



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

Douglas de Castro Agostinho

Revisão da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales)

São José do Rio Preto
2017

Douglas de Castro Agostinho

Revisão da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales)

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Necchi Junior

São José do Rio Preto
2017

Agostinho, Douglas de Castro.
Revisão da seção Virescentia do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales) / Douglas de Castro
Agostinho. – São José do Rio Preto, 2017
120 f. : il., tabs.

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

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

CDU – 582.26

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

Revisão da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum*
(Rhodophyta, Batrachospermales)

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

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto
14 de fevereiro de 2017

RESUMO

A seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* corresponde a espécies com aparência esverdeada e verticilos bem desenvolvidos, carposporófitos grandes produzidos isoladamente ou em pares e inseridos no eixo principal, ramos carpogoniais retos e curtos originados das células pericentraais ou células fasciculares proximais, e carpogônio com tricogínios alongados e pedicelados. O presente estudo teve como objetivo inferir as relações filogenéticas, bem como os limites de variação intra e interespecífico das espécies da seção *Virescentia* com base na análise morfológica e molecular, utilizando caracteres diagnósticos atualmente aceitos e dois marcadores moleculares: gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO (*rbcL* – 1.282 pares de base, pb) e as regiões de “barcode” (664 pb) e “mini-barcode” (246 pb) do gene mitocondrial que codifica a subunidade 1 da citocromo c oxidase (*cox1*). Foram analisadas amostras provenientes das regiões biogeográficas neotropical, neártica e paleártica, além de exsicatas dos espécimes-tipo da seção provenientes do Herbário PC (Paris, França) e exsicatas de espécimes do Brasil e Japão. Análises baseadas nas sequências de *rbcL*, *cox1* e “mini-barcode” foram congruentes, indicando níveis de divergência suficientes para distinguir espécies dentro da seção. Análises moleculares revelaram a seção *Virescentia* como monofilética e evidenciaram clados bem definidos, com nítida repartição biogeográfica e associados a uma divergência relativamente alta nas sequências entre estes grupos, o que sugere que as amostras das diferentes regiões do globo correspondem a, pelo menos, cinco espécies distintas: *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *B. helminthosum*, *Batrachospermum* sp.1 e *Batrachospermum* sp.2. O exame dos tipos nomenclaturais, bem como de amostras críticas na história do grupo, permitiu reconhecer dez espécies para a seção *Virescentia* com base em caracteres morfológicos diagnósticos e

distribuição biogeográfica: *B. bakarense*, *B. crispatum*, *B. gombakense*, *B. gulbenkianum*, *B. transtaganum*, *B. helminthosum*, *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum sp.1* e *Batrachospermum sp.2*.

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

ABSTRACT

Section Virescentia of genre Batrachospermum comprises species with a greenish appearance and well-developed whorls, carposporophytes are produced singly or in pairs along the main axis, carpogonial branches are straight and short, arise from pericentral cells or proximal fascicle cells and carpogonia are elongate with cylindrical and pedicellate trichogynes. The goals of this study were to infer the phylogenetic relationships, as well as the limits of intra and interspecific variation among the species of Virescentia section, based on morphological and molecular analyses, using the diagnostic characters currently accepted and two molecular markers: the plastidial gene that encodes the RUBISCO large subunit (rbcL – 1282 bp) and the “barcode” (664 bp) and “mini-barcode” (246 bp) regions of the mitochondrial gene cox1 that encodes the cytochrome c oxidase sub-unity 1. We analyzed samples from the neotropical, nearctic and palearctic biogeographic realms and dried archival samples (type specimens) from PC Herbarium (Paris, France) and dried archival samples from Brazil and Japan. Analyses based on rbcL, cox1 and mini-barcode sequences were congruent and showed section Virescentia as a clear monophyletic group, with enough divergence to distinguish species among the section. Molecular analyses revealed the Virescentia section as monophyletic and showed well-defined clades, with distinct biogeographical distribution and associated with a relatively high divergence in sequences between these groups, suggesting that the samples of the different parts of the world correspond to at least five distinct species: B. viride-brasiliense, B. vogesiacum, B. helminthosum, Batrachospermum sp.1 and Batrachospermum sp.2. The examination of types, as well as critical samples in the history of the group, allowed to recognize ten species for the Virescentia section based on diagnostics morphological characters and biogeographic distribution: B. bakareense, B. crispatum, B. gombakense, B. gulbenkianum, B. transtaganum, B.

helminthosum, *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum* sp.1 *and* *Batrachospermum* sp.2.

Key index words: Batrachospermales, Batrachospermum, cox1, rbcL, Rhodophyta, systematics, Virescentia

Agradecimentos

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

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

À Coordenação do PPG Microbiologia e aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP pelo encaminhamento dos expedientes nas várias etapas do Doutorado.

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

Ciro, Monica e Rogério pelas coletas realizadas para que este trabalho pudesse se concretizar e à professora Morgan Vis por disponibilizar amostras e tipos nomenclaturais.

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

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

Muito obrigado!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1.	Gênero <i>Batrachospermum</i>	15
1.2.	Conceitos de espécie e delimitação de espécie	18
1.3.	Hipóteses	20
1.4.	Objetivos gerais.....	20
2.	Referências	21
CAPÍTULO 1: Sistemática molecular da seção <i>Virescentia</i> do gênero <i>Batrachospermum</i> (Rhodophyta, Batrachospermales).....		
1.	Introdução.....	29
1.1.	Análises moleculares em Batrachospermales.....	29
1.2.	DNA “barcoding”	31
1.3.	“Mini-barcode”	33
1.4.	Objetivos	34
2.	Materiais e Métodos	34
2.1.	Preservação.....	38
2.2.	Análises Moleculares	38
2.2.1.	Extração de DNA.....	38
2.2.2.	Amplificação de DNA	39
2.2.3.	Eletroforese em gel de agarose	41
2.2.4.	Purificação e quantificação dos produtos de PCR.....	41
2.2.5.	Sequenciamento e alinhamento	42
3.	Resultados.....	48
3.1.	Análises das sequências de <i>rbcL</i>	48
3.2.	Análises das sequências de <i>cox1</i>	54
3.3.	Análises das sequências de “mini-barcode”	56
3.4.	Análise combinada	58
4.	Discussão.....	59
5.	Referências	64
CAPÍTULO 2: Taxonomia da seção <i>Virescentia</i> do gênero <i>Batrachospermum</i> (Rhodophyta, Batrachospermales).....		
1.	Introdução.....	71
1.1.	Objetivos	74
2.	Materiais e Métodos	74
2.1.	Preservação.....	76
2.2.	Análises Morfológicas.....	76
3.	Resultados.....	78
3.1.	Tratamento taxonômico.....	78
4.	Discussão.....	110
5.	Referências	114
CONCLUSÕES GERAIS		119

1. INTRODUÇÃO GERAL

As algas vermelhas (Rhodophyta) representam um grupo antigo, sendo que seu mais antigo registro fóssil é datado de um período situado entre 1,267 bilhões de anos a 723 milhões de anos. A maioria das rodófitas habita ambientes marinhos (98%), mas muitos táxons bem conhecidos são de habitats de água doce e nascentes de água quente e ácida. Certas algas vermelhas marinhas podem viver em profundidades onde a luz quase não penetra, como as algas crostosas calcificadas observadas a 268 metros de profundidade nas Bahamas (FRANCESCHINI et al., 2010). Também foram relatadas em florestas tropicais como membros de comunidades subaéreas (GURGEL & LOPEZ-BAUTISTA, 2007). Em regiões tropicais e subtropicais dos ecossistemas marinhos costeiros, Rhodophyta representa mais de 60% das espécies de macroalgas (NORTON et al., 1996). No Brasil, mais de 640 espécies de macroalgas marinhas são conhecidas ao longo da costa do país, sendo que as rodófitas somam mais de 390 espécies, correspondendo a cerca de 60% da diversidade de macroalgas (HORTA et al., 2001). As rodófitas continentais ocorrem geralmente em águas correntes e estão amplamente distribuídas em bacias de drenagem de regiões árticas a tropicais (NECCHI et al., 1999). No Brasil foram registradas aproximadamente 50 espécies de rodófitas continentais (NECCHI, 1989, 1990a; NECCHI et al., 1999). Rhodophyta é considerado grupo irmão das algas verdes (Chlorophyta) e também das glaucófitas (LOPEZ-BAUTISTA, 2010). Segundo Graham & Wilcox (2009), são estimados de 500 a 600 gêneros e pouco mais de 6.000 espécies de algas vermelhas e acredita-se que o número de espécies possa chegar a 20.000 (NORTON et al., 1996), devido às recentes descobertas de espécies crípticas.

As algas vermelhas têm geralmente tamanho médio (alguns milímetros a algumas dezenas de centímetros). Elas raramente são unicelulares, quase sempre filamentosas, com os

filamentos se agregando muitas vezes em pseudoparênquima para formar lâminas ou tiras. São as únicas macroalgas que possuem representantes parasitas obrigatórios heterótrofos e, entre estes últimos, mais de 85% são adelfoparasitas, isto é, parasitas estreitamente aparentados a seu hospedeiro (FRANCESCHINI et al., 2010).

As algas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos como produtores primários e, portanto, como fonte de alimento, produção de oxigênio e ciclagem de nutrientes (BLANCK et al., 1984). Além de sua importância evolutiva e ecológica, as rodófitas apresentam grande importância econômica, movimentando mais de dois bilhões de US dólares por ano, principalmente como alimento humano ou para a extração de substâncias químicas de natureza diversa, como os ficocoloides (ARMISEN, 1995).

Rodófitas não possuem clorofilas *b* e *c*, mas contêm ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) na forma de ficobilissomos em tilacoides não empilhados (GRAHAM & WILCOX, 2009). Os membros desse grupo não apresentam flagelos e centríolos em nenhum estágio de vida (GABRIELSON et al., 1990; GRAHAM & WILCOX, 2009). O cloroplasto é envolto por duas membranas e produz amido das florídeas, que é armazenado no citoplasma. Há evidências que o cloroplasto das algas vermelhas originou-se através da endossimbiose primária de uma cianobactéria, sendo que essa organela compartilha um ancestral comum com as algas verdes e glaucófitas (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1995; DELWICHE et al., 1995; CAVALIER-SMITH, 1998; MCFADDEN, 1999; BHATTACHARYA et al., 2004; RODRIGUEZ-EZPELETA et al., 2005).

Tradicionalmente, o filo Rhodophyta era dividido em duas classes ou subclasses, Bangiophyceae (Bangiophycidae) e Florideophyceae (Florideophycidae), baseado nas características morfológicas e histórico de vida (GARBARY & GABRIELSON, 1990). No entanto, estudos recentes baseados em filogenia molecular concluíram que Florideophyceae forma um grupo monofilético com a ordem Bangiales, que pertence à classe Bangiophyceae

(OLIVEIRA & BHATTACHARYA, 2000; MULLER et al., 2001; YOON et al., 2002; SAUNDERS & HOMMERSAND, 2004). Bangiophyceae, que no passado foi dividida em seis ordens (Bangiales, Cyanidiales, Compsopogonales, Erythropeltidales, Porphyridiales, e Rhodochaetales), atualmente é formada por uma série de grupos pequenos que definem as linhagens ancestrais das algas vermelhas (GABRIELSON et al., 1985; FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994). É composta pelo grupo ancestral que deu origem às Florideophyceae e ao cloroplasto das algas cromófitas através de endossimbiose secundária (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1995; OLIVEIRA & BHATTACHARYA, 2000) e constitui um grupo parafilético (FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994; MULLER et al., 2001). Florideophyceae é monofilética e inclui 99% dos gêneros de algas vermelhas. Apresenta uma maior complexidade morfológica e de histórico de vida e é claramente definida por uma dupla sinapomorfia: a presença de filamentos gonimoblásticos e de tetrásporos no ciclo de reprodução (FRESHWATER et al., 1994; RAGAN et al., 1994; FRANCESCHINI et al., 2010).

Muller et al. (2001) compararam sequências do gene nuclear que codifica a subunidade ribossômica pequena (SSU rDNA) para vinte membros de Bangiophycidae e de dois membros de Florideophycidae para obter informações sobre a evolução do grupo. Com base em suas análises eles mostraram que o filo Rhodophyta é formado por duas classes, Florideophyceae e Bangiophyceae, sendo este último composto por oito ordens: Bangiales, Porphyridiales (1, 2 e 3), Compsopogonales, Erythropeltidales, Rhodochaetales e Cyanidiales (Figura 1). Saunders & Hommersand (2004) utilizaram informações sobre filogenia molecular (marcadores SSU, rDNA e gene plastidial que codifica a subunidade grande da RuBisCO – *rbcL*), diversidade morfológica e registro fóssil das algas vermelhas para revisar a taxonomia do grupo, propondo a criação do sub-reino Rhodoplantae com dois filos, Cyanidiophyta e Rhodophyta, sendo o último subdividido nos subfilos Rhodellophytina

(classe Rhodellophyceae), Metarhodophytina (classe Compsopogonophyceae) e Eurhodophytina (classes Bangiophyceae e Florideophyceae) (Figura 1). No entanto, segundo Yoon et al. (2006), as Cyanidiophyta compartilham muitas características com Rhodophyta, e a criação de um sub-reino e dois filos não é necessária. Com base em resultados de múltiplos marcadores moleculares, Yoon et al. (2006) propuseram sete linhagens de Rhodophyta que devem ser reconhecidas como classes. Como as Cyanidiophyceae divergiram primeiro na evolução das rodófitas e são separadas das outras linhagens, foi proposto a criação dos subfilos Cyanidiophytina e Rhodophytina. Este último agrupa todas as demais linhagens de algas vermelhas e está subdividida nas classes Bangiophyceae, Florideophyceae, Compsopogonophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae, sendo que as duas primeiras formam um grupo monofilético (YOON et al., 2006) (Figura 1).

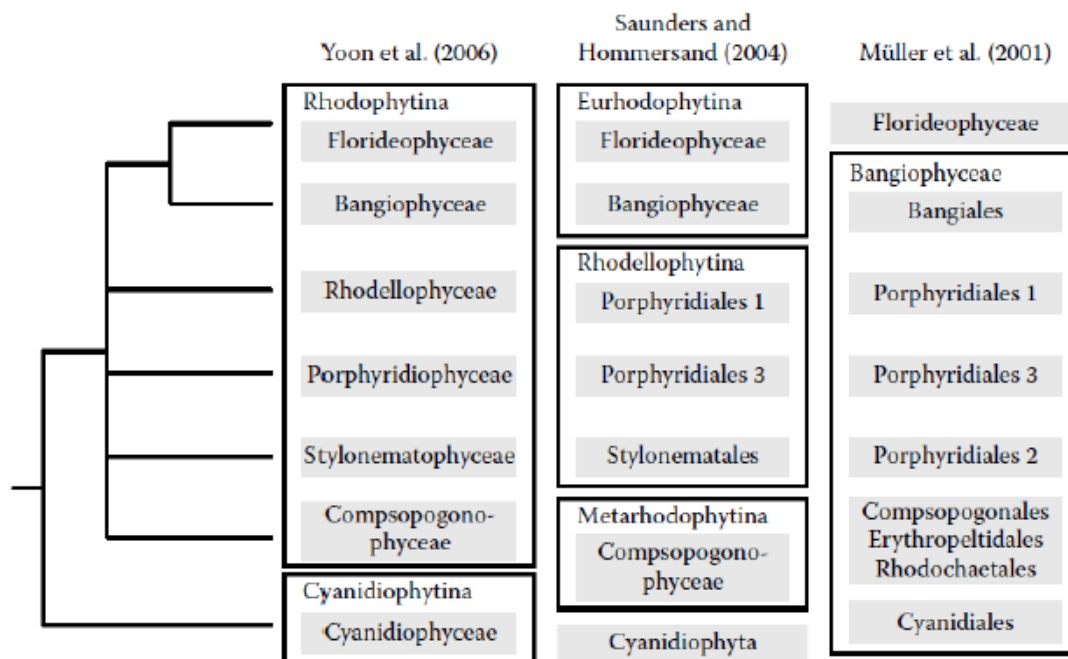


Figura 1. Filogenia das algas vermelhas segundo autores recentes (YOON et al, 2006). Três esquemas da classificação das algas vermelhas para subfilos (caixas) e classes/ordens (sombreado) são representados.

