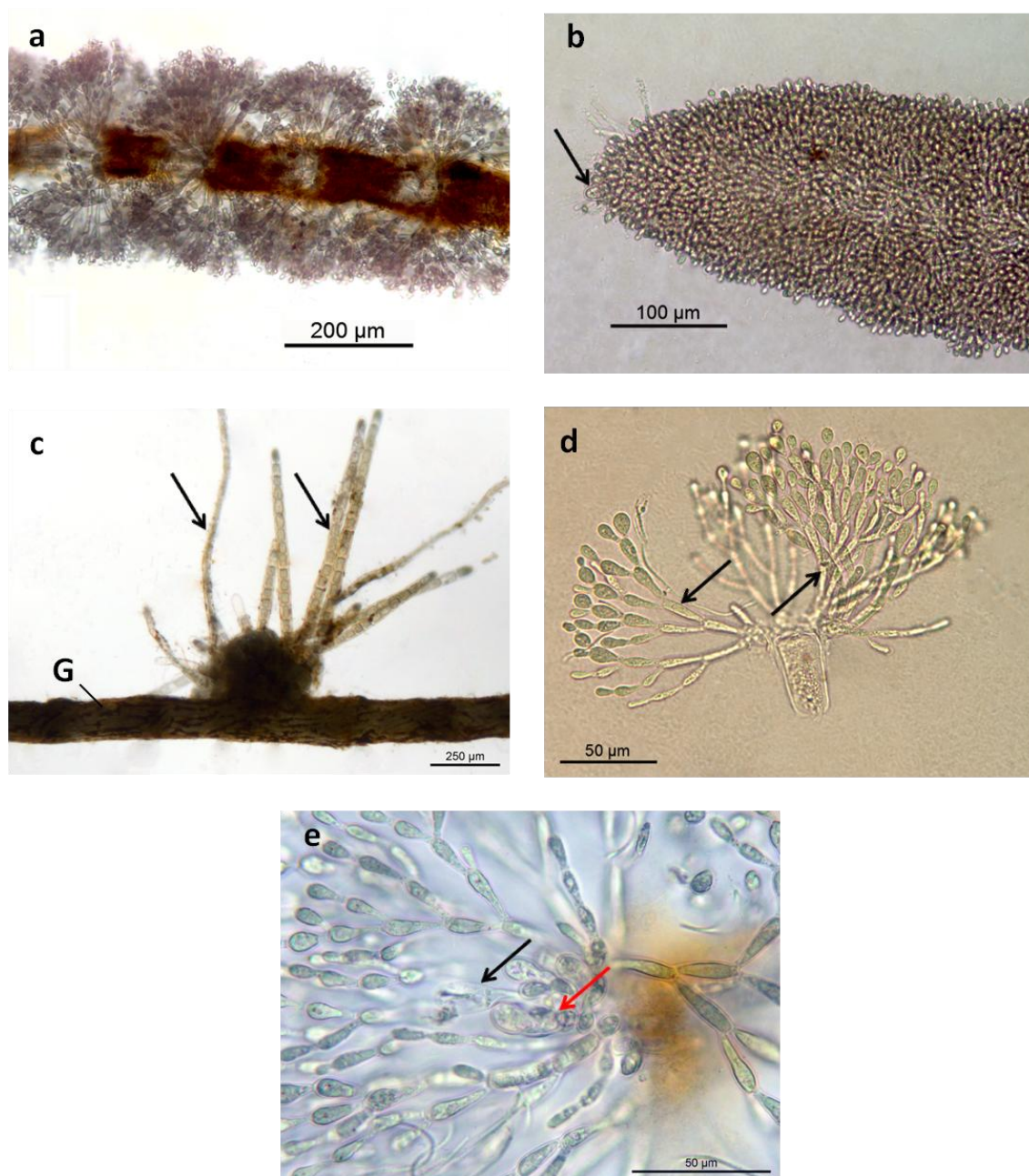


Figura 11. Fotomicrografias de *B. brasiliense*: a) parte média da planta mostrando verticilos; b) extremidade do ramo evidenciando a célula apical protrusa (seta); c) estágio “Chantransia” (setas) formado sobre o ramo do gametófito (G); d) fascículo primário (seta preta); e) ramo carpogonial mostrando tricogínio (seta preta) e célula em coroa (seta vermelha). Todas as fotomicrografias foram obtidas da amostra SP1.