Florideophyceae apresenta 99% das espécies conhecidas, o equivalente a aproximadamente 6.000 espécies (GRAHAM & WILCOX, 2009) ou 6.805 segundo Guiry &

Guiry (2017). O número de ordens reconhecidas varia de 16 (YOON et al., 2006) a 23 (LE GALL & SAUNDERS, 2007) e tende a crescer com a realização de estudos de grupos específicos baseados em dados moleculares. A classificação das ordens e famílias de Florideophyceae é feita, em grande parte, com base nas características dos ciclos de vida e tipos de reprodução sexuada. Tais organismos crescem por meio de células apicais e consistem de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas através de “pit-connections” (conexões intercelulares entre células adjacentes), as quais, em nível ultraestrutural, formam os chamados “pit plugs” (GRAHAM & WILCOX, 2009). Caracteres ultraestruturais dos “pit plugs” são importantes para delimitação das ordens, tais como número e arranjo das camadas. Outra característica que também complementa a caracterização das ordens de rodófitas é a composição química da parede celular: ágar ou carragenana (FRESHWATER et al., 1994). Vários tipos de “pit-plugs” foram identificados por diferirem no número de “caplayers” (zero, um ou dois) e pela presença ou ausência de uma “capmembrane”. Nove ordens (Hildenbrandiales, Corallinales, Acrochaetiales, Palmariales, Batrachospermales, Ahnfeltiales, Bonnemaisoniales, Gracilariales e Rhodogorgonales) foram estabelecidas principalmente pelas características ultraestruturais dos “pit-plugs” (FRESHWATER et al., 1994).

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

apenas uma família (Batrachospermaceae) com circunscrição expandida (incluindo Lemaneaceae e Psilosiphonaceae).

A estrutura básica dentro da ordem parecia bem estabelecida até Necchi & Entwisle (1990) questionarem se a classificação de vários táxons era informativa, consistente, e filogeneticamente coerente, e proporem uma revisão radical na classificação. Entwisle & Foard (1997) descreveram um grupo de espécies da Austrália e Nova Zelândia que não se encaixavam bem em nenhuma das seções de *Batrachospermum* descritas para o Hemisfério Norte, tornando claro que algumas mudanças seriam necessárias. Vis et al. (1998) publicaram a primeira árvore filogenética baseada em dados moleculares, indicando que uma nova reestruturação, com base nos dados morfológicos e citológicos, deveria ser proposta à luz dos novos dados moleculares. A proposta de Entwisle et al. (2009) representa o esquema taxonômico mais recente e atualizado para a ordem como um todo. A principal novidade, além do reconhecimento de uma única família (Batrachospermaceae com nove gêneros), foi o reconhecimento do gênero *Kumanoa*, resultado da elevação das antigas seções *Contorta* e *Hybrida* do gênero *Batrachospermum*. A elevação de grupos monofiléticos menores (geralmente reconhecidos como seções de *Batrachospermum*) para o nível gênero será a tendência na taxonomia do grupo nos próximos anos e o exemplo mais recente foi a proposição do gênero *Sheathia* (antiga seção *Helminthoidea*) (SALOMAKI et al., 2014). Seguindo essa mesma linha, a seção *Setacea* foi recentemente elevada para gênero (ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016).

1.1. Gênero *Batrachospermum*

Dentre as rodófitas continentais da ordem Batrachospermales, o gênero *Batrachospermum* (família Batrachospermaceae) é o mais especioso, com pelo menos 112

espécies reconhecidas mundialmente segundo Kumano (2002) e 98 segundo Guiry & Guiry (2016). O gênero é bastante diverso morfológicamente e distinto dos outros da ordem com base nas seguintes características: talo geralmente flácido, mais ou menos mucilaginoso e composto por distintos filamentos axiais com verticilos regulares e de ramos laterais de crescimento definido; carposporófitos (ausentes em *B. brasiliense* Necchi) esféricos ou semiesféricos, diretamente resultantes do carpogônio fecundado; e ramo carpogonial mais ou menos reto e radialmente simétrico (não torcido espiralmente ou fortemente curvado) (PUESCHEL & COLE, 1982; SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; ENTWISLE et al., 2009). O gametófito macroscópico é dominante no histórico de vida e suas características são frequentemente utilizadas na discriminação taxonômica em nível específico. *Batrachospermum* apresenta reprodução oogâmica, onde o espermácio não-flagelado fecunda o carpogônio. Diferente de outras algas vermelhas de Florideophyceae, *Batrachospermum* e gêneros relacionados não apresentam tetrasporângio, mas possuem dois estágios esporofíticos (carposporófito e fase ‘Chantransia’) e um estágio gametofítico (SHEATH, 1984; KUMANO, 2002; SHEATH, 2003). A fase ‘Chantransia’ corresponde à fase tetrasporofítica do histórico de vida dos membros de Batrachospermales e Thoreales (NECCHI & ZUCCHI, 1997; PUESCHEL et al. 2000; ZUCCHI & NECCHI, 2003). Esta fase é morfológicamente indistinguível das *Audouinella* (Acrochaetiales).

As algas vermelhas de águas continentais pertencentes ao gênero *Batrachospermum* podem ter importância como fonte de alimento e abrigo para invertebrados e também como bioindicadores de poluição antropogênica relativamente baixa (SHEATH & HAMBROOK, 1990; SHEATH et al., 1995; SHEATH et al., 1996). Espécies de *Batrachospermum* e outros membros de Batrachospermales não possuem propágulos resistentes à dessecação, o que pode limitar a capacidade de dispersão (SHEATH & HAMBROOK, 1990). Por outro lado, espécies de *Batrachospermum* foram reportadas para todo o globo, do ártico aos trópicos, e

algumas espécies apresentam ampla distribuição, tendo sido coletadas em mais de um continente (KUMANO, 2002). Estes organismos são tipicamente encontrados em ambientes bem oxigenados, aderidos a rochas ou a troncos lenhosos submersos e macrófitas (SHEATH, 1984).

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

O gênero *Batrachospermum* tem sido demonstrado como parafilético em todos os estudos filogenéticos moleculares realizados (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009). Há evidências convincentes desse parafiletismo (KAPRAUN et al., 2007) e em um estágio que não se pode mais ser taxonomicamente corrigido com pequenos ajustes. Entwisle et al. (2009) propuseram uma revisão da ordem Batrachospermales, que resultou na aceitação provisória do gênero *Batrachospermum* e reconhecimento de oito seções – *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Helminthoidea*, *Macrospora* Kumano, *Setacea* De Toni, *Turfosa* Sirodot e *Virescentia* Sirodot. A maioria das seções carece de análises mais amplas incluindo número representativo de espécies e de populações de cada espécie. Salomaki et al. (2014) propôs a elevação da seção *Helminthoidea* para o nível de gênero com nome *Sheathia*. A elevação de grupos monofiléticos menores para o nível gênero parece ser a tendência recente na taxonomia do grupo e o exemplo mais recente foi a elevação da seção *Setacea* para o nível

gênero (ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016). Em contrapartida, Entwisle et al. (2016) adotaram posição diferente, propondo um gênero amplo *Nothocladus*, incluindo a seção *Setacea* e vários grupos de espécies da Australásia.

Os trabalhos taxonômicos recentes mais relevantes sobre o gênero resumem o conhecimento atual no nível de espécie e são brevemente comentados a seguir: Necchi (1990b) realizou revisão das espécies do gênero para o Brasil, incluindo descrições detalhadas de 29 espécies, sendo duas delas descritas como espécies novas para a Ciência. Sheath e Vis realizaram trabalhos de revisão para os grupos (seções) representados na América do Norte, com base em análises morfológicas detalhadas (SHEATH et al., 1992, 1993; SHEATH et al., 1994a; SHEATH et al., 1994b, c; SHEATH & VIS, 1995; VIS et al., 1995; VIS & SHEATH, 1996; VIS et al., 1996a, b); Entwisle (1992; 1993) e Entwisle & Foard (1997; 1999a; b; 2007) conduziram análises semelhantes para os grupos representados na Austrália e Nova Zelândia. Necchi (1990b) reconheceu três da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* para o Brasil (*B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*) com base em características morfológicas (número de células dos fascículos primários e abundância dos fascículos secundários). No entanto, em estudo posterior baseado em dados moleculares, Agostinho & Necchi (2014) demonstraram que essas espécies não apresentam divergência genética e correspondem a uma única espécie, identificada como *B. viride-brasiliense*.

1.2. Conceitos de espécie e delimitação de espécie

O conceito morfológico de espécie baseia-se nas discontinuidades na variação morfológica para distinguir espécies. Por razões práticas, este conceito tem dominado a sistemática de algas por muitas décadas (JOHN & MAGGS, 1997; MANN, 1999). Embora as

descontinuidades na variação morfológica correspondam, em muitos casos, aos limites das espécies, a evolução morfológica convergente, a estase morfológica, a plasticidade fenotípica e o polimorfismo são fenômenos comuns que limitam a correspondência entre como uma espécie seria definida com base no conceito morfológico versus os conceitos evolutivo ou biológico espécie (VERBRUGGEN et al., 2009). Sabe-se que muitas espécies de algas exibem uma substancial variação morfológica intraespecífica, quer como resultado de polimorfismo controlado geneticamente ou de plasticidade ambientalmente induzida (LURLING, 2003; LOGARES et al., 2007). Ignorar esta variação morfológica intraespecífica pode resultar em uma superestimação da diversidade de espécies (TRAINOR, 1998; MACAYA & ZUCCARELLO, 2010). Por outro lado, as diferenças morfológicas entre duas espécies muitas vezes só surgem após decorrer tempo suficiente desde a divergência da linhagem e, portanto, as espécies recentemente divergentes são susceptíveis a permanecerem não detectadas (LELIAERT et al., 2014).

Os dados filogenéticos moleculares revelaram numerosos casos de espécies (estritamente relacionadas) que são morfológicamente indistinguíveis (ZUCCARELLO & WEST, 2003; DE CLERCK et al., 2005; FRASER et al., 2009; FUCIKOVA et al., 2011; GUTNER-HOCH & FINE, 2011; DEGERLUND et al., 2012; KUCERA & SAUNDERS, 2012; MONIZ et al., 2012; SOEHNER et al., 2012; PAYO et al., 2013; SOUFFREAU et al., 2013). Além disso, antigas linhagens crípticas foram detectadas em grupos de algas que são morfológicamente depauperados, apresentam seleção estabilizadora, ou estão sujeitos a evolução convergente em direção a morfologias reduzidas, tais como planctônicos unicelulares (DE VARGAS et al., 1999; SAEZ et al., 2003; ŠLAPETA et al., 2006; KRIENITZ & BOCK, 2012; ŠKALOUD & RINDI, 2013) e macroalgas marinhas (VERBRUGGEN et al., 2009; SUTHERLAND et al., 2011).

1.3. Hipóteses

Com base nas informações atualmente disponíveis (morfológicas e moleculares) de representantes da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* em âmbito mundial, as seguintes hipóteses gerais serão testadas:

1. A seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* constitui um grupo monofilético dentro da ordem Batrachospermales. Se a hipótese for corroborada, o reconhecimento desse grupo associado ao fato de *Batrachospermum* ser parafilético resultará na elevação dessa seção para o nível gênero;

2. Espécies novas, particularmente espécies crípticas e com padrão biogeográfico bem definido, deverão ser encontradas e reconhecidas como espécies distintas dentro deste grupo.

1.4. Objetivos gerais

- 1) Inferir as relações filogenéticas das espécies dentro da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* e com as de outras seções do gênero, bem como definir os limites de variação intraespecíficos com base na análise das sequências do gene *rbcL* e das regiões de “barcode” e “mini-barcode” do gene *cox1*.
- 2) Avaliar quais caracteres morfológicos tem valor diagnóstico, inclusive à luz dos novos dados moleculares, para caracterização das espécies da seção *Virescentia* e circunscrever as espécies reconhecidas na seção em âmbito mundial.

2. Referências

- AGOSTINHO, D. C.; NECCHI, O. J. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. **Phycologia**, v. 53, n. 6, p. 561-570, 2014.
- ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.
- BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. **J. Phycol.**, v. 31, p. 489–98, 1995.
- BHATTACHARYA, D.; YOON, H. S.; HACKETT, J. D. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. **BioEssays**, v. 26, n. 1, p. 50-60, Jan 2004.
- BLANCK, H.; WALLIN, G.; WÄNGBERG, S. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 8, n. 4, p. 339-351, 1984.
- 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.
- DE CLERCK, O.; GAVIO, B.; FREDERICQ, S.; BARBARA, I.; 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, p. 391-410, 2005.
- DE VARGAS, C.; NORRIS, R.; ZANINETTI, L.; GIBB, S. W.; PAWLOWSKI, J. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 2864-2868, 1999.
- DEGERLUND, M.; HUSEBY, S.; ZINGONE, A.; SARNO, D.; LANDFALD, B. Functional diversity in cryptic species of *Chaetoceros socialis* Lauder (Bacillariophyceae). **J. Plankton Res.**, v. 34, p. 416-431, 2012.
- DELWICHE, C. F.; KUHSEL, M.; PALMER, J. D. Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. **Mol. Phylogenet.**, v. 4:1, p. 10–28, 1995.
- 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.; JOHNSTON, E. T.; LAM, D. W.; STEWART, S. A.; VIS, M. L. Nocturama gen. nov., Nothocladus s. lat. and other taxonomic novelties resulting from the further resolution of paraphyly in Australasian members of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta). **J Phycol**, v. 52, n. 3, p. 384-96, Jun 2016.

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.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B. D.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2010. ISBN 9788536321561. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=XgEluMvQDZIC>>.

FRASER, C. I.; HAY, C. H.; SPENCER, H. G.; WATERS, J. M. Genetic and morphological analyses of the southern bull kelp *Durvillaea antarctica* (Phaeophyceae: Durvillaeales) in New Zealand reveal cryptic species. **J. Phycol.**, v. 45, p. 436-443, 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.

FUCIKOVA, K.; RADA, J. C.; LUKESOVA, A.; LEWIS, L. A. Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella Hanagata* (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four barcode markers. **Nova Hedwigia Beih**, v. 93, p. 29-46, 2011.

GABRIELSON, P. W.; GARBARY, D. J.; SCAGEL, R. F. The nature of the ancestral red alga: inferences from a cladistic analysis. **Biosystems**, v. 18, p. 335-46, 1985.

GABRIELSON, P. W.; GARBARY, D. J.; SOMMERFELD, M. R.; TOWNSEND, R. A.; TYLER, P. L. **Phylum Rhodophyta**. *In: Handbook of Protoctista: The Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic Microorganisms and Their Descendants Exclusive of Animals, Plants and Fungi*. Jones and Bartlett Pub., Boston, 1990.

GARBARY, D. J.; GABRIELSON, P. W. **Taxonomy and evolution**. *In Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, New York, 1990.

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

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. <http://www.algaebase.org>, 2016. Acesso em: 28 December.

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

GUTNER-HOCH, E.; FINE, M. Genotypic diversity and distribution of *Ostreobium quekettii* within scleractinian corals. **Coral Reefs**, v. 30, p. 643-650, 2011.

HORTA, P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. **Hoehnea**, v. 28, p. 243-265, 2001.

JOHN, D. M.; MAGGS, C. A. Species problems in eukaryotic algae: a modern perspective. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A., et al (Ed.). **Species: The Units of Biodiversity** London: Chapman & Hall, 1997. p.83-107.

KAPRAUN, D. F.; BRALY, K. S.; FRESHWATER, D. W. Nuclear DNA content variation in the freshwater red algal orders Batrachospermales and Thoreaales. **Phycologia**, v. 46, p. 54-62, 2007.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia** v. 698, p. 295-326, 2012.

KUCERA, H.; SAUNDERS, G. W. A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity. **J. Phycol.**, v. 48, p. 869-882, 2012.

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

LE GALL, L.; SAUNDERS, G. W. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. **Mol Phylogenet Evol**, v. 43, n. 3, p. 1118-30, Jun 2007.

LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; VANORMELINGEN, P.; STEEN, F.; LOPEZBAUTISTA, J.; ZUCCARELLO, G. C.; DE CLERCK, O. DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v. 49, p. 179-196, 2014.

LOGARES, R.; RENGEFORS, K.; KREMP, A.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; BOLTOVSKOY, A.; TENGS, T.; SHURTLEFF, A.; KLAVENESS, D. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: A case of rapid adaptive evolution? **Microb. Ecol.**, v. 53, p. 549-561, 2007.

LOPEZ-BAUTISTA, J. M. **Red algal genomics: A synopsis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**. Springer; 1st Edition, 2010. 526.

LURLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Ann. Limnol.**, v. 39, p. 85-101, 2003.

MACAYA, E. C.; ZUCCARELLO, G. C. DNA barcoding and genetic divergence in the giant kelp macrocystis (Laminariales). **J. Phycol.**, v. 46, p. 736-742, 2010.

MANN, D. G. The species concept in diatoms. **Phycologia** v. 38, p. 437-495, 1999.

MCFADDEN, G. I. Plastids and protein targeting. **J Eukaryot Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 339-46, Jul-Aug 1999.

MONIZ, M. B. J.; RINDI, F.; NOVIS, P. M.; BROADY, P. A.; GUIRY, M. D. Molecular phylogeny of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity. **J. Phycol.**, v. 48, p. 940-955, 2012.

MULLER, K. M.; OLIVEIRA, M. C.; SHEATH, R. G.; BHATTACHARYA, D. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. **Am J Bot**, v. 88, n. 8, p. 1390-400, Aug 2001.

NECCHI, O., JR.; ZUCCHI, M. R. Systematics and distribution of freshwater *Audouinella* (Acrochaetiaceae, Rhodophyta) in Brazil. **Eur. J. Phycol.**, v. 30, p. 209-18, 1995.

NECCHI, O. J. Rhodophyta de água doce do estado de São Paulo: levantamento taxonômico. **Bolm. Botanica, Univ. S. Paulo.**, v. 11, p. 11-69, 1989.

NECCHI, O. J. **Revision of the genus *Batrachospermum* Roth (Rhodophyta, Batrachospermales) in Brazil.** Berlin: J. Cramer, 1990a. 201 ISBN 978-3-443-60011-2.

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.**, v. 97, p. 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.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. **Phycologia** p. 35: 308-326, 1996.

OLIVEIRA, M. C.; BHATTACHARYA, D. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. **Am J Bot**, v. 87, n. 4, p. 482-92, Apr 2000.

PAYO, D. A.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; D'HONDT, S.; CALUMPONG, H. P.; DE CLERCK, O. Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. **Proc. R. Soc. B**, v. 280, 2013.

PUESCHEL, C. M.; COLE, K. M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. **Am. J. Bot.**, v. 69, p. 703-20, 1982.

PUESCHEL, C. M.; SAUNDERS, G. W.; WEST, J. A. Affinities of the freshwater red alga *Audouinella macrospora* (Florideophyceae, Rhodophyta) and related forms based on ssu rna gene sequence analysis and pit plug ultrastructure. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 2, p. 433-440, 2000.

RAGAN, M. A.; BIRD, C. J.; RICE, E. L.; GUTELL, R. R.; MURPHY, C. A.; SINGH, R. K. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 7276–80, 1994.

RODRIGUEZ-EZPELETA, N.; BRINKMANN, H.; BUREY, S. C.; ROURE, B.; BURGER, G.; LOFFELHARDT, W.; BOHNERT, H. J.; PHILIPPE, H.; LANG, B. F. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. **Curr Biol**, v. 15, n. 14, p. 1325-30, Jul 26 2005.

ROSSIGNOLO, N. L.; NECCHI, O. J. Revision of section *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) with emphasis on specimens from Brazil. **Phycologia**, v. 55, n. 4, p. 337-346, 2016.

SAEZ, A. G. P., I.; GEISEN, M.; QUINN, P.; YOUNG, J. R.; MEDLIN, L. K. Pseudocryptic speciation in coccolithophores. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, p. 7163-7168, 2003.

SALOMAKI, E. D.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; VIS, M. L. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. **J Phycol**, v. 50, n. 3, p. 526-42, Jun 2014.

SAUNDERS, G. W.; HOMMERSAND, M. H. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. **Am J Bot**, v. 91, n. 10, p. 1494-507, Oct 2004.

SHEATH, R. G. **The biology of freshwater red algae.** In *Progress in Phycological Research*. Biopress, Bristol, 1984.

SHEATH, R. G. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. In: WEHR, J. D. e SHEATH, R. G. (Ed.). **Red Algae**: Elsevier Science, 2003. p.197–224. ISBN 9780127415505.

SHEATH, R. G.; HAMBROOK, J. A. 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. 3. Section *Setacea*. **J. Phycol.**, v. 29, p. 719-25, 1993.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 4. Section *Virescentia*. **J. Phycol.**, v. 30, p. 108-17, 1994a.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 5. Section *Aristata*. **Phycologia**, v. 33, p. 404-14, 1994b.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 6. Section *Turfosa*. **J. Phycol.**, v. 30, p. 872-84, 1994c.

SIRODOT, S. **Les Batrachospermes, Organisation, fonctions, Développement, Classifications**. Librairie de Académie de Médecine, Paris, 1884.

ŠKALOUD, P.; RINDI, F. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: A case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 60, p. 350-362, 2013.

ŠLAPETA, J.; LOPEZ-GARCIA, P.; MOREIRA, D. Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, p. 23-29, 2006.

SOEHNER, S.; ZINSSMEISTER, C.; KIRSCH, M.; GOTTSCHLING, M. Who am I - and if so, how many? Species diversity of calcareous dinophytes (Thoracosphaeraceae, Peridinales) in the Mediterranean Sea. **Org. Divers. Evol.**, v. 12, p. 339-348, 2012.

SOUFFREAU, C.; VANORMELINGEN, P.; VAN DE VIJVER, B.; ISHEVA, T.; VERLEYEN, E.; SABBE, K.; VYVERMAN, W. Molecular evidence for distinct Antarctic lineages in the cosmopolitan terrestrial diatoms *Pinnularia borealis* and *Hantzschia amphioxys*. **Protist** v. 164, p. 101-115, 2013.

SUTHERLAND, J. E.; LINDSTROM, S. C.; NELSON, W. A.; BRODIE, J.; LYNCH, M. D. J.; HWANG, M. S.; CHOI, H.-G.; MIYATA, M.; KIKUCHI, N.; OLIVEIRA, M. C.; FARR, T.; NEEFUS, C.; MOLS-MORTENSEN, A.; MILSTEIN, D.; MÜLLER, K. M. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 47, p. 1131-1151, 2011.

TRAINOR, F. R. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae) phenotypic plasticity. **Nova Hedwigia Beih.**, v. 117, p. 1-367, 1998.

VERBRUGGEN, H.; VLAEMINCK, C.; SAUVAGE, T.; SHERWOOD, A. R.; LELIAERT, F.; DE CLERCK, O. Phylogenetic analysis of *Pseudochlorodesmis* strains reveals cryptic

diversity above the family level in the siphonous green algae (Bryopsidales, Chlorophyta). **J. Phycol.**, v. 45, p. 726-731, 2009.

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.; 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.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8a. Section *Batrachospermum*: *Batrachospermum gelatinosum*. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996a.

VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 8b. Section *Batrachospermum*: previously described species. **Eur. J. Phycol.**, v. 31, p. 31-40, 1996b.

VIS, M. L.; SHEATH, R. G.; ENTWISLE, T. J. Morphometric analysis of *Batrachospermum* section *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) type specimens. **Eur. J. Phycol.**, v. 30, p. 35-55, 1995.

YOON, H. S.; HACKETT, J. D.; PINTO, G.; BHATTACHARYA, D. The single, ancient origin of chromist plastids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15507-12, Nov 26 2002.

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

ZUCCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: Molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. **J. Phycol.**, v. 39, p. 948-959, 2003.

0

ZUCCHI, M. R.; NECCHI, O. J. Blue-greenish acrochaetioid algae in freshwater habitats are 'Chantransia' stages of Batrachospermales sensu lato (Rhodophyta). **Cryptogamie, Algologie**, v. 24, p. 117-131, 2003.

CAPÍTULO 1:

Sistemática molecular da seção *Virescentia* do
gênero *Batrachospermum* (Rhodophyta,
Batrachospermales)

1. Introdução

1.1. Análises moleculares em Batrachospermales

Vis et al. (1998) efetuaram a primeira tentativa de análise filogenética molecular de membros da ordem Batrachospermales com base na análise de sequências de dois marcadores: gene plastidial que codifica a subunidade grande da RUBISCO (*rbcL*) e gene nuclear que codifica a subunidade pequena do ribossomo (SSU rDNA). A representação de espécies de cada grupo dentro do gênero foi relativamente pequena e somente investigações mais recentes conduzidas por Morgan L. Vis e colaboradores (VIS & ENTWISLE, 2000; VIS et al., 2012) têm incluído maior número de espécies do grupo em análises filogenéticas moleculares, e referem-se especialmente ao gene *rbcL*. Hanyuda et al. (2004) realizaram análises biogeográfica e taxonômica de *B. helminthosum* no Japão, com base em sequências de *rbcL* de 27 populações coletadas em várias localidades e concluíram que houve uma recente dispersão dessa alga nas ilhas daquele país.

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

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

Estudos combinando dados moleculares e morfológicos enfocaram apenas as relações filogenéticas entre os grupos maiores de Batrachospermales (gêneros ou seções) (FRESHWATER et al., 1994; VIS et al., 1998; VIS et al., 2005). Abordagens visando avaliar o número de espécies foram iniciadas recentemente e são, ainda, escassas. Nesse aspecto, até o presente, foi publicado apenas o tratamento monográfico do gênero *Kumanoa* (NECCHI & VIS, 2012; VIS et al., 2012). Os resultados encontrados para *Kumanoa*, bem como dados preliminares para outros grupos em fase inicial de estudo (gênero *Sirodotia*, LAM et al., 2012; e seções *Turfosa* e *Virescentia* de *Batrachospermum*) têm evidenciado tendências muito interessantes: a diversidade genética no nível específico tem sido muito maior do que a inicialmente prevista, isto é, um número consideravelmente maior de espécies tem sido encontrado em relação aos estudos anteriores, bem como ocorrência de espécies crípticas. Essas últimas têm sido reconhecidas com alto nível de divergência genética, porém sem a correspondente distinção morfológica, mas em alguns casos, apenas geográfica, como a ocorrência de linhagens distintas geneticamente, mas não morfológicamente, entre continentes (LAM et al., 2012). Essa tendência certamente levará à proposição futura de espécies com base exclusivamente em dados genéticos e/ou geográficos. Outra tendência que parece inevitável é a separação do gênero *Batrachospermum* em vários gêneros distintos, conforme ocorreu com os gêneros *Kumanoa* (ENTWISLE et al., 2009), *Sheathia* (antiga seção *Helminthoidea*) (SALOMAKI et al., 2014) e *Setacea* (seção recentemente elevada para nível de gênero) (ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016). Em contrapartida, Entwisle

et al. (2016) adotaram posição frontalmente oposta, aceitando um gênero amplo *Nothocladus*, incluindo a seção *Setacea* e vários grupos de espécies da Australásia.

1.2. DNA “barcoding”

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

DNA “barcoding” é um método de identificação e reconhecimento de espécies utilizando sequências de DNA (HEBERT et al., 2003; HEBERT et al., 2004a; HEBERT et al., 2004b). A técnica de DNA “barcoding” é baseada na amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de um segmento de DNA relativamente curto (~400-700 pares de base – pb) que pode ser inteiramente sequenciado com os mesmos dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) usados na PCR. O sistema de DNA “barcoding” é prático e uniforme para identificação de espécies; além disso, os dados gerados possuem ampla aplicação, com grande utilidade em levantamentos de biodiversidade e em estudos de conservação (COSTION et al., 2011; PAZ & CRAWFORD, 2012). O método de DNA “barcoding” pode ser aplicado mesmo quando as técnicas tradicionais não são viáveis, como organismos em estado juvenil, espécies com alta plasticidade fenotípica ou fragmentos de espécimes (FLOYD et al., 2002; NEIGEL et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009; EATON et al., 2010; LUMBSCH & LEAVITT, 2011). No caso das algas vermelhas, a presença de estruturas reprodutivas é

muitas vezes necessária para a identificação, e na ausência dessas, a determinação da espécie e até mesmo do gênero é impossibilitada (SAUNDERS, 2005). O DNA “barcoding” permite ainda a detecção de espécies crípticas e fornece dados que ajudam a entender a diversidade biológica e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação (HEBERT et al., 2004a; SMITH et al., 2006; SMITH et al., 2007; BURNS et al., 2008; SMITH et al., 2008; HUBERT et al., 2012).

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

O genoma mitocondrial é caracterizado por apresentar ampla distribuição entre os eucariotos, ser de herança materna (haploide), e por permitir projetar “primers” universais em porções restritas do gene. Estudos envolvendo DNA “barcoding” têm demonstrado grande potencial para sistemática em níveis específicos de algas vermelhas (SAUNDERS, 2005; ROBBA et al., 2006; SAUNDERS & MCDEVITT, 2012) e recebido grande atenção recentemente. A região de “barcode” do gene *cox1* apresenta 664 pb (pares de bases), poucas inserções e deleções, porém com uma variabilidade suficiente para distinguir espécies (apresenta uma taxa relativamente elevada de divergência) (HEBERT et al., 2003; SAUNDERS, 2005). De acordo com os estudos feitos por Saunders (2005) e Robba et al. (2006), a região de “barcode” do gene *cox1* (codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) é capaz de delimitar espécies de algas vermelhas, podendo ser também utilizada para identificar espécies crípticas ou eventos recentes de especiação. Esta região de “barcode” tem sido aplicada como marcador clássico para estudos desse tipo, com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores e termociclos específicos para diferentes grupos (SAUNDERS, 2005; SAUNDERS &

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

1.3. “Mini-barcode”

O “mini-barcode” é um fragmento dentro da região de “barcode” do gene *cox1* que apresenta, neste estudo, 246 pb. DNA “barcoding” busca desenvolver uma abrangente biblioteca de sequências espécie-específica para os eucariotos (MARSHALL, 2005). Os 664 pb da citocromo *c* oxidase 1 (CO1, *cox1*) são facilmente sequenciados e proporcionam especificidade a nível de espécie acima de 97%. No entanto, o DNA “barcoding” convencional encontra dois problemas. Primeiro, a degradação do DNA em espécimes para arquivamento e materiais biológicos processados (por exemplo alimentos) frequentemente impedem a recuperação de fragmentos de PCR maiores que 200 pb, impedindo a recuperação do “barcode” (GOLDSTEIN & DESALLE, 2003; HAJIBABAEI et al., 2006; WANDELER et al., 2007). Segundo, abordagens atuais não podem ser usadas para uma análise abrangente de amostras ambientais, pois uma alta variabilidade nas sequências necessita do uso de distintos “primers” para cada grande grupo taxonômico.

É geralmente difícil recuperar, rapidamente e a baixos custos, sequências de “barcode” de espécimes de museus com mais de uma década, sendo que o DNA está degradado (WHITFIELD, 1999; HAJIBABAEI et al., 2005). Como resultado, a construção da biblioteca de “barcode” atualmente se concentra na análise de espécimes

coletados recentemente ou em amostras que foram protegidas da degradação por congelamento, álcool ou outro método de preservação de DNA. No entanto, acabará por ser necessário comparar sequências de amostras frescas com sequências de espécimes antigos de museus. Por exemplo, tal comparação é crítica quando o “barcoding” revela várias espécies crípticas dentro do que era visto como uma única espécie, não sendo morfologicamente evidente qual delas combina com o holótipo (HEBERT et al., 2004a; JANZEN et al., 2005). Igualmente, a validação final para um registro de “barcode” moderno deve envolver sua comparação com o registro de “barcode” do holótipo para aquela espécie. Além da necessidade de tais comparações, é evidente que o “barcoding” de espécimes antigos de museus irá fornecer uma maneira custo-efetiva de construir bibliotecas de “barcode” com ampla cobertura geográfica de táxons individuais.

Enquanto a recuperação do “barcode” completo de sequências de espécimes antigos atualmente requer protocolos caros e demorados, pequenas sequências podem ser regularmente obtidas de espécies centenárias de museus utilizando protocolos de rotina (GOLDSTEIN & DESALLE, 2003).

1.4. Objetivos

Inferir as relações filogenéticas das espécies dentro da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* e com as de outras seções do gênero, bem como definir os limites de variação intraespecíficos com base na análise das sequências do gene *rbcL* e das regiões de “barcode” e “mini-barcode” do gene *cox1*.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas 13 amostras de *B. viride-brasiliense* (Tabela 1), provenientes da região sul e sudeste do Brasil e incorporados ao Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica (SJRP) (THIERS, 2016). Também foram utilizadas três exsicatas de *B. viride-brasiliense* (provenientes do Herbário do Instituto de Botânica – IB e do Herbário SPF da USP; códigos SP176771, SP177080 e SPF28546) e uma exsicata de *Batrachospermum* sp. 2, proveniente do Japão (Herbário do Laboratório de Ficologia, Kobe University).