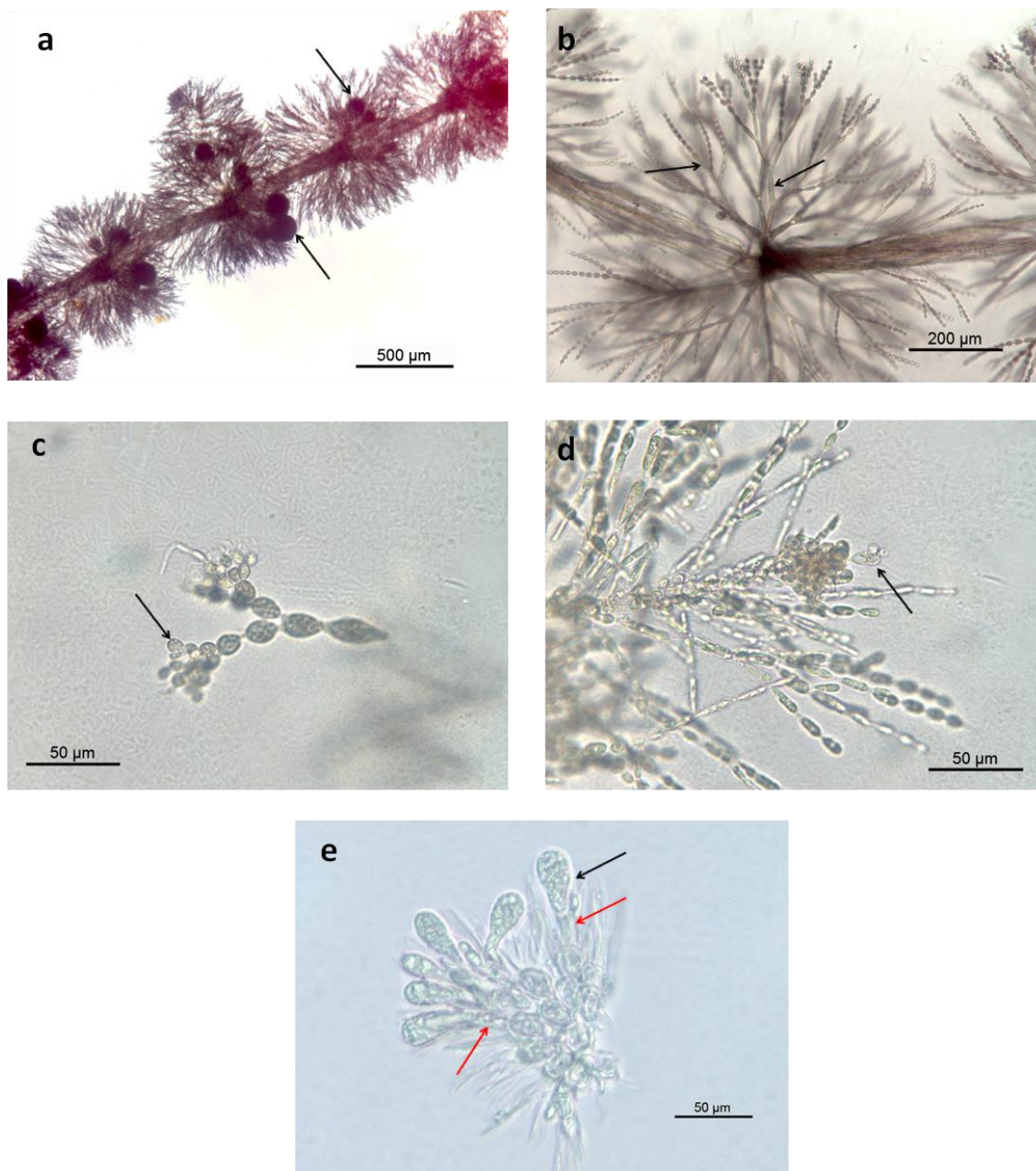


Figura 12. Fotomicrografias de *B. cayennense*: a) parte média da planta mostrando verticilos e carposporófitos (setas); b) Detalhe do verticilo mostrando fascículos primários (setas); c) ápice de fascículo primário com espermatângios (seta) e d) Detalhe de carposporófito mostrando carposporângio (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (setas vermelhas). As fotomicrografias foram obtidas das amostras MT2 (figuras a, e), RR4 (figuras b, c) e MT3 (figura d).