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

Espécie	Código	Local, coletor e data	Acesso GenBank	
			<i>cox1</i>	<i>rbcL</i>
1 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	CJ	SP: Campos do Jordão, Ducha da Prata, 22°44'17''S, 45°34'10''W; M. Paiano, 15.xii.2009	KM259993	KM078048
2 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	Prb	SP: Paraibuna, Pousada Alto da Serra, Rio Negro, 23°33'48''W; 45°27'31''S; O. Necchi Jr., 03.ii.2006	KM259994	KM097031
3 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	Rpe	PR: Guarapuava, Rio das Pedras, 25°15'00''W; 51°20'00''S; R. A. Krupek, 26.x.2008	KM259996	KM097033
4 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	Mar	PR: Guarapuava, Rio Lageado, Bacia do Rio Marrecas, 25°12'57,2''W; 51°21'18,6''S; R. A. Krupek, 26.iii.2007	KM259995	KM097032
5 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	ES8	ES: Domingos Martins, Pedra Azul, Rio Tucú (Braço Norte) Rod. 165, Km 137, 20°19'15,7''W; 0,41°02'41,3''S; O. Necchi Jr., 19.vii.2006	KM259998	KM097035
6 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	FLI7	PR: Teixeira Soares, Floresta Nacional de Irati, próximo do viveiro; 25°24'16''S, 50°35'28''W, altitude 727m; O. Necchi Jr. & C.C.Z. Branco, 21.vii.2005	KM259999	KM097036
7 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	FLI9	PR: Teixeira Soares, Floresta Nacional de Irati, 400 m estr. principal, linha da Copel 1; 25°23'07''S, 50°35'27''W, altitude 806m; O. Necchi Jr. & C.C.Z. Branco, 19.vii.2005	KM260000	KM097037
8 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	SD2	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias, rio Jacutinga; 26°28'08''S, 52°34'00''W, altitude 698m; C.C.Z. Branco, 14.viii.2007	KM260001	KM097038
9 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	SD4	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias; 26°27'21''S, 52°33'41''W, altitude 687m; C.C.Z. Branco, 14.viii.2007	KM259997	KM097034

Tabela 1 (continuação). Relação das amostras de *Batrachospermum viride-brasiliense*, seção *Virescentia* utilizadas neste estudo.

Espécie	Código	Local, coletor e data	Acesso GenBank	
			<i>cox1</i>	<i>rbcL</i>
10 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	SD8	SC: São Domingos, Parque Estadual das Araucárias; 26°28'48''S, 52°34'32''W, altitude 700m; C.C.Z. Branco, 15.viii.2007	KM260002	KM097039
11 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	Brt	SP: Brotas, Parque dos Saltos; 22°17'30'' S, 48°07'51W, D.C. Agostinho et al., 09.x.2012	KM260003	KM097040
12 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	PAS2	RS: Cambará do Sul, Parque Nacional de Aparados da Serra, Arroio Camisas, 29°10'44,5''W; 50°08'13,2''S, altitude 939 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009	KM260004	KM097041
13 – <i>Batrachospermum viride-brasiliense</i>	PAS4	RS: Cambará do Sul, Parque Aparados da Serra, Arroio Perdizes; 29°09'29,4''W; 50°04'09,6''S, altitude 920 m; O. Necchi Jr., 10.vi.2009	KM260005	KM097042

2.1. Preservação

As amostras destinadas às análises moleculares foram inicialmente secas com papel toalha para redução da umidade. Em seguida a secagem foi feita em sílica-gel, com troca por sílica seca após 24 horas, ou, em alguns casos, preservadas em etanol 100%. Após o acondicionamento em frascos devidamente marcados, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C.

2.2. Análises Moleculares

2.2.1. Extração de DNA

Cada amostra foi macerada com o uso de homogeneizador de tecidos marca Bertin (Bertin Technologies, Bordeaux, França), mod. Precellys®24 com duas microesferas de aço por tubo. As homogeneizações foram conduzidas em dois ciclos a 5.000 rpm durante 20s cada e intervalo entre os ciclos de 20s. O material obtido foi submetido à extração com uso dos kits de extração de DNA “Dneasy plant mini kit®” (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), “Nucleo Spin plant II mini kit” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), “Extract-N-AMP® Plant”, “Relia Prep®g DNA Tissue” (Promega, Madison, EUA) e “MO BIO” (Carlsbad, California), conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. Após uso para as aplicações previstas, 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.

2.2.2. Amplificação de DNA

As amplificações de segmentos específicos de DNA foram realizadas através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). As reações de PCR para os marcadores moleculares *rbcL*, *cox1* e *cox1* “mini-barcode” foram conduzidas utilizando kits de PCR, todos para volume total de 25 µl e concentração de 40 ng/µL: “puReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE HealthCare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), “TopTaq™ Master Mix” (Qiagen, Hilden, Alemanha), “GoTaq® Colorless Master Mix” (Promega, Madison, EUA), Platinum™ DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e “ThermoScientific” (Thermo Fisher Scientific, California, EUA). As misturas fornecidas nos kits contêm: dNTP (desoxinucleosídeos trifosfato), tampão de PCR e Taq polimerase. A essas misturas foram adicionados: água ultra-pura (bi-distilada e deionizada), oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) 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, verificados pela intensidade e clareza das bandas. 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 para as quatro amostras secas de herbário. Foram utilizados “primers” específicos para amplificar a região de “mini-barcode” do gene *cox1*.

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

- ***cox1*** (SAUNDERS, 2005): GazF1 (5’ TCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3’) e GazR1 (5’ ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA – 3’) para amplificar um fragmento de 664 pb.

- **cox1 “mini-barcode”** (SAUNDERS & MCDEVITT, 2012): COIm174 (5'-GAGCTAACACAACCAGGTAAC – 3'') e RhoR (5'' - AGGAAAAGCCATATC WGGAC – 3'') para amplificar fragmentos de 174pb; COIm264 (5'' - CAAAYCAYAARGATATYGGTAC – 3'') e RhoR, para amplificar fragmentos de 246 pb.

- **rbcL** (VIS et al., 1998): F160 (59-CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC-39) e *rbcL* R (59-ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC-39) para amplificar um fragmento de 1282 pb.

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

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

- **cox1 “mini-barcode”** conforme Saunders & Mcdevit (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. (1998) – 95°C por 2 min (desnaturação inicial); 30 a 35 ciclos: 93°C por 1 min (desnaturação); 50°C por 1 min (anelamento dos “*primers*”); 72°C por 4 min (extensão); 72°C por 6 min (extensão final); 4°C (armazenamento).

2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Os géis (0,7%) foram preparados com a diluição de 70 mg de agarose em 100 ml da solução-tampão TBE: tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os géis foram carregados com o produto amplificado e tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, EDTA 50 M, glicerol 30% e água destilada) na proporção de 4:1. As eletroforeses foram realizadas sob voltagem de 60 V, com tempo de 60 minutos para *rbcL* e 45 minutos para *cox1*. Utilizou-se marcador de tamanho “1 Kb DNA ladder” (Invitrogen, Gaithersburg, E.U.A.). A qualidade do DNA amplificado por PCR foi feita por estimativas visuais por comparação com o marcador. Os géis foram corados com “GelRed®” (Biotium, Hayward, E.U.A.) e observados em fotodocumentador “Mini Bis Pro” e software “Gel Capture®” (Micro Photonics, Allentown, E.U.A.). A qualidade e quantidade do DNA amplificado por PCR foi feita por estimativas visuais com base na intensidade e homogeneidade das bandas e por comparação com o marcador.

2.2.4. Purificação e quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com uso dos kits de purificação: “QIAquick™ PCR” (QiagenGmbH, Hilden, Alemanha) e “NucleoSpin™ Geland PCR Clean-up” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), conforme os protocolos dos fabricantes. Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados no fluorômetro “Qubit®” com o uso do kit “Quant-it® ds DNA BR” (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.) e/ou em espectrofotômetro “Libra Biochrom S60 Double Beam” (Biochrom,

Cambridge, Reino Unido), com acessório de medidas microvolumétricas “BioDropTM500” (Biochrom, Reino Unido).

2.2.5. Sequenciamento e alinhamento

As reações de sequenciamento foram feitas usando-se o kit “Cycle Sequencing, Big-Dye Terminator” (Applied Biosystems, Foster City, E.U.A.) e os mesmos “primers” de PCR. 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”. O sequenciamento dos marcadores moleculares, a partir de produto de PCR purificado e quantificado, foi realizado em sequenciador automático “ABI PRISM 3130xl” (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), utilizando o kit “Big Dye Terminator”, versão 3.0 (Applied Biosystems). Os marcadores moleculares utilizados neste estudo (*rbcL*, *cox1* e “42ini-barcode”) foram sequenciados em ambas as direções 3’ e 5’.

As sequências obtidas foram carregadas diretamente no software “Geneious Pro”, versão 6.1.7 (DRUMMOND et al., 2012). A qualidade das sequências foi verificada através da checagem dos cromatogramas utilizando os recursos do próprio software. Em casos de sequências de baixa qualidade, foram feitas novas reações de sequenciamento para as amostras. Quando a baixa qualidade persistia, o sequenciamento foi feito com novos produtos de PCR. As sequências obtidas nas direções direta e reversa de cada amostra para cada marcador foram alinhadas individualmente para se obter a sequência completa (consenso), usando o programa “Geneious Pro”.

A estimativa da homologia entre as sequências consenso geradas com aquelas já identificadas e armazenadas no “GenBank” foram obtidas com uso da ferramenta

“search” (utilizando os critérios de busca do BLAST) do programa “Geneious” aplicando-se o critério arbitrário de 97,5% de identidade. Essa comparação permite o reconhecimento da sequência, a confirmação da sua autenticidade e o reconhecimento de possíveis contaminações. Os alinhamentos globais – sequências completas (consenso) de todas as amostras – foram construídos incluindo as sequências geradas e aquelas da seção disponíveis no “GenBank”. Finalmente, as sequências consenso de todas as amostras foram agrupadas em uma única matriz. Na construção das matrizes foram removidas as regiões correspondentes aos “primers” e de alinhamento ambíguo. A partir dessa matriz foram obtidos os níveis de identidade e divergência entre as sequências, com uso das ferramentas disponíveis no próprio programa “Geneious”.

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software “PAUP 4.0b8” (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2003) dentro do programa “Geneious Pro”. Para análise baseada nas sequências de *rbcL*, foi construída uma matriz de alinhamento com as sequências geradas neste estudo e as obtidas do “GenBank” (Tabela 3). As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (BA) (SCHNEIDER, 2003). Os grupos externos utilizados são de espécies das seções do gênero *Batrachospermum*, entre elas as seções *Acarposporophytum*, *Aristata*, *Batrachospermum*, *Macrospora*, *Setacea* e *Turfosa*, bem como outros gêneros de Batrachospermales (*Kumanoa*, *Sirodotia*, *Sheathia*, *Paralemanea* e *Tuomeya*). Para a análise das sequências de *rbcL*, foram apresentadas duas árvores que são essencialmente idênticas, apenas que numa delas foram mostradas exclusivamente as sequências da seção *Virescentia*, permitindo uma melhor visualização da topologia da árvore dentro desse grupo.

As análises de MV e BA com base nos dados de *rbcL* foram realizadas com uso do modelo de substituição nucleotídica GTR (“General Time Reversible”) + G + I

conforme determinado pelo software jModeltest (DARRIBA et al., 2012). Para análise de MV, as matrizes de dados foram exportadas para o formato PHYLIP e analisadas no software RAxML GUI (“graphical user interface”), versão 1.31 (STAMATAKIS, 2006; SILVESTRO & MICHALAK, 2012). Para BA, utilizou-se o software “MrBayes v.3.0b4” (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), onde foram definidas quatro cadeias de Markov e 5.000.000 de gerações, amostradas a cada 100 gerações, com probabilidades posteriores (PP) calculadas utilizando as 1.000 árvores finais.

Para a análise das sequências de *cox1* e “mini-barcode” também foram construídas matrizes de alinhamento com as sequências geradas neste estudo e as obtidas do “GenBank” (Tabela 2). Foram construídas árvores de distância (“neighbor joining”, SCHNEIDER, 2003) utilizando *B. gelatinosum* como grupo externo. Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados como valores de suporte de “bootstrap” com 1.000 réplicas de buscas heurísticas, gerando árvores de consenso com o critério de > 70% de semelhança nos ramos das árvores. Para definição do modelo mais apropriado de evolução do DNA (substituição nucleotídica) na construção das árvores filogenéticas utilizou-se o programa “Modeltest 3.0” (POSADA & CRANDALL, 1998). Todas as análises foram conduzidas com uso do pacote “Macintosh Genetic Data Environment” (Mac GDE, Steven Smith) versão 2.4.

As amostras que possuíam sequências tanto para *rbcL* quanto para *cox1* tiveram suas sequências concatenadas para realização de uma análise combinada. Para concatenar as sequências de cada amostra foi utilizado o programa “Geneious Pro”. As análises de MV e BA com base nos dados concatenados foram realizadas com uso do modelo de GTR+I+G conforme determinado pelo software jModeltest (DARRIBA et al., 2012). Para análise de MV, as matrizes de dados foram exportadas para o formato PHYLIP e analisadas no software RAxML GUI (“graphical user interface”), versão

1.31 (STAMATAKIS, 2006; SILVESTRO & MICHALAK, 2012). Para BA, utilizou-se o software “MrBayes v.3.0b4” (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), onde foram definidas quatro cadeias de Markov e 5.000.000 de gerações, amostradas a cada 100 gerações, com probabilidades posteriores (PP) calculadas utilizando as 1.000 árvores finais.

Tabela 2. Sequências da seção *Virescentia* dos genes *rbcL* e *cox1* obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises. *Haplótipos encontrados em mais de uma localidade.

Espécie	Localidade ¹	Acesso “GenBank”		Referência
		<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>	
<i>B. viride-brasiliense</i>	Brasil, SP, Maringá, Rio Pavão	FJ386460	---	Entwisle et al. (2009)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., MI, Spring Brook	AF244109	*EU636727 *EU073847	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., MI, Flemming Creek	AF244110	*EU636727 *EU636736 *EU073847	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Big Run	AF244111	EU636733 *EU073833 *EU073838 *EU073834 EU073837	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Browning Creek	AF244112	EU073848 *EU636732 EU636734	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., CT, Mill Brook	AF244113	EU073834 *EU636732	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., LA, Unnamed stream	AF244114	*EU636729 *EU073845	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., MA, Poquoy Brook	AF244115	EU073839 EU636735 *EU073834	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., NC, Cedar Fork	AF244116	*EU073836 *EU073838 *EU073840 EU073842 EU073843 EU073844	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., TN, Scarboro Creek	AF244117	EU073846 EU636728 EU636730 EU636731	Vis et al. (2001)

Tabela 2 (Continuação). Sequências da seção *Virescentia* dos genes *rbcL* e *cox1* obtidas do “GenBank” utilizadas nas análises.

Espécie	Localidade ¹	Acesso “GenBank”		Referência
		<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>	
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., IN, Otter Creek	AF244118	*EU073845 *EU636729	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., RI, Wood River Trib.	AF244119	*EU073833 *EU073836	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Five Mile Creek	AF244120	*EU073834 *EU073838 *EU636736	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., RI, Chipuxet River	AF029142	---	Vis et al. (1998)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Yellow Springs	AY198417	*EU073847 EU073848 *EU636727	Chiasson et al. (2003)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Big Run		EU073833 *EU073833	Vis et al. (2001)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., VA, Carvin Creek	---	EU073835 *EU073840 EU073843	Vis et al. (2008)
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Sunfish Creek	---	EU073841	Vis et al. (2008)
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Kagoshima, Oguchi	AB114642	---	Hanyuda et al. (2004)
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Kyoto, Tanba	AB114643	---	Hanyuda et al. (2004)
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Ehime, Komatsu	AB114644	---	Hanyuda et al. (2004)
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Iwate, Takizawa	AB114645	---	Hanyuda et al. (2004)
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Okinawa, Nago	AB114646	---	Hanyuda et al. (2004)
<i>B. helminthosum</i>	Noruega, Askerelva, county of Akershus		HQ412541	Rueness (2010)
<i>B. helminthosum</i>	Noruega, Askerelva, county of Akershus		HQ412542	Rueness (2010)
<i>B. helminthosum</i>	França, Le Boulet Prioult, próximo a Le Petit Boulet	KJ825955	---	Chiasson et al. (2014)
<i>B. vogesiacum</i>	França, Riacho em St. Jacques	KJ825954		Chiasson et al. (2014)

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

3. Resultados

3.1. Análises das sequências de *rbcL*

Foram utilizadas 35 sequências com 1282 pb cada, abrangendo cinco espécies da seção *Virescentia*. O alinhamento das sequências não apresentou “indels”, como esperado para o gene *rbcL*.