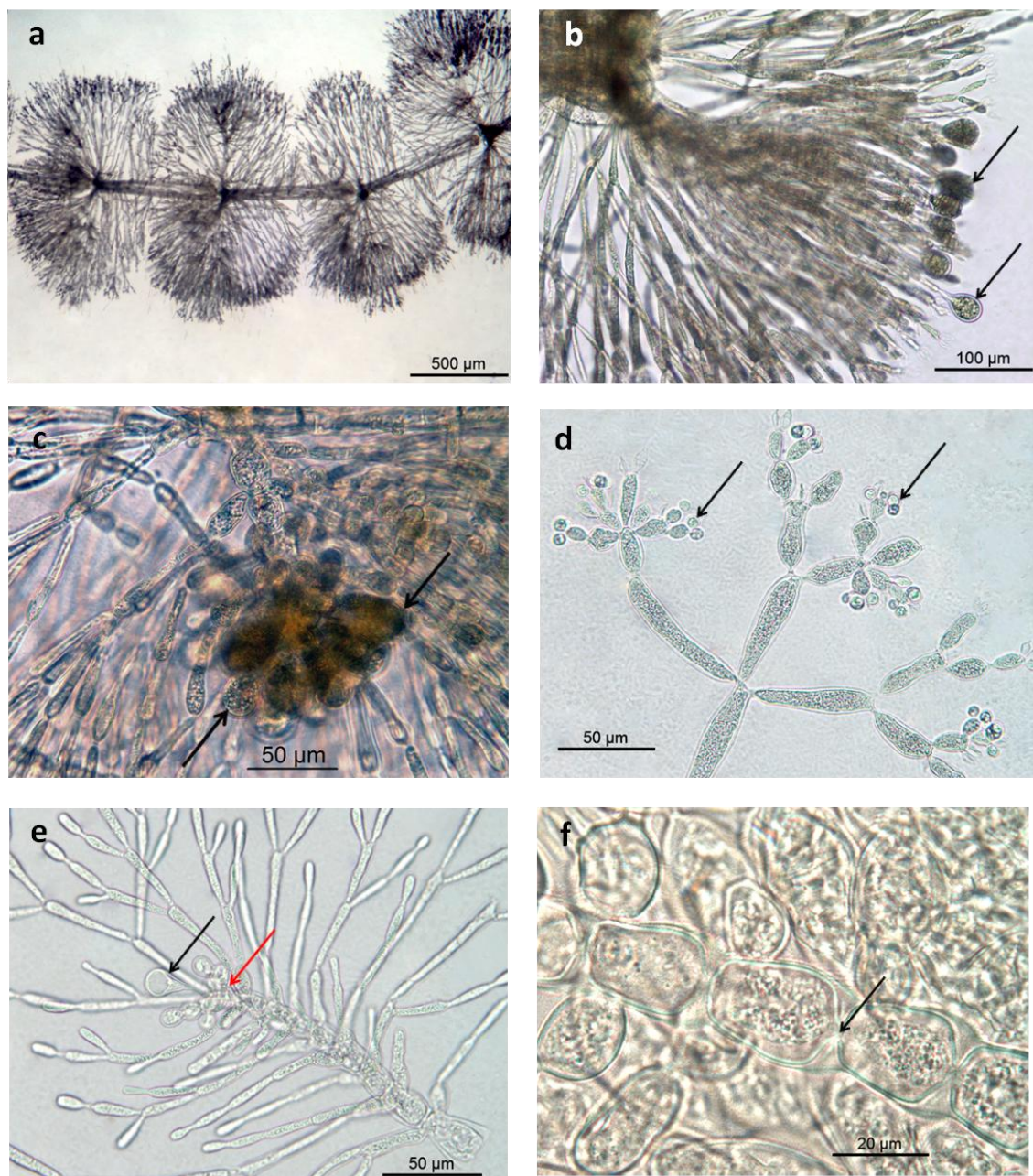


Figura 13. Fotomicrografias de *B. macrosporum*: a) parte média da planta mostrando verticilos; b) detalhe de verticilo mostrando fascículos primários com monosporângios (setas) na extremidade; c) detalhe de carposporófito carposporângios (setas); d) ápice de fascículos primários com espermatângios; e) ramo carpogonial evidenciando tricogínio (seta preta) e células em coroa (seta vermelha); f) ramo carposporofítico evidenciando as conexões intercelulares (seta). As fotomicrografias foram obtidas das amostras MT3 (figuras a, e), RR3 (figura b), AM13 (figura c), RR8 (figura d) e BA (figura f).

4. Discussão e Conclusões

As espécies das Seções *Aristata* e *Macrospora* apresentam ampla distribuição geográfica, seus principais representantes (complexos de espécies *B. cayennense* e *B. macrosporum*) têm sido encontrados nas América do Sul (Brasil e Guiana Francesa) (MONTAGNE, 1850; VIS et al. 2004; NECCHI, 1990; NECCHI et al., 1999), América do Norte (Cuba e E.U.A.) (SHEATH & COLE, 1993; SHEATH et al., 1994b), Ásia (Malásia e Japão) (KUMANO, 1978, 1982; RATNASABAPATHY & KUMANO, 1982b) e Oceania (Austrália) (ENTWISLE & FOARD, 1997). Ocorrem desde regiões tropicais (NECCHI, 1990) até subtropicais (ENTWISLE & FOARD, 1997).

A ocorrência das populações brasileiras corresponde aos padrões de distribuição geográfica reportados para outras regiões do globo. Sheath *et al.* (1994b) encontraram *B. macrosporum* (Seção *Macrospora*) amplamente distribuída na América do Norte, desde Nova Jersey (região norte) até Belize (região sul). *B. macrosporum* ocorreu somente na planície costeira e na floresta tropical (SHEATH & COLE 1992). Em síntese, os dados recentes, confirmados por dados moleculares indicam que *B. macrosporum* é uma espécie pan-tropical com ampla distribuição nos continentes melhor amostrados (América do Norte, América do Sul e Ásia). Por outro lado, *B. cayennense* parece ser uma espécie tropical da América do Sul e Ásia.

Os valores encontrados para as variáveis ambientais para as populações brasileiras foram semelhantes aos reportados para outras regiões do globo. Whitford & Schumacher (1968) encontraram *B. cayennense* e *B. macrosporum* em riachos com temperaturas de 15-30°C. Kumano (1978) encontrou em condições levemente ácidas pH 4,7-5,3 e temperaturas elevadas (23,8-26,9 °C) as espécies *B. cayennense* (ainda como

B. beraense) e *B. cylindrocellulare* (Seção *Aristata*). As demais espécies destas seções são reportadas apenas para poucas localidades sem dados ambientais disponíveis para comparação. O conjunto de dados ambientais das seções *Aristata* e *Macrospora* indica ocorrência em águas com temperaturas preferencialmente elevadas (24,8-25,5 °C) que reflete a distribuição em regiões de baixas latitude e elevação (SHEATH & HAMBROOK, 1990; SHEATH, 2003); A faixa de pH levemente ácido (5,3-5,9) foi menor do que o típico para as Rhodophyta de águas continentais (pH 6-7). Os valores de condutividade situaram-se próximos da faixa reportada para rodófitas continentais (4,5-15,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$) (SHEATH & HAMBROOK, 1990) e reflete concentração iônica baixa. Os valores de concentração de oxigênio dissolvido (5,2-5,5 mg.L^{-1}) também situaram-se dentro da grande amplitude reportada para as Rhodophyta de águas continentais (0,2-21,0 mg.L^{-1}). A velocidade de correnteza de moderada a rápida (37,8-68,5 cm.s^{-1}) indicou ocorrência destas espécies em águas mais turbulentas do que o relatado para a maioria das espécies de rodófitas, que ocorrem em águas moderadas (29-57 cm.s^{-1}).

A espécie da Seção *Acarposporophytum* (*B. brasiliense*) apresenta distribuição geográfica restrita à região de Mata Atlântica no norte do estado de São Paulo. Desde a descrição desta espécie até o momento apenas em duas localidades foram registradas a sua ocorrência (Figura 2) (NECCHI 1987, 1990b). *B. brasiliense* ocorre em águas com valores das variáveis ambientais dentro das faixas tipicamente registradas para rodófitas de águas continentais com pH (6,2), concentração de oxigênio dissolvida (5,0 mg.L^{-1}), velocidade de correnteza (40 cm.s^{-1}) e condutividade (5,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$). A temperatura é moderada (18,3°C) que reflete a distribuição em região de elevadas latitude e elevação (SHEATH & HAMBROCK, 1990; NECCHI, 1990b; SHEATH, 2003). A Seção *Acarposporophytum* ocorre em águas com temperatura moderada e de alta oxigenação,

enquanto que as espécies das Seções *Aristata* e *Macrospora* ocorrem em águas com temperaturas mais elevadas e com menor oxigenação.

Os pontos de amostragem das populações das três seções foram predominantemente (82-88%) sombreados ou parcialmente sombreados, o que indica evidente tendência de ocorrência.

Estudos anteriores envolvendo análises filogenéticas, realizados com base em dados moleculares, indicaram as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrospora* como grupos monofiléticos com alto suporte, apesar da pequena representatividade tanto em número de espécies e populações como de regiões geográficas (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al. 2005; ENTWISLE et al., 2009). No presente estudo foram incluídas amostras de novas populações brasileiras de representantes destas seções (exceto *Acarposporophytum*), bem como outras inéditas ou recentemente publicadas da América do Norte (E.U.A.), América do Sul (Guiana Francesa e Bolívia), Ásia (sudeste asiático) e Oceania (Austrália). Com base nos dados moleculares para os três marcadores testados (região de “barcode” de *cox1*, *rbcL* e *UPA*), associados aos dados morfológicos adotados neste trabalho para diferenciação das três seções, a hipótese inicial de que as seções *Acarposporophytum*, *Aristata* e *Macrosporum* constituem grupos monofiléticos dentro do gênero *Batrachospermum* foi confirmada.

A única espécie da seção *Acarposporophytum* (*B. brasiliense*) também foi reconhecida tanto com base nos dados morfológicos como moleculares (*rbcL*). Conforme destacado por Entwisle et al. (2009), o caráter único de ausência de carposporófito dentre as *Batrachospermales*, mostrou diferença genética comparativamente pequena.