Para se examinar o monofiletismo da seção, foram utilizadas apenas sequências divergentes, sendo um total de 24 sequências para a seção *Virescentia* combinadas com 25 sequências que representam a diversidade conhecida para a ordem Batrachospermales. As análises para MV e BA produziram topologias semelhantes e, sendo assim, apenas a árvore MV foi apresentada (Figura 1). Foi observado alto suporte (1,0 de probabilidade posterior [PP] e 100% bootstrap [BS]) para o clado que representa a seção *Virescentia* (Figura 1). A seção *Macrospora* foi evidenciada como grupo com a maior proximidade filogenética.

As análises filogenéticas realizadas somente com as sequências da seção *Virescentia* e um grupo externo, geraram árvores com topologias semelhantes e só a árvore MV foi apresentada (Figura 2). A seção *Virescentia* apresentou cinco cladogramas principais, a maioria com altos suportes (Clados I, II, III, IV e V; Figura 2). Clado I foi composto por amostras exclusivamente da Região Neotropical (Brasil/América do Sul) e identificados como *B. viride-brasiliense*. Clado II foi composto por amostras exclusivamente da Região Paleártica (Japão/Ásia) e identificados como *Batrachospermum* sp.2. Clado III apresentou suporte moderado (PP = 0,70 e BS = 83%) e foi composto por duas amostras da Região Paleártica, sendo uma identificada como *B. helminthosum* (França/Europa) e outra denominada *Batrachospermum* sp.2

(Japão/Ásia). Clado IV foi composto por amostras exclusivamente da Região Neártica (E.U.A./América do Norte) e denominadas como *Batrachospermum* sp.1. Neste clado foram observadas duas linhagens com altos valores de suporte de PP e BS, sendo essas linhagens identificadas como “A” e “B”. Clado V foi composto por uma amostra da Região Paleártica (França/Europa) identificada como *B. vogesiacum* (Figura 2).

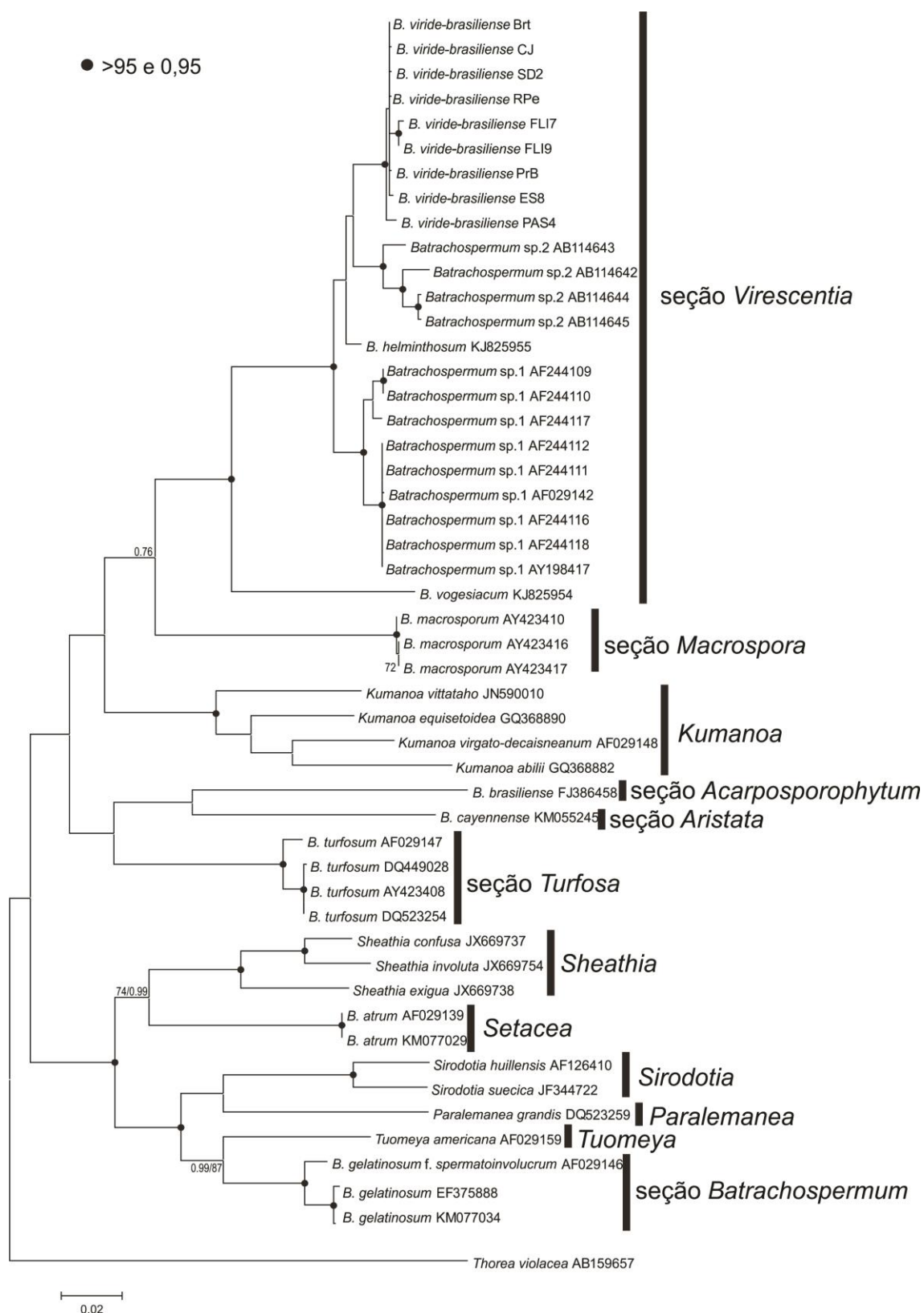


Figura 1: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) gerada com base nas sequências do gene *rbcL*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nos sem valores indicam $BS \leq 70$ ou $PP \leq 0,70$. Círculos cheios nos nós indicam valores de $BS > 95$ e $PP > 0,95$.

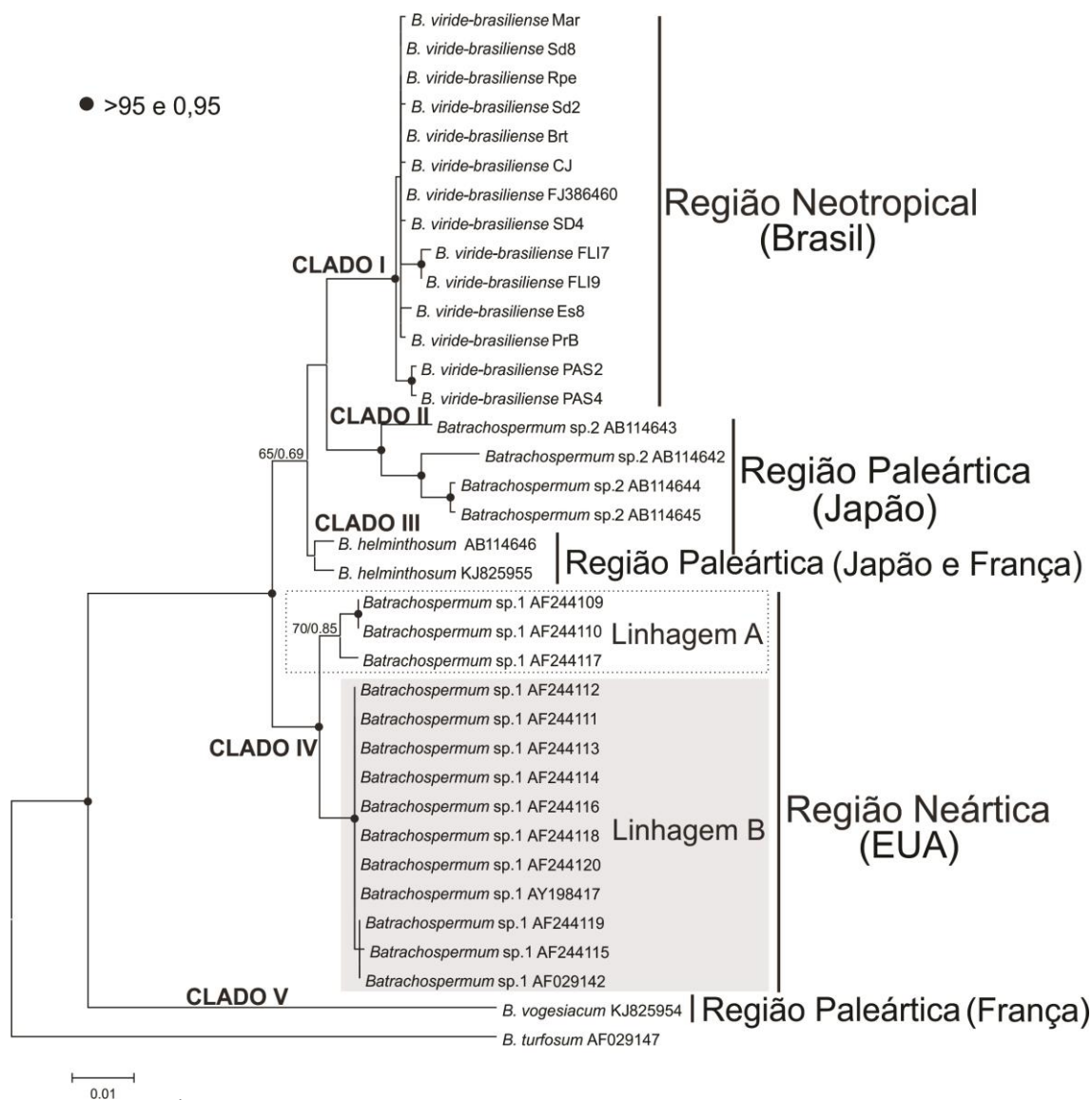


Figura 2: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) gerada com base nas sequências do gene *rbcL*, destacando a seção *Virescentia* com cinco clados principais contendo sequências do Brasil, E.U.A., Japão e França. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 65$ ou $PP \leq 0,65$. Círculos cheios nos nós indicam valores de $BS > 95$ e $PP > 0,95$.

Dentre as sequências de *rbcL*, pode-se observar que as amostras de *B. viride-brasiliense* do Clado I apresentaram uma variação de 0 a 12 pb (0–0,9%) (Tabela 3). *Batrachospermum* sp.2 apresentou quatro sequências dispostas no Clado II com uma variação de 2 a 29 pb (0,2–2,3%) (Tabela 3). Uma sequência previamente identificada como *Batrachospermum* sp.2 (AB114646) agrupou-se com *B. helminthosum* no Clado III e foi tratada como tal. A amostra *B. helminthosum* da França e a amostra de *B.*

helminthosum do Japão apresentaram pequena variação entre as sequências, com uma diferença de 8 pb (0,7%) (Tabela 3).

No clado IV, a linhagem A de *Batrachospermum* sp.1, representada por três sequências, apresentou variação de 8 a 19 pb (0,7–1,5%) (Figura 2). A linhagem B, com 11 sequências teve variação de 0 a 19 pb (0–1,5%), enquanto que a divergência entre as sequências das linhagens “A” e “B” foi maior, com valores de 15 a 30 pb (1,2–2,4%) (Tabela 3).

A variação interespecífica foi consideravelmente superior à intraespecífica. Comparando-se as sequências de *B. viride-brasiliense*, *Batrachospermum* sp.1, *Batrachospermum* sp.2, *B. helminthosum* e *B. vogesiacum* a variação interespecífica foi de 22 a 142 pb (1,8–11,1%), enquanto a variação intraespecífica foi de 0 a 29 pb (0–2,3%) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de nucleotídeos divergentes e porcentagem de divergência entre as sequências do gene *rbcl* de espécimes da seção *Virescentia* do Brasil, dos E.U.A., do Japão e da França.

	1	2	3	4	5	6
1) <i>B. viride-brasiliense</i>	0 a 12 pb (0–0,9%)					
2) <i>Batrachospermum</i> sp.1 Linhagem “A”	36 a 51 pb (2,9–4,0%)	8 a 19 pb (0,7–1,5%)				
3) <i>Batrachospermum</i> sp.1 Linhagem “B”	36 a 57 pb (2,9–4,5%)	15 a 30 pb (1,2–2,4%)	0 a 19 pb (0–1,5%)			
4) <i>Batrachospermum</i> sp.2	39 a 53 pb (3,1–4,2%)	47 a 62 pb (3,7–4,9%)	45 a 66 pb (3,6–5,2%)	2 a 29 pb (0,2–2,3%)		
5) <i>B. helminthosum</i>	22 a 30 pb (1,8–2,4%)	30 a 41 pb (2,4–3,2%)	29 a 45 pb (2,3–3,6%)	34 a 43 pb (2,7–3,4%)	0	
6) <i>B. vogesiacum</i>	120 a 125 pb (9,4–9,8%)	123 a 134 pb (9,6–10,5%)	128 a 142 pb (10,0–11,1%)	128 a 142 pb (10,0–11,1%)	117 a 121 pb (9,2–9,5%)	0

3.2. Análises das sequências de *cox1*

As análises da região de “barcode” do gene *cox1* foram essencialmente congruentes às do gene *rbcL*. A árvore de distância (“neighbor joining”) evidenciou três grupos bem suportados, com clara disjunção entre as sequências de *Batrachospermum* sp.1 da região Neártica (E.U.A./América do Norte), de *B. viride-brasiliense* da região Neotropical (Brasil/América do Sul) e de *B. helminthosum* da região Paleártica (Noruega/Europa) (Figura 3). As sequências de *B. viride-brasiliense* apresentaram uma variação de 0 a 15 pb (0–2,3%) (Tabela 4). A variação entre as sequências de *Batrachospermum* sp.1 foi de 0 a 46 pb (0–7,0%), porém pode-se observar duas linhagens, identificadas como “A” e “B”, assim como para o gene *rbcL*. A distribuição destas linhagens nas árvores apresentaram congruência entre a maioria das amostras para ambos os marcadores. A linhagem A apresentou variação alta, de 0 a 28 pb (0–4,3%), ao passo que a linhagem B apresentou variação menor, de 0 a 11 pb (0–1,7%). A divergência entre “A” e “B” foi superior à observada dentro de cada grupo, com uma variação de 36 a 46 pb (5,5–7,0%) (Tabela 4).

A divergência entre as sequências de cada um desses três clados foi alta e maior do que dentro dos grupos: Brasil x EUA de 57 a 69 pb (8,6–10,4%); Brasil x Noruega com 45 a 51 pb (6,8–7,7%); e EUA x Noruega com 48 a 55 (7,3–8,3%) (Tabela 4).

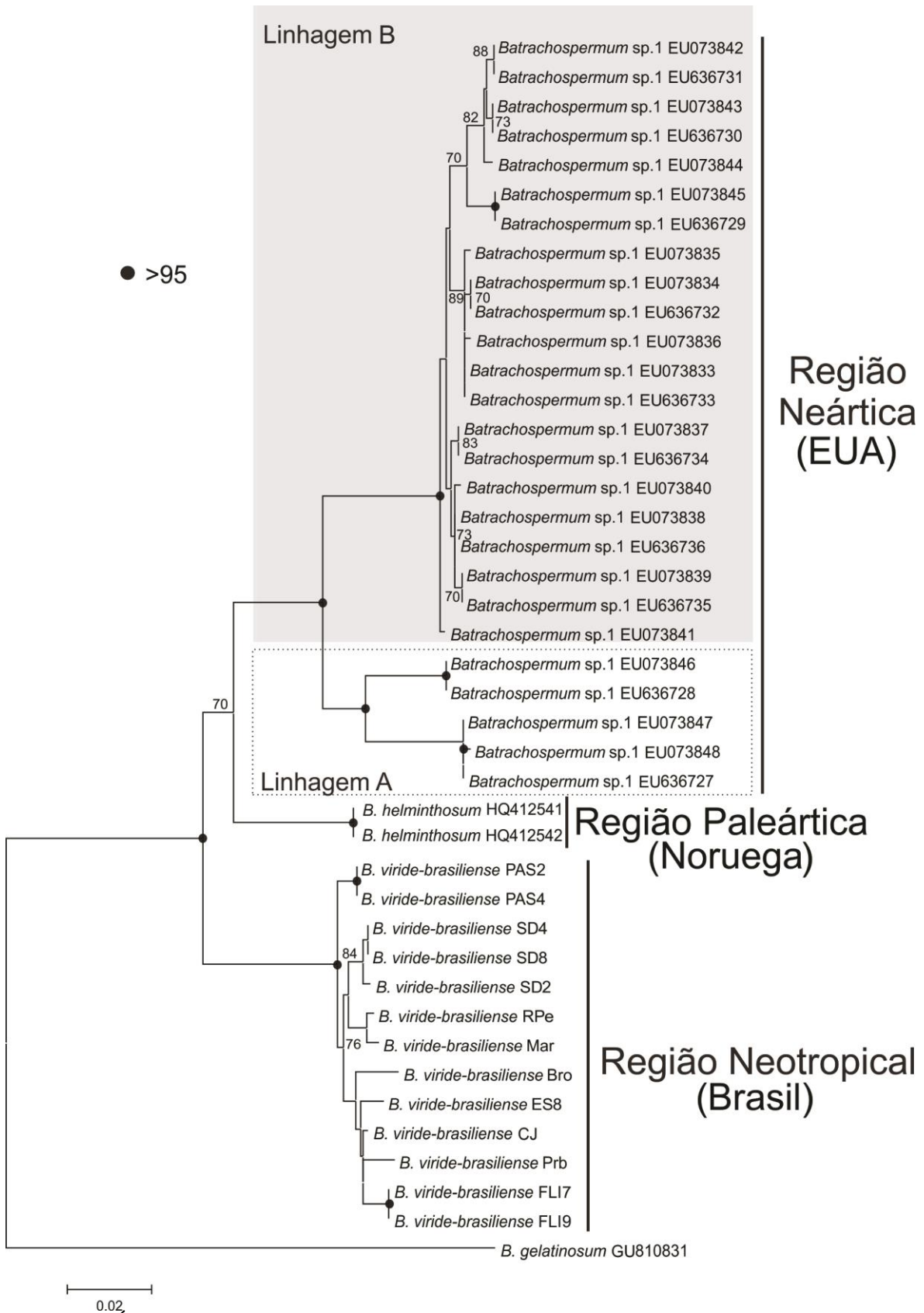


Figura 3: Árvore de distância (“neighbor joining”) gerada com base nas sequências da região de “barcode” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”. Círculos cheios nos nós indicam valores de BS > 95.