A seção *Macrospora* teve redução do número de espécies reconhecidas morfológicamente, pois *B. equisetifolium* e *B. hypogynum* foram consideradas como sinônimas, permanecendo apenas *B. macrosporum* como única espécie desta seção. No entanto, com base nos dados moleculares foi possível diferenciar um conjunto formado por cinco espécies crípticas em *B. macrosporum*, considerando a topologia das árvores dos três marcadores, particularmente para as sequências de *cox1* e *rbcL* e os valores de divergência entre os grupos. A congruência observada entre as árvores produzidas para cada um dos três marcadores para *B. macrosporum* foi condizente com resultados anteriores obtidos em estudos envolvendo os mesmos marcadores, Sherwood et al. (2008) para UPA e *cox1*, e Vis et al. (2008) para *rbcL*. No trabalho de Sherwood et al. (2008) apenas a topologia da árvore e os valores de divergência registrados para UPA (0-2 pb; 0-0,5%) não foram, a exemplo dos dados deste estudo, suficientes para observar a disjunção entre as espécies crípticas observadas no complexo *B. macrosporum* entre amostras da América do Sul e América do Norte. No entanto, a árvore e os valores de variação intraespecífica (0-67 pb; 0-10,1%) obtidos com o marcador *cox1* ajudaram a elucidar esta separação e com uma variação ainda alta (0-48 pb; 0-7,2%) entre as espécies exclusivamente da América do Sul (SHERWOOD et al., 2008). O trabalho de Vis et al. (2008) complementou essas informações com o marcador *rbcL*, onde ficou clara a divergência entre as populações destes dois continentes (0-77 pb; 0-6%). Além disso, foi possível observar a formação de outros grupos menores, exclusivamente da América do Sul, que poderiam representar espécies. Os espécimes utilizados naqueles trabalhos não apresentaram características morfológicas suficientemente divergentes para apoiar os dados moleculares obtidos que permitissem distinguir esses grupos menores. Na América do Sul, a região amazônica parece ter sido um centro de dispersão de diversidade, talvez um refúgio durante a

última glaciação e abrigo de populações que colonizaram outras regiões das Américas do Sul e do Norte (VIS et al; 2008).

A seção *Aristata* manteve-se com uma diversidade relativamente grande de espécies, sendo reconhecidas quatro espécies morfológicamente distintas (*B. cayennense*, *B. cylindrocellulare*, *B. longiarticulatum* e *B. turgidum*). A única exceção foi *B. beraense*, proposta como sinônima de *B. cayennense*. Estes resultados corroboram a hipótese de que todas as espécies de cada seção reconhecidas com base em dados morfológicos seriam confirmadas pelos dados moleculares. Além disso, *B. cayennense* apresentou nítidas evidências moleculares (dados de UPA, *cox1* e *rbcL*) de representar um complexo com no mínimo duas espécies crípticas, sendo uma espécie contendo amostras da Guiana Francesa e do Brasil, uma da região norte de Mato Grosso, e outra espécie proveniente de Roraima. A sequência AF209980 de amostra coletada na Austrália descrita no trabalho de Entwistle & Foard (1997) e reportada por VIS et al. (2000) apresentou pequena divergência morfológica em relação ao espécime-tipo. Por outro lado, a divergência genética desta amostra em relação às demais da espécie foi alta com base nas sequências de *rbcL*. Trata-se de um caso de espécie pseudo-críptica, em que espécies com grande semelhança morfológica apresentaram grande divergência molecular e alguns caracteres sutis são reconhecidos que possibilitam sua distinção morfológica (MAGGS et al., 2007), tal como relatado para espécies do gênero *Grateloupia* de rodófitas marinhas em estudo realizado também com sequências de *rbcL*. (DE CLERK et al., 2005; WILKES et al., 2005). A espécie *B. cylindrocellulare*, que havia sido descrita por Kumano (1978) como intermediária entre as seções *Aristata* e *Batrachospermum*, foi confirmada como membro desta seção, como relatado por Vis et al. (informação pessoal), corroborada pelos resultados morfológicos obtidos neste trabalho.

A divergência observada para a região de “barcode” do gene *cox1* no complexo *B. cayennense* foi consideravelmente maior do que os valores encontrados para o complexo *B. macrosporum*: 0-97 pb (0-14,6%) e 0-69 pb (0-10,4%) respectivamente. Tais valores foram muito altos, ligeiramente acima do que havia sido registrado para este marcador para *B. macrosporum* em estudo anterior com 0-67 pb (< 10,1%; Sherwood et al., 2008) e de *B. helminthosum* com 0-44 pb (< 6,6%; House et al., 2008), que evidenciaram a existência de complexos, formados por conjuntos de espécies provavelmente crípticas. Os três grupos formados no complexo *B. cayennense* apresentaram valores de variação intraespecífica muito menores 0-6 pb (0-0,9%), bem como os oito grupos de *B. macrosporum* 0-7 pb (0-1,0%). Estes valores menores demonstram serem mais aplicáveis para o delineamento de espécies, a exemplo dos valores de variação intraespecíficos encontrados por Saunders (2005) em rodófitas marinhas (0-2 pb; 0-0,2%) e por House et al. (2010) em amostras de *B. gelatinosum* (0-2 pb; 0-0,2%) de diferentes localidades da América do Norte.