Tabela 4. Número de nucleotídeos divergentes e porcentagem de divergência entre as seqüências gene *cox1* de espécimes da seção *Virescentia* do Brasil*, dos E.U.A.** e da Noruega***.

	1	2	3	4	5
1) * <i>B. viride-brasiliense</i>	0 a 15 pb (0–2,3%)				
2) ** <i>Batrachospermum</i> sp.1 (total)	57 a 69 pb (8,6–10,4%)	0 a 46 pb (0–7,0%)			
3) ** <i>Batrachospermum</i> sp.1 Linhagem “A”	57 a 63 pb (8,6–9,5%)	---	0 a 28 pb (0–4,3%)		
4) ** <i>Batrachospermum</i> sp.1 Linhagem “B”	58 a 69 pb (8,8–10,4%)	---	36 a 46 pb (5,5–7,0%)	0 a 11 pb (0–1,7%)	
5) *** <i>B. helminthosum</i> HQ412541; HQ412542	45 a 51 pb (6,8–7,7%)	48 a 55 pb (7,3–8,3%)	53 a 55 pb (8,0–8,3%)	48 a 55 pb (7,3–8,3%)	0

3.3. Análises das seqüências de “mini-barcode”

Foram obtidas quatro seqüências com 246 pb para a região de “mini-barcode” do gene *cox1* a partir de exsicatas, sendo três provenientes do Brasil, identificadas como *B. viride-brasiliense*, e uma do Japão, identificada como *Batrachospermum* sp.2.

As análises da região de “mini-barcode” do gene *cox1* foram essencialmente congruentes ao observado nas análises dos genes *rbcL* e *cox1*. A árvore de distância (“Neighbor Joining”) evidenciou quatro grupos bem suportados, com clara disjunção entre as seqüências da Região Neártica (E.U.A./América do Norte), Região Neotropical (Brasil/América do Sul), Europa (Noruega) e Paleártica (Japão/Ásia) (Figura 4). As seqüências de *B. viride-brasiliense* do Brasil apresentaram variação de 0 a 6 pb (0–2,5%), enquanto que as seqüências de *Batrachospermum* sp.1 dos E.U.A. variaram em 0 a 15 pb (0–6,1%). A divergência nas seqüências entre cada um desses quatro clados foi bem superior: Brasil x E.U.A. foi de 16 a 22 pb (6,6–9,0%); Brasil x Noruega foi 14 a 18 pb (5,7–7,0%); Brasil x Japão foi de 16 a 20 pb (6,6–8,2%); E.U.A. x Noruega foi de 11 a 14 pb (4,5–5,7%);

E.U.A. x Japão foi de 30 a 34 pb (12,2–13,9%); e Japão x Noruega foi de 29 pb (11,8%) (Tabela 5).

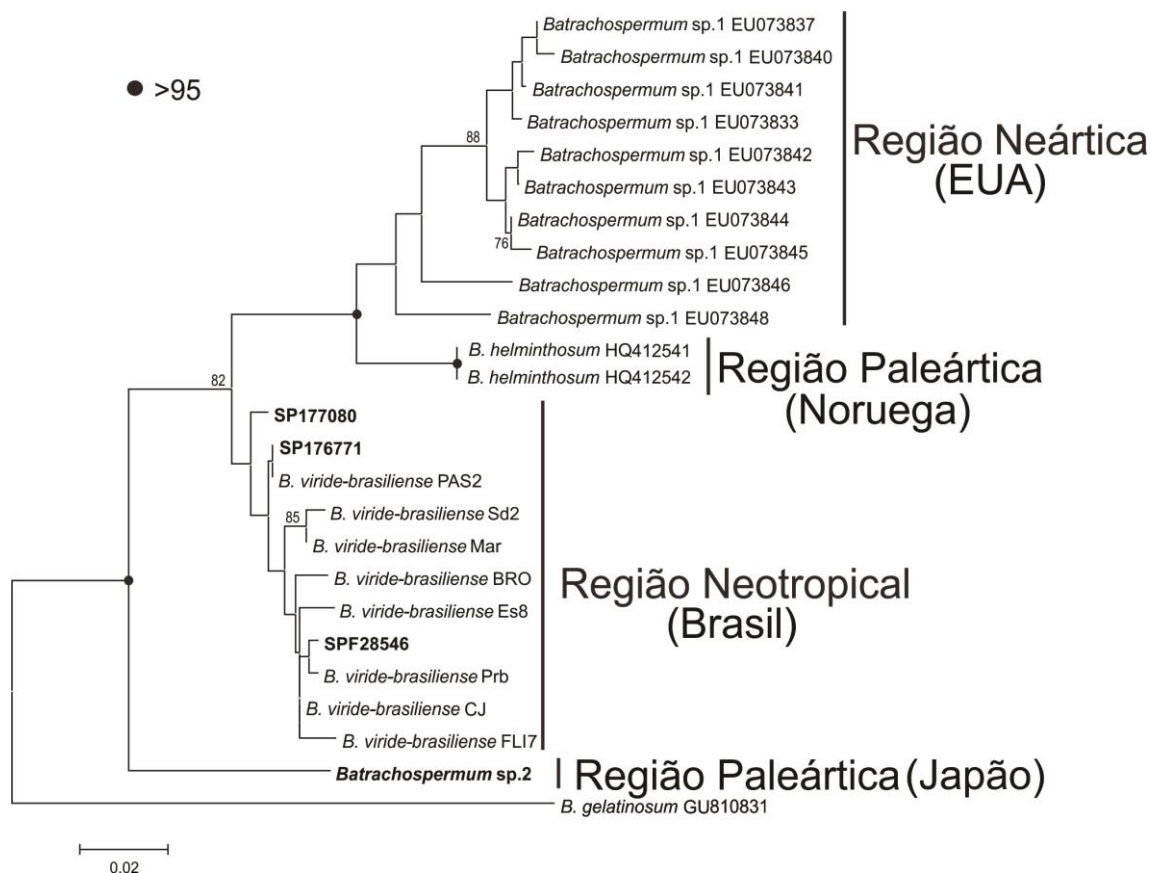


Figura 4: Árvore de distância (“Neighbor Joining”) gerada com base nas sequências da região de “mini-barcode” do gene *cox1*. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap”. Círculos cheios nos nós indicam valores de BS > 95.

Tabela 5. Número de nucleotídeos divergentes e porcentagem de divergência entre as sequências da região de “mini-barcode” do gene *cox1* de espécimes da seção *Virescentia* do Brasil, dos Estados Unidos*, do Japão** e da Noruega***.

	1	2	3	4
1) <i>B. viride-brasiliense</i>	0 a 6 pb (0-2,5%)			
2) * <i>Batrachospermum</i> sp.1	16 a 22 pb (6,6-9,0%)	0 a 15 pb (0-6,1%)		
3) ** <i>Batrachospermum</i> sp.2	16 a 20 pb (6,6-8,2%)	30 a 34 pb (12,2-13,9%)	0	
4) ***HQ412541; HQ412542	14 a 18 pb (5,7-7%)	11 a 14 pb (4,5-5,7%)	29 pb (11,8)	0

3.4. Análise combinada

Foram utilizadas sequências de 25 amostras com 1946 pb cada, sendo 13 de *B. viride-brasiliense* e 12 de *Batrachospermum* sp.1. As análises para MV e BA produziram topologias semelhantes e, sendo assim, apenas a árvore MV foi apresentada (Figura 5). Foi observado alto suporte (1,0 PP e 100% BS) nos clados principais da árvore. Assim como observado na análise individual para os genes *rbcL* e *cox1*, a árvore concatenada apresentou clara disjunção entre as sequências de *Batrachospermum* sp.1 da região Neártica (E.U.A./América do Norte) e de *B. viride-brasiliense* da região Neotropical (Brasil/América do Sul). No clado com as amostras da região Neártica também pode ser diferenciada duas linhagens com altos valores de suporte, reforçando a existência de pelo menos duas espécies dentro de *Batrachospermum* sp. 1 (Figura 5).

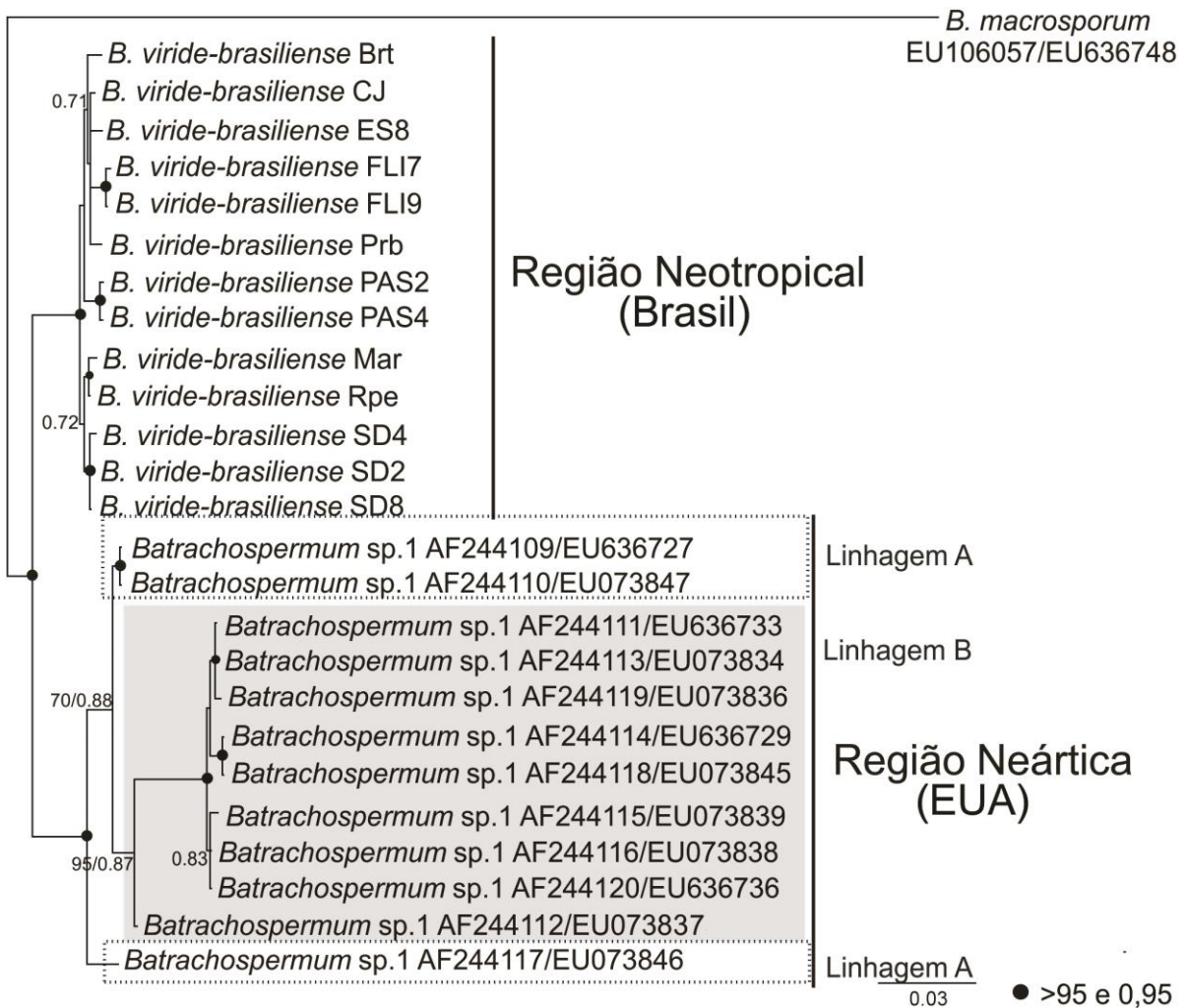


Figura 5: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) gerada com base nas sequências concatenadas dos genes *rbcL* e *cox1*, destacando a seção *Virescentia* com cinco clados principais contendo sequências do Brasil e E.U.A. Os números associados aos nós indicam os valores de “bootstrap” (BS) para MV e de probabilidade posterior (PP) para análise bayesiana; nós sem valores indicam $BS \leq 65$ ou $PP \leq 0,65$. Círculos cheios nos nós indicam valores de $BS > 95$ e $PP > 0,95$.

4. Discussão

O gene *rbcL* tem sido o marcador padrão para inferir filogenias para a ordem Batrachospermales (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; ENTWISLE et al., 2009). Mais recentemente, o gene *cox1* tem sido amplamente aceito como um marcador confiável de “DNA barcode” para rodófitas (SAUNDERS, 2005; ROBBA et al., 2006; LE GALL & SAUNDERS, 2010; CLARKSTON & SAUNDERS, 2012). As análises filogenéticas em

estudos anteriormente realizados baseados em dados moleculares (VIS et al., 1998; VIS & ENTWISLE, 2000; HANYUDA et al., 2004; VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009) indicaram a seção *Virescentia* como um grupo monofilético com alto suporte, apesar da pouca representatividade de populações e regiões geográficas. Ampliamos a representatividade de populações, com a inclusão de amostras do Brasil (AGOSTINHO & NECCHI, 2014) e corroboramos a hipótese de monofiletismo da seção, sugerida em outros estudos (VIS et al., 2005; ENTWISLE et al., 2009). Investigações recentes têm sido direcionadas a resolver o parafiletismo do gênero *Batrachospermum* (ENTWISLE et al., 2009; SALOMAKI et al., 2014; ENTWISLE et al., 2016; ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016). Há tendência recente de elevar grupos monofiléticos menores a gêneros distintos dentro da ordem Batrachospermales: *Kumanoa* (combinação das seções *Contorta* e *Hybrida*, ENTWISLE et al. 2009), *Sheathia* (antiga seção *Helminthoidea*, SALOMAKI et al., 2014) e *Setacea* (antiga seção de mesmo nome, ROSSIGNOLO et al., 2016). Por outro lado, Entwisle et al. (2016) adotaram posição contrastante, incluindo vários grupos seções menores com espécies da Australásia e a seção *Setacea*, dentro de *Nothocladus* sensu lato. Com base nessas premissas e adotando a tendência mais universal de separar grupos monofiléticos menores da ordem Batrachospermales, justifica-se a elevação de *Virescentia* para a categoria de gênero.