A variação das sequências para o gene *rbcL* observada tanto dentro do complexo *B. cayennense* (83-126 pb; 6,5-9,7%), quanto no complexo *B. macrosporum* (0 a 85 pb; 0-6,6%) foram muito altas e acima dos valores relatados em estudos anteriores com este marcador. Vis et al. (2008) observaram valores semelhantes de variação intraespecífica 0-77 pb (0-6%) para *B. macrosporum* e indicou a existência de mais uma linhagem para esta espécie. Em estudo com amostras de *B. arcuatum* da América do Norte, Ásia e Europa, Vis et al. (2010) encontraram uma divergência de 0 a 82 pb (0-6,4%), que possivelmente representa um conjunto de diferentes linhagens. Vis et al. (2012) em estudo envolvendo amostras de diferentes continentes do gênero *Kumanoa* reportaram variação intraespecífica para *K. breviarticulata* de 35pb (2,7%) e *K. abilli* de 58pb (4,5%). No trabalho de Hanyuda et al. (2004) foram evidenciadas duas linhagens com

separação geográfica de *B. helminthosum* uma de amostras do Japão com variação 2 a 33 pb (0,1–2,4%); outra dos E.U.A. com variação de 45 a 54 pb (3,5–4,2%), além de outra linhagem também do Japão, que não se agrupou com nenhuma das outras, com variação de 37 a 46 pb (2,6–3,3%) em relação às demais linhagens. Vis & Sheath (1997) também observaram valores de variação bem menores em *B. gelatinosum* (0 a 24 pb; 0–1,9%), assim como Vis & Entwistle (2000) em *B. atrum* (12 pb; 0,9%) da Austrália e Reino Unido.

Os sete grupos formados no complexo *B. macrosporum* apresentaram valores de variação interna muito baixos (0-10 pb; 0-0,8%). A divergência entre as amostras da América do Norte em relação às da América do Sul e da Ásia (76-85 pb; 5,9-6,6%) foi alta, evidenciando o grupo das amostras norte-americanas como uma espécie distinta das demais espécies sul-americanas e asiáticas que tiveram divergência de (19-35 pb ;1,5-2,6%).

Os três grupos formados no complexo *B. cayennense* ficaram isolados na árvore não sendo possível delimitar os limites de variação intraespecífica, porém estes foram muito altos (> 83 pb; 6,5 %), que confirmam a separação destes em diferentes espécies.

Esses dados demonstraram que sequências de *cox1* e *rbcL* representaram bons marcadores para comparações intra e interespecíficas nesses grupos de Batrachospermales. Considerando as informações obtidas para estes marcadores neste e em outros estudos anteriores podemos considerar *B. cayennense* como uma espécie formada por três espécies crípticas, assim como *B. macrosporum* como uma espécie formada por cinco espécies crípticas. Por outro lado, o nível de resolução das sequências de UPA foi comparativamente menor e insuficiente para detectar variações intraespecíficas, mas adequado para separar espécies dentro das seções.

5. Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.
- CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 73, n. 3, p. 203-66, Aug 1998.
- COMPÈRE, P. Taxonomic and nomenclatural notes on some taxa of the genus *Batrachospermum* (Rhodophyceae). **Belg. J. Bot.**, v. 124, p. 21-6, 1991.
- CRICHLEY, A. T.; OHNO, M. **Seaweed resources of the world**. Japan International Cooperation Agency, Nagai, 1998.
- DE CLERCK, O., GAVIO, B., FREDERICQ, S., BARBARA, I., and COPPEJANS, E. Systematics of *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence, including the reinstatement of *G. minima* and the description of *G. capensis* sp nov. **J. Phycol.**, v 41: 391-410. 2005.
- DRUMMOND AJ, ASHTON B, BUXTON S, CHEUNG M, COOPER A, DURAN C, FIELD M, HELED J, KEARSE M, MARKOWITZ S, MOIR R, STONES-HAVAS S, STURROCK S, THIERER T, WILSON A (2012) Geneious v6.1, Available from <http://www.geneious.com>
- ENTWISLE, T. J.; The setaceous species of *Batrachospermum* (Rhodophyta): a re-evaluation of *B. atrum* (Hudson) Harvey and *B. puiggarianum* Grunow including the description of *B. diatyches* sp. nov. from Tasmania, Australia **Muelleria** v 7, 425-445, 1992.
- ENTWISLE, T. J.. The discovery of Batrachospermalean taxa (Rhodophyta) in Australia and New Zealand: **Muelleria** v. 7, p. 5-16, 1993.
- ENTWISLE, T. J.; FOARD, H. J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and emended circumscriptions in sections *Aristata*, *Batrachospermum*, *Turfosa* and *Virescentia*. **Austr. Syst. Bot.** , v. 10, p. 331-80, 1997.
- ENTWISLE, T. J.; FOARD, H. J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and records in sections *Contorta* and *Hybrida*. **Austr. Syst. Bot.**, v. 12, p. 615-33, 1999.
- ENTWISLE, T. J.; VIS, M. L.; CHIASSON, W. B.; NECCHI, O. J.; SHERWOOD, A. R. Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta) - a synthesis. **J. Phycol.**, v. 45, p. 704-15, 2009.