A variação das sequências para o gene *rbcL* observada entre as amostras brasileiras de *B. viride-brasiliense* (0 a 12 pb, 0–0,9%, AGOSTINHO & NECCHI, 2014) foi geralmente inferior a variação intraespecífica observada em outras rodófitas continentais da ordem Batrachospermales. Hanyuda et al. (2004) encontraram variação de 2 a 29 pb (0,2–2,3%) para quatro haplótipos de *B. helminthosum* mais estreitamente relacionados do Japão e 34 a 41 pb (2,7–3,2%) em relação a haplótipo atípico. Vis & Sheath (1997) observaram variação de 0 a 24 pb (0–1,9%) em *B. gelatinosum* (L.) De Candolle na América do Norte; Vis & Entwisle (2000) reportaram variação de 0 a 50 pb (0–3,9%) em *B. pseudogelatinosum* Entwisle et Vis

na Austrália; Vis et al. (2008) observaram uma variação de 0 a 76 pb (0–6,0%) entre espécimes de *B. macrosporum* das Américas do Sul e Norte; Vis et al. (2010) analisaram 107 espécimes de *B. arcuatum* coletados na América do Norte, Ásia e Europa e encontraram uma divergência de 0 a 82 pb (0–6,4%). Neste estudo, a sequência de *B. vogesiacum* da França apresentou uma alta divergência em relação às demais sequências analisadas, com variações de 117 a 142 pb (9,2-11,1%). Estes valores são muito superiores às divergências interespecíficas relatadas para Batrachospermales, chegando a um nível de divergência próxima à observada entre diferentes gêneros.

Os limites de variação para a região de “barcode” do gene *cox1* observados entre os espécimes brasileiros de *B. viride-brasiliense* (2 a 19 pb, 0,3–2,9%) foram geralmente superiores aos limites de variação reportados para rodófitas marinhas. Saunders (2005) observou uma variação intraespecífica para o gene *cox1* de 0 a 2 pb (0–0,2%) e interespecífica de 30 a 90 pb (4,5–13,6%) entre 16 espécies das ordens Ceramiales, Gigartinales e Rhodymeniales. Do mesmo modo, Robba et al. (2006) encontraram variação intraespecífica muito inferior (0 a 4 pb, 0–0,7%) comparada com a variação interespecífica (28 a 148 pb, 5,2-27,4%) para representantes de seis ordens de algas vermelhas. Porém, comparando-se com dados de variação intraespecíficas para espécies de rodófitas continentais, nossos dados situaram-se dentro ou abaixo dos limites reportados. House et al. (2010) analisaram 193 indivíduos de *B. gelatinosum* provenientes de 16 localidades ao longo da região leste da América do Norte e observaram a ocorrência de cinco haplótipos com variação intraespecífica de 0 a 2 pb (0–0,2%). Em contraste, Sherwood et al. (2008) reportaram variação intraespecífica de 0 a 67 pb (0–10,1%) para *B. macrosporum*. Em estudo com 70 indivíduos de *B. helminthosum* coletados no leste da América do Norte, House et al. (2008) observaram uma variação de 0 a 44 pb (0–6,6%), mas não foram encontrados caracteres morfológicos que distinguíssem os haplótipos divergentes.

Geralmente é difícil recuperar rapidamente e a baixos custos sequências de “barcode” de espécimes de museus com mais de uma década, especialmente porque o DNA está degradado e fragmentado (WHITFIELD, 1999; HAJIBABAEI et al., 2005). Tal comparação é crítica quando o “barcode” revela espécies crípticas dentro do que era visto como uma única espécie, não sendo morfologicamente evidente qual delas combina com o holótipo (HEBERT et al., 2004a; JANZEN et al., 2005). Meusnier et al. (2008) determinaram o quanto de informação é requerido para identificações utilizando sequências de “DNA barcode” com o gene *cox1*. Estes autores calcularam a probabilidade de se ter “barcodes” espécie-específicos para fragmentos de tamanhos variados. A análise demonstrou que enquanto fragmentos completos de “DNA barcode” apresentam a melhor resolução (97%), obtém-se um sucesso de 90% na identificação com regiões de 100 pb e 95% com “barcodes” com 250 pb. Neste estudo, as análises feitas a partir do “mini-barcode” foram congruentes com as realizadas a partir de fragmentos completos da região de “barcode” do gene *cox1*. As sequências geradas a partir das exsiccatas de amostras brasileiras apresentaram grande similaridade com as demais sequências de *B. viride-brasiliense* e estão distribuídas dentro do clado com espécimes brasileiros. A sequência gerada a partir da exsicata de uma amostra proveniente do Japão demonstrou grande divergência com todas as demais sequências do Brasil, E.U.A. e Noruega, e a disposição dessa sequência na árvore em um clado com alto suporte, corroboram o reconhecimento de uma espécie distinta (denominada de *Batrachospermum* sp.2).

A análise combinada de diferentes genes é uma opção para evitar a perda de dados e mesclar a história evolutiva dos genes para se aproximar mais da realidade evolutiva do grupo (DUCHENE et al., 2011). Os genes individuais são susceptíveis a variações causadas por diferentes taxas de substituição e as árvores resultantes de diferentes genes frequentemente resultam em topologias variadas. Um número mínimo de genes pode ser

usado para reproduzir resultados mitogenômicos e otimizar as análises de grandes conjuntos de dados ou com sequências mitogenômicas incompletas (GATESY et al., 2007; DUCHENE et al., 2011). Neste estudo, a árvore resultante da análise combinada foi congruente com as árvores individuais geradas para os genes *rbcL* e *cox1*.

Em adição às distâncias genéticas, três outros critérios (LELIAERT et al., 2014) suportam a existência de múltiplas espécies: (1) clados com alto suporte para todos marcadores moleculares; (2) concordância entre esses marcadores; e (3) clara descontinuidade entre a divergência intra- e interespecífica. Com base nesses critérios, pudemos concluir que os resultados das sequências de *rbcL*, *cox1* e “mini-barcode” revelaram que as amostras do Brasil, Japão, E.U.A., França e Noruega correspondem a espécies distintas. As análises filogenéticas evidenciaram espécies distintas com nítida separação biogeográfica, sendo que: *rbcL* evidenciou pelo menos cinco espécies distintas; *cox1* pelo menos três espécies; e “mini-barcode” pelo menos quatro. Em resumo, cinco espécies podem ser reconhecidas mundialmente com base em sequências dos três marcadores moleculares em conjunto: *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *B. helminthosum*, *Batrachospermum sp1*, *Batrachospermum sp2*.

A presença de clados bem definidos, com nítida repartição biogeográfica e associados a uma divergência relativamente alta nas sequências confirmaram a hipótese de que espécies novas, particularmente espécies crípticas e com padrão biogeográfico bem definido, seriam encontradas e reconhecidas como espécies distintas dentro de *Virescentia*.

5. Referências

- AGOSTINHO, D. C.; NECCHI, O. J. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. **Phycologia**, v. 53, n. 6, p. 561-570, 2014.
- BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 17, p. 6350-6355, April 29, 2008 2008.
- CHIASSON, W. B.; MACHESKY, N. M.; VIS, M. L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum*, (Rhodophyta) in North America. **Phycologia**, 2003.
- CHIASSON, W. B.; SALOMAKI, E. D.; VIS, M. L. New Collections of Freshwater Red Algae (Batrachospermales, Rhodophyta) from Historically Important Areas in France. **Cryptogamie, Algologie**, v. 35, n. 3, p. 303-316, 2014/08/01 2014.
- CLARKSTON, B. E.; SAUNDERS, G. W. An examination of the red algal genus *Pugetia* (Kallymeniaceae, Gigartinales), with descriptions of *Salishia firma* gen. & comb. nov., *Pugetia cryptica* sp. nov. and *Beringia wynnei* sp. nov. **Phycologia**, v. 51, p. 33-61, 2012.
- COSTION, C.; FORD, A.; CROSS, H.; CRAYN, D.; HARRINGTON, M.; LOWE, A. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26841, 2011.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, Aug 2012.
- DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1462, p. 1905-16, Oct 29 2005.
- DRUMMOND, A. J.; ASTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; THIERER, T.; WILSON, A. **Geneious v5.6**. www.geneious.com 2012.
- DUCHENE, S.; ARCHER, F. I.; VILSTRUP, J.; CABALLERO, S.; MORIN, P. A. Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27138, 2011.
- EATON, M.; MEYERS, G.; KOLOKOTRONIS, S.-O.; LESLIE, M.; MARTIN, A.; AMATO, G. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1389-1404, 2010/06/01 2010.

ENTWISLE, T. J.; JOHNSTON, E. T.; LAM, D. W.; STEWART, S. A.; VIS, M. L. Nocturama gen. nov., Nothocladus s. lat. and other taxonomic novelties resulting from the further resolution of paraphyly in Australasian members of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta). **J Phycol**, v. 52, n. 3, p. 384-96, Jun 2016.

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.

FLOYD, R.; ABEBE, E.; PAPERT, A.; BLAXTER, M. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Mol Ecol**, v. 11, n. 4, p. 839-50, Apr 2002.

FRESHWATER, D. W.; FREDERICQ, S.; BUTLER, B. S.; HOMMERSAND, M. H.; CHASE, M. W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 15, p. 7281-5, Jul 19 1994.

GATESY, J.; DESALLE, R.; WAHLBERG, N. How Many Genes Should a Systematist Sample? Conflicting Insights from a Phylogenomic Matrix Characterized by Replicated Incongruence. **Systematic Biology**, v. 56, n. 2, p. 355-363, April 1, 2007 2007.

GOLDSTEIN, P. Z.; DESALLE, R. Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. **Mol Ecol**, v. 12, n. 7, p. 1993-8, Jul 2003.

GONZALEZ, M. A.; BARALOTO, C.; ENGEL, J.; MORI, S. A.; PETRONELLI, P.; RIERA, B.; ROGER, A.; THEBAUD, C.; CHAVE, J. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7483, 2009.

HAJIBABAEI, M.; DEWAARD, J. R.; IVANOVA, N. V.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R. T.; KIRK, S. L.; MACKIE, P. M.; HEBERT, P. D. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1462, p. 1959-67, Oct 29 2005.

HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 4, p. 968-71, Jan 24 2006.

HALL, M. M.; VIS, M. L. Genetic variation in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) among and within stream reaches using intersimple sequence repeat molecular markers. **Phycol. Res.**, p. 50:155-62, 2002.

HANYUDA, T.; SUZAWA, Y.; SUZAWA, T.; ARAI, S.; SATO, H.; UEDA, K. Biogeography and taxonomy of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Japan inferred from *rbcL* gene sequences. **J. Phycol.**, v. 40, p. 581-8, 2004.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1512, p. 313-21, Feb 7 2003.

HEBERT, P. D.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 41, p. 14812-7, Oct 12 2004a.

HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e312, Oct 2004b.

HOUSE, D. L.; SHERWOOD, A. R.; VIS, M. L. Comparison of three organelle markers for phylogeographic inference in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North America. **Phycological Research**, v. 56, n. 2, p. 69-75, 2008.

HOUSE, D. L.; VANDENBROEK, A. M.; VIS, M. L. Intraspecific genetic variation of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in eastern North America. **Phycologia**, v. 49, n. 5, p. 501-507, 2010/09/03 2010.

HUBERT, N.; MEYER, C. P.; BRUGGEMANN, H. J.; GUERIN, F.; KOMENO, R. J.; ESPIAU, B.; CAUSSE, R.; WILLIAMS, J. T.; PLANES, S. Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e28987, 2012.

JANZEN, D. H.; HAJIBABAEI, M.; BURNS, J. M.; HALLWACHS, W.; REMIGIO, E.; HEBERT, P. D. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1462, p. 1835-45, Oct 29 2005.

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

LE GALL, L.; SAUNDERS, G. W. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. **J. Phycol.**, v. 46, p. 374-389, 2010.

LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; VANORMELINGEN, P.; STEEN, F.; LO´PEZBAUTISTA, J.; ZUCCARELLO, G. C.; DE CLERCK, O. DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v. 49, p. 179-196, 2014.

LUMBSCH, H. T.; LEAVITT, S. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 59-72, 2011/09/01 2011.

MARSHALL, E. Taxonomy. Will DNA bar codes breathe life into classification? **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1037, Feb 18 2005.

MEUSNIER, I.; SINGER, G. A.; LANDRY, J.-F.; HICKEY, D. A.; HEBERT, P. D.; HAJIBABAEI, M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. **BMC Genomics**, v. 9, p. 214, 2008.

NECCHI, O. J.; VIS, M. L. **Monograph of the genus *Kumanoa* (Rhodophyta, Batrachospermales)**. Stuttgart: J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 2012. 79 p. ISBN 9783443600433 (pbk.)

0067-8112 ;.

NEIGEL, J.; DOMINGO, A.; STAKE, J. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. **Coral Reefs**, p. 26: 487–499, 2007.

PAZ, A.; CRAWFORD, A. J. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. **J Biosci**, v. 37, n. 5, p. 887-96, Nov 2012.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, January 1, 1998 1998.

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.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-4, Aug 12 2003.

ROSSIGNOLO, N. L.; NECCHI, O. J. Revision of section *Setacea* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) with emphasis on specimens from Brazil. **Phycologia**, v. 55, n. 4, p. 337-346, 2016.

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

SALOMAKI, E. D.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; VIS, M. L. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. **J Phycol**, v. 50, n. 3, p. 526-42, Jun 2014.

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.

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.

SILVESTRO, D.; MICHALAK, I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 12, n. 4, p. 335-337, 2012.

SMITH, M. A.; RODRIGUEZ, J. J.; WHITFIELD, J. B.; DEANS, A. R.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 34, p. 12359-64, Aug 26 2008.

SMITH, M. A.; WOOD, D. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. . **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, p. 104: 4967–4972, 2007.

SMITH, M. A.; WOODLEY, N. E.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 10, p. 3657-3662, March 7, 2006 2006.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-90, Nov 01 2006.

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. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> 2016.

VIS, M. L.; CAMERON HODGE, J.; NECCHI, O. J. Phylogeography of *Batrachospermum macrosporum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from North and South America. **Journal of Phycology**, v. 44, n. 4, p. 882-888, 2008.

VIS, M. L.; CHIASSON, W. B.; SHEATH, R. G. Phylogenetic relationships of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana. **Phycologia**, v. 44, p. 441-46, 2005.

VIS, M. L.; ENTWISLE, T. J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. **J. Phycol.**, v. 36, p. 1175-182, 2000.

VIS, M. L.; FENG, J.; CHIASSON, W. B.; XIE, S.-L.; STANCHEVA, R.; ENTWISLE, T. J.; CHOU, J.-Y.; WANG, W.-L. Investigation of the molecular and morphological variability in *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from geographically distant locations. **Phycologia**, v. 49, n. 6, p. 545-553, 2010/11/02 2010.

VIS, M. L.; MILLER, E. J.; HALL, M. M. Biogeographical analyses of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America using molecular and morphological data. **Phycologia**, p. 40: 2–9, 2001.

VIS, M. L.; NECCHI, O. J.; CHIASSON, W. B.; ENTWISLE, T. J. Molecular phylogeny of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 48, p. 750-758, 2012.

VIS, M. L.; SAUNDERS, G. W.; SHEATH, R. G.; DUNSE, K.; ENTWISLE, T. J. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences. **J. Phycol.**, v. 34, p. 341-50, 1998.

VIS, M. L.; SHEATH, R. G. Biogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America based on molecular and morphological data. **J. Phycol.**, v. 33, p. 520-6, 1997.

WANDELER, P.; HOECK, P. E.; KELLER, L. F. Back to the future: museum specimens in population genetics. **Trends Ecol Evol**, v. 22, n. 12, p. 634-42, Dec 2007.

WHITFIELD, J. B. Destructive sampling and information management in molecular systematic research: an entomological perspective. In: BYERS, S. e METSGER, D. (Ed.). **Managing the Modern Herbarium: An Interdisciplinary Approach**. Society for Preservation of Natural History Collections and Royal Ontario Museum, 1999. cap. 18, p.301.

CAPÍTULO 2:

Taxonomia da seção *Virescentia* do gênero

***Batrachospermum* (Rhodophyta,**

Batrachospermales)

1. Introdução

O trabalho de Sirodot (1884) pode ser considerado o ponto de partida para os estudos taxonômicos do gênero *Batrachospermum*, pois nele foram propostos originalmente o sistema de classificação infra-genérico e os critérios para identificação de espécies. Entretanto, conforme enfatizado por Israelson (1942), Sirodot não evitou a falha de usar em vários casos diferenças morfológicas variáveis para distinção das unidades taxonômicas. Ainda, segundo o mesmo autor, muitas das espécies e variedades de Sirodot devem ser consideradas meras formas locais, sem status taxonômico. E concluiu que a determinação de espécies de acordo com Sirodot é, portanto, uma tarefa muito delicada e o sistema foi motivo de muitas críticas. Dentre os principais críticos do sistema de Sirodot destacam-se Brand (1895) e Kylin (1912), além do próprio Israelson. Kylin (1912) reduziu o número de espécies aceitas propondo critérios mais estáveis para a identificação de espécies. Porém, mesmo as espécies de Kylin não são fáceis de se reconhecer (ISRAELSON, 1942). Skuja (1931a, b, 1933b, a, 1938, 1969) parece ter adotado uma posição intermediária entre as de Sirodot e Kylin (ISRAELSON, 1942). Entretanto, a circunscrição da espécies adotadas por Skuja é muito mais amplamente reconhecível e aceitável do que a daqueles autores, além de serem melhor definidas. Israelson (1942) examinou um número de espécimes comparativamente muito maior do que autores prévios e contribuiu efetivamente para o estabelecimento de um sistema taxonômico estável e mais amplamente aplicável, especialmente quanto à circunscrição de espécies. Reis (1974) foi altamente conservador, aplicando basicamente o mesmo tratamento de Sirodot. Mori (1975) adotou um sistema misto, incorporando características do sistema de Sirodot, Kylin e Israelson, além de propor novos critérios

para determinação de espécies. Kumano (1979) utilizou critérios baseados nos sistemas de Israelson e Skuja com poucas inovações.