- FRESHWATER, D. W.; FREDERICQ, S.; BUTLER, B. S.; HOMMERSAND, M. H.; CHASE, M. W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 15, p. 7281-5, Jul 19 1994.
- GUIRY M.D. The life history of *Liagora harveyana* (Nemaliales, Rhodophyta) from South-eastern Australia. *British Phycological Journal* 25: 353-362. 1990.
- HOUSE, D. L.; SHERWOOD, A. R.; VIS, M. L. Comparison of three organelle markers for phylogeographic inference in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North America. **Phycological Research**, v. 56, n. 2, p. 69-75, 2008.
- HUGHEY, J.R. & GABRIELSON, P.W. 2012. Comment on “Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment”. **Botany**, 90: 1191–1194. doi: 10.1139/b2012-
- KUMANO, S. Notes on freshwater red algae from West Malaysia. **Bot. Mag. Tokyo** 91: 97-101, 1978.
- KUMANO, S. Four taxa of the section *Moniliformia*, *Hybrida* and *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Rhodophyta, Nemalionales) from Sungai Gombak and Sungai Pusu, Selangor, West Malaysia. **Jap. J. Phycol.** 30: 289-296, 1982.
- KUMANO, S. Carpogonia and carposporophytes of *Batrachospermum* (Rhodophyta) from French Guiana. **Cryptogamie**. 11 (4): 281-292, 1990.
- KUMANO, S. Taxonomy of the family Batrachospermaceae (Batrachospermales, Rhodophyta). **Jap. J. Phycol.** 41: 253-272, 1993.
- KUMANO, S. Freshwater red algae of the world. **Bristol, Biopress Ltd**, p. 69, p 163, 168 p, 2002.
- KUMANO, S. & RATNASABAPATHY, M. Studies on Freshwater Red Algae of Malaysia III. Development of Carposporophytes of *Batrachospermum cayennense* Montagne, *B. beraense* Kumano and *B. hypogynum* Kumano & Ratnasabapathy from temperate Japan. **Bot. Mag. Tokyo**. 95: 219-228, 1982.
- MAGGS, A. C., VERBRUGGEN, H. and CLERCK, O. Molecular systematics of red algae: building future structures on firm foundations. In: BRODIE, J. & LEWIS **Unravelling the algae: the past, present and future**. The Systematic Association: Taylor & Francis Group, p103-116, 2007.
- MAGNE, F. Le cycle de développement des Rhodophycées et son évolution. *Mem. Soc. bot. Fr.*:247-268, 1972.
- MONTAGNE, C.. *Cryptogamie guyanensis, seu plantarum cellularum in Guyana gallica annis 1835-1849 a cl. Leprieur collectarum enumeration universalis*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser.* 2, 13: 283-309, 1850.

- NECCHI, O. J. Studies on the freshwater Rhodophyta of Brazil: *Batrachospermum brasiliense* sp. nov. from the State of São Paulo, southern Brazil.. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 47, p. 441-446, 1987.
- NECCHI, O. J. Evaluation of numeric taxonomic characters in brazilian species of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Batrachospermales). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 50, n. 3, p. 627-641, 1990a.
- NECCHI, O. J. Revision of the genus *Batrachospermum* Roth (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil. **Berlin; J. Cramer**, p. 201 p. (Bibliotheca Phycologica, 84). 1990b.
- NECCHI, O. J.; BRANCO, C. C. Z.; BRANCO, L. H. Z. Distribution of Rhodophyta in streams from São Paulo State, southeastern Brazil. **Algol. Stud.** , p. 97: 43-57, 1999.
- NECCHI, O. J.; ENTWISLE, T. J. A reappraisal of generic and subgeneric classification in the Batrachospermaceae (Rhodophyta). **Phycologia**, v. 29, p. 478-88, 1990.
- NECCHI, O. J.; VIS, M. L. **Monograph of the genus Kumanoa (Rhodophyta, Batrachospermales)**. Stuttgart: J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 2012. 79 p. ISBN 9783443600433 (pbk.)0067-8112 ;.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, January 1, 1998 1998.
- PUESCHEL, C. M.; COLE, K. M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. **Am. J. Bot.**, v. 69, p. 703-20, 1982.
- RATNASABAPATHY, M., & KUMANO, S. Studies on freshwater red algae of Malaysia II. Three species of *Batrachospermum* (Rhodophyta, Nemalionales) from temperate Japan. **Jap. J. Phycol.** 30 (2): 122-124, 1982b.
- ROBBA, L.; RUSSELL, S. J.; BARKER, G. L.; BRODIE, J. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). **Am. J. Bot.**, v. 93, p. 1101-108, 2006.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 9780879695774. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=9mO2Fx0CuEYC> >.
- SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. **Phil. Trans. Roy. Soc. B** v. 360, p. 1879-88, 2005.
- SAUNDERS, G. W.; MCDEVITT, D. L. **Methods for DNA barcoding photosynthetic protists emphasizing the macroalgae and diatoms. In DNA barcodes: methods and protocols**. KRESS, W.J. & ERICKSON, D.L. (Eds.), p. 3-8. Springer Science, New York, 2012.

- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 3ª edição. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003.
- SHEATH, R. G. **The biology of freshwater red algae**. In *Progress in Phycological Research*. Biopress, Bristol, 1984.
- SHEATH, R. G. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. In: WEHR, J. D. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Red Algae**: Elsevier Science, 2003. p.197–224. ISBN 9780127415505.
- SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 7. Section *Turfosa*. **Phycologia**, v. 30, p. 872-884, 1994c.
- SHEATH, R. G.; HAMBROOK, J. A. The biology of the red algae. In: COLE, K. M. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Freshwater ecology**: Cambridge University Press, New York., 1990. p.455–476.
- SHEATH, R. G.; MÜLLER, K. M.; COLBO, M. H.; COLE, K. M. Incorporation of freshwater Rhodophyta into the cases of *Chironomid larvae* (Chironomidae, Diptera) from North America. **Journal of Phycology**, v. 32, n. 6, p. 949-952, 1996.
- SHEATH, R. G.; MÜLLER, K. M.; LARSON, D. J.; COLE, K. M. Incorporation of freshwater Rhodophyta into the cases of caddisflies (trichoptera) from North America. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 6, p. 889-896, 1995.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 7. Section *Hybrida*. **Phycologia**, v. 34, p. 431-38, 1995.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 1. Section *Contorta*. **J. Phycol.**, v. 28, p. 237-46, 1992.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 2. Chromosome numbers. **J. Phycol.**, p. 32:304-6, 1993b.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 5. Section *Aristata*. **Phycologia**, v. 33, p. 404-14, 1994b.
- SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 6. Section *Turfosa*. **J. Phycol.**, v. 30, p. 872-84, 1994c.
- SHERWOOD, A.R. & PRESTING, G.G.. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 43:605-608.2007

- SHERWOOD, A. R.; VIS, M. L.; ENTWISLE, T. J.; NECCHI, O. J.; PRESTING, G. G. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. **Phycol. Res.**, v. 56, p. 269-79, 2008.
- SHEATH, R.G. & WHITTICK, A. The unique gonimoblast propagule of *Batrachospermum breutelii* (Batrachospermales, Rhodophyta). **Phycologia** 34: 33-38, 1995.
- SIRODOT, S. **Les Batrachospermes, Organisation, fonctions, Développement, Classifications.** Librairie de Académie de Médecine, Paris, 1884.
- SKUJA, H. **Untersuchungen über die Rodophyceen des Süßwassers.** III. Arch. Protistenk. 80: 357-366, 1933.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods):** Sunderland, Sinauer Associates 2003.
- THIERS, B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium, 2014. Disponível em: < <http://sweetgum.nybg.org/ih/> >.
- VIS, M. L.; CAMERON HODGE, J.; NECCHI, O. J. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. **Journal of Phycology**, v. 44, n. 4, p. 882-888, 2008.
- VIS, M. L.; CHIASSON, W. B.; SHEATH, R. G. Phylogenetic relationships of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. **Phycologia**, v. 44, p. 441-46, 2005.
- VIS, M. L.; ENTWISLE, T. J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. **J. Phycol.**, v. 36, p. 1175-182, 2000.
- VIS, M. L.; MILLER, E. J.; HALL, M. M. Biogeographical analyses of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America using molecular and morphological data. **Phycologia**, p. 40: 2-9, 2001.
- VIS, M. L.; NECCHI, O. J.; CHIASSON, W. B.; ENTWISLE, T. J. Molecular phylogeny of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 48, p. 750-758, 2012.
- VIS, M. L.; SAUNDERS, G. W.; SHEATH, R. G.; DUNSE, K.; ENTWISLE, T. J. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences. **J. Phycol.**, v. 34, p. 341-50, 1998.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 9. Section *Batrachospermum*: description of five new species. **Phycologia**, v. 35, p. 124-34, 1996.

- VIS, M.L., SHEATH, R.G. & 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.; SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8a. Section *Batrachospermum*: *Batrachospermum gelatinosum*. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996a.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8b. Section *Batrachospermum*: previously described species. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996b.
- VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; ENTWISLE, T. J. Morphometric analysis of *Batrachospermum* section *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) type specimens. **Eur. J. Phycol.**, v. 30, p. 35-55, 1995.
- WHITTFORD, L. A. & SCHUMACHER, G.J. Notes on the ecology of some species of fresh-water algae. **Hydrobiologia** 32: 225-236, 1968.
- WILKES, R.J., MCIVOR, L.M., and GUIRY, M.D. Using *rbcL* sequence data to reassess the taxonomic position of some *Grateloupia* and *Dermocorynus* species (Halymeniaceae, Rhodophyta) from the north-eastern Atlantic. **Eur. J. Phycol.**, v. 40: 53–60. 2005.