Dentre as seções do gênero *Batrachospermum*, *Virescentia* (SIRODOT, 1873) (= *Verts* Sirodot, 1884; *Viridia* DeToni, 1897) corresponde a espécies com as seguintes características: aparência esverdeada e verticilos bem desenvolvidos; carposporófitos grandes, produzidos isoladamente ou em pares e inseridos no eixo principal; ramos carpogoniais retos e curtos originados das células periaxiais ou células fasciculares proximais e carpogônio com tricogínios alongados e pedicelados (MORI, 1975; KUMANO, 2002). A espécie-tipo desta seção é *B. helminthosum* Bory.

Espécies desta seção foram tradicionalmente descritas baseadas na sexualidade (monoicas ou dioicas), coloração (tom de verde), localização e comprimento do ramo carpogonial, presença de protuberâncias basais ou ondulações e ramificações no tricogínio, e densidade dos fascículos secundários e dos pelos terminais (SIRODOT, 1884; MORI, 1975; STARMACH, 1977; SHEATH et al., 1994). No entanto, Israelson (1942) notou que estas características são variáveis e a maioria das espécies é pobremente definida. Mori (1975) relatou que os ramos carpogoniais originados nas células internas dos fascículos aumentam em número em locais ensolarados e que ramificações e protuberâncias basais nos tricogínios aumentam em locais sombreados. Hanyuda (2004) confrontou os referidos caracteres morfológicos de espécimes do Japão com dados moleculares baseados em sequências do gene *rbcL* e relatou que essas características não se correlacionam com as relações filogenéticas, sugerindo serem mudanças fenotípicas induzidas sazonal e ambientalmente. Esses resultados também sugerem que a similaridade genética não está necessariamente correlacionada com características morfológicas.

De maneira semelhante, Necchi (1990b) reconheceu três espécies deste grupo para o Brasil (*B. helminthosum*, *B. sirodotii* e *B. vogesiacum*) com base em características morfológicas (número de células dos fascículos primários e abundância dos fascículos secundários). No entanto, em estudo posterior baseado em dados moleculares, Agostinho & Necchi (2014) demonstraram que essas espécies não apresentam divergência genética e correspondem a uma única espécie, identificada como *B. viride-brasiliense*. Do mesmo modo, SHEATH et al. (1994) reconheceram duas espécies desta seção para a América do Norte, *B. helminthosum* e *B. elegans*, separando-as com base na presença de protuberâncias basais nos tricogínios da segunda. Hanyuda et al. (2004) concluíram que esta é uma mudança fenotípica induzida sazonal e ambientalmente e sugeriram a sinonímia para as espécies reconhecidas para a América do Norte. Chiasson et al. (2014b) visitaram as localidades-tipo de espécies descritas por Sirodot na França e reconheceram, com base em dados morfológicos e moleculares, as espécies *B. helminthosum* e *B. vogesiacum*. Eloranta et al. (2016) reconheceram duas espécies da seção *Virescentia* na Finlândia com base em caracteres morfológicos: *B. helminthosum* e *B. vogesiacum*.

Com base unicamente em caracteres morfológicos, Kumano (2002) reconheceu, mundialmente, 11 espécies para esta seção: 1) *B. crispatum* Kumano; 2) *B. gombakense* Kumano; 3) *B. vogesiacum* T.G. Schultz (= *B. flageliforme* Sirodot); 4) *B. gulbenkianum* Reis; 5) *B. bakareense* Kumano; 6) *B. azeredoi* Reis; 7) *B. ferreri* Reis; 8) *B. elegans* Sirodot; 9) *B. transtaganum* Reis; 10) *B. helminthosum* Bory; e 11) *B. desikacharyi* Sankaran.

As relações filogenéticas entre as espécies da seção baseada em número representativo de espécies, bem como desta com outras seções do gênero *Batrachospermum* ainda estão estabelecidas de maneira muito superficial devido à

pequena representatividade de sequências disponíveis. Por outro lado, espécies crípticas têm sido reconhecidas com alto nível de divergência genética, porém sem a correspondente distinção morfológica, mas, em alguns casos, apenas geográfica, como a ocorrência de linhagens distintas geneticamente, mas não morfológicamente, entre continentes reportadas no gênero *Sirodotia* (LAM et al., 2012) .

Espécies da seção *Virescentia* foram reportadas na Europa (SIRODOT, 1884; ISRAELSON, 1942; REIS, 1967; STARMACH, 1977; ELORANTA et al., 2016), Brasil (NECCHI, 1990b) e Japão (MORI, 1975; HANYUDA et al., 2004). Na América do Norte, coleções foram amplamente reportadas no leste dos Estados Unidos, de Louisiana a Vermont (HYLANDER, 1928; FLINT, 1948, 1950; SCHUMACHER & WHITFORD, 1961; MOUL & BUELL, 1979; SHEATH & BURKHOLDER, 1985; SHEATH et al., 1993a) e, na porção oeste do continente, populações desta seção foram encontradas em Oregon (SHEATH et al., 1986) e Washington (SHEATH & HAMBROOK, 1988). O único registro de coleção de região tropical na América do Norte é de Starmach (1986-1987), proveniente de Cuba.

1.1. Objetivos

1. Avaliar quais caracteres morfológicos tem valor diagnóstico, inclusive à luz dos novos dados moleculares, para caracterização das espécies da seção *Virescentia*;
2. Circunscrever as espécies reconhecidas na seção em âmbito mundial.

2. Materiais e Métodos

Foi feita a análise morfológica de dez amostras de *Batrachospermum* sp.1, provenientes dos Estados Unidos (Tabela 1), uma exsicata de *Batrachospermum* sp. 2, proveniente do Japão (Herbário do Laboratório de Ficologia, Kobe University) e de exsicatas dos espécimes-tipo de nove espécies (*B. azeredoi*, *B. bakareense*, *B. crispatum*, *B. ferreri*, *B. gombakense*, *B. gulbenkianum*, *B. transtaganum*, *B. helminthosum* e *B. vogesiacum*) (Tabela 2) da seção *Virescentia*, através do exame de lâminas semipermanentes preparadas a partir de exsicatas provenientes de herbários europeus.

Tabela 1. Relação das amostras e correspondentes sequências inseridas no “GenBank” para os genes *rbcL* e *cox1* de *Batrachospermum* sp.1 utilizadas para análises morfológicas neste estudo.

Espécie	Localidade ¹	<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., MI, Flemming Creek	AF244110	EU073847
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., TN, Scarboro Creek	AF244117	EU073846
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Big Run	AF244111	EU636733
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., MA, Poquoy Brook	AF244115	EU073839
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., IN, Otter Creek	AF244118	EU073845
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., RI, Wood River Trib.	AF244119	EU073836
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Five Mile Creek	AF244120	EU636736
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., RI, Chipuxet River	AF029142	---
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., VA, Carvin Creek	---	EU073835
<i>Batrachospermum</i> sp.1	E.U.A., OH, Sunfish Creek	---	EU073841
<i>Batrachospermum</i> sp.2	Japão, Kobe University	---	---

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

Tabela 2. Relação dos espécimes-tipo de *Batrachospermum*, seção *Virescentia*.

Espécie	Tipo Nomenclatural	Código	Local	Coletor	Data
<i>B. azeredoi</i> Reis	Holótipo	COI. 482	Portugal, Vila da Feira	P. Reis	17.vi.1966
<i>B. bakareense</i> Kumano et Ratnasabapathy	Holótipo	TNS-AL 169085	Malásia, Kelantan	Ratnasaba pathy	03.vi.1982
<i>B. crispatum</i> Kumano et Ratnasabapathy	Holótipo	TNS-AL 169089	Malásia, Pulau Tioman	Ratnasaba pathy	24.v.1974
<i>B. ferreri</i> Reis	Holótipo	COI. 485	Portugal, Vale de Cambra	P. Reis	17.vi.1966

Tabela 2 (Continuação). Relação dos espécimes-tipo de *Batrachospermum*, seção *Virescentia*.

Espécie	Tipo Nomenclatural	Código	Local	Coletor	Data
<i>B. gombakense</i> Kumano et Ratnasabapathy	Holótipo	TNS-AL 169097	Malásia, Selangor	Ratnasaba pathy	31.v.1976
<i>B. gulbenkianum</i> Reis	Holótipo	COI. 456	Portugal, Confulcos	P. Reis & A. Santos	07.vi.1965
<i>B. transtaganum</i> Reis	Holótipo	COI. 542 ^a	Portugal, Odemira	P. Reis	19.iv.1968
<i>B. helminthosum</i> Bory	Holótipo	PC 0591734	France, Fougères	S. Sirodot	13.viii.1882
<i>B. vogesiacum</i> T. G. Schultz ex Skuja	Lectótipo	PC 0591499	França, Laugerie- Haute	S. Sirodot	01.viii.1880

2.1. Preservação

Amostras para estudos morfológicos foram fixadas em solução de formaldeído a 4% (NECCHI, 1990b).

2.2. Análises Morfológicas

Adotou-se como parâmetro 20 medições ou contagens para cada estrutura morfológica em cada amostra (NECCHI, 1990a). As análises e as fotomicrografias foram realizadas com uso de microscópio binocular “Leica DM1000”, equipado com sistema de análise de imagem Leica composto de: câmera de vídeo digital “Leica DFC 320” e software analisador de imagem LAS (“Leica Application Suite”).

Foram analisados os caracteres considerados como diagnósticos para o gênero *Batrachospermum*, e para a seção *Virescentia* em particular, de acordo com a literatura relevante (SIRODOT, 1884; MORI, 1975; NECCHI, 1990b; SHEATH et al., 1994;

ENTWISLE & FOARD, 1997; KUMANO, 2002): disposição e número de células dos fascículos primários, abundância de fascículos secundários, origem, dimensões e número de células do ramo carpogonial, dimensões do carpogônio, forma do tricogínio, altura do carposporófito em relação ao raio do verticilo, dimensões dos carposporófitos e carposporângios, número de células dos filamentos gonimoblásticos (Figura 1). Alguns caracteres de menor valor taxonômico também foram analisados para melhor caracterização das espécies: forma e dimensões dos verticilos, dos espermatângios e das células proximais e distais dos fascículos primários (Figura 1).

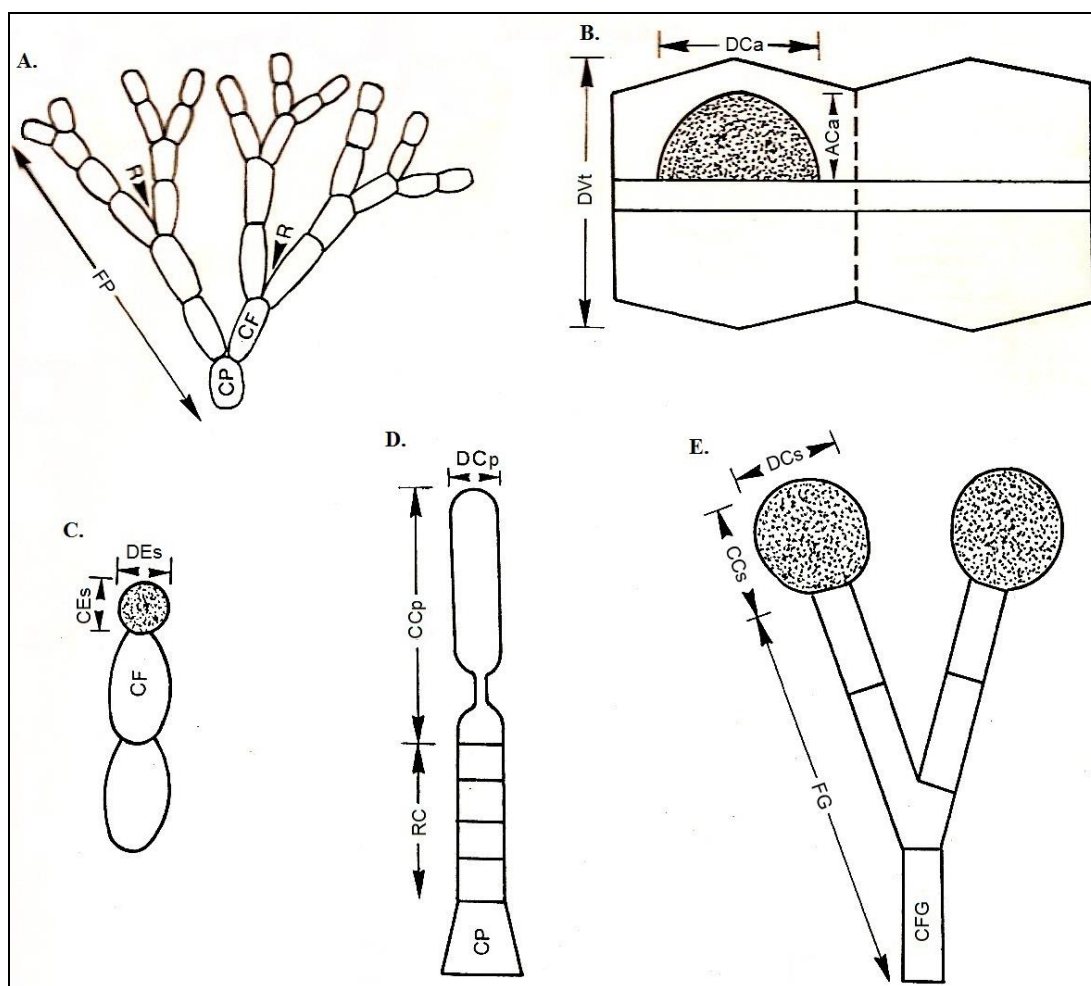


Figura 1 – Representação esquemática dos caracteres morfológicos numéricos de *Batrachospermum*. **A)** Fascículo primário: CF – célula fascicular; CP – célula pericentral; FP – fascículo primário; R – ramificação; **B)** Verticilo: Aca – altura do carposporófito; DCa – diâmetro do carposporófito; Dvt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

3. Resultados

3.1. Tratamento taxonômico

Seção *Virescentia* Sirodot, Nouvelle classification des algues d'eau douce du genre *Batrachospermum*: développement; generations alternantes. C. R. Acad. Sci., Paris, v. 76, p. 1216-20, 1873.

ESPÉCIE-TIPO: *B. helminthosum* Bory, Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Bory de Saint-Vincent, [J.B.G.M.] 12: 177-190, 1808

SINÔNIMOS: seção *Viridia* De Toni (1897:60); seção *Verts* Sirodot (1884:259); seção *Claviformia* Reis (1973).

DISTRIBUIÇÃO: Regiões temperadas, subtropicais ou tropicais da América do Norte, América do Sul, Ásia, Europa e Austrália.

HABITAT: Epilítica, epifítica ou fixa sobre substratos variados, em água corrente de rios, riachos ou em pequenos lagos ou lagoas, em profundidade geralmente pequenas (5–50 cm), locais sombreados ou bem iluminados, água transparente. Em águas ligeiramente ácidas a neutras (pH 5–7), temperatura baixa a elevada (6–27°C), baixa concentração iônica (condutividade $25 \pm 11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), alta a moderada oxigenação (oxigênio dissolvido $7,3 \pm 1,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e correnteza rápida a moderada (velocidade $39 \pm 27 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

DESCRIÇÃO: Plantas geralmente verdes ou verde azuladas, monoicas, dioicas ou polioicas; verticilos bem desenvolvidos; ramos carpogoniais bem diferenciados dos fascículos primários, sendo retos, ligeiramente curvos ou curvos, curtos ou longos, com 3,0–37,5(–68,0) μm de comprimento e 1–12(–20) células, formados a partir das células periaxiais, menos frequentemente das células fasciculares; carpogônios com 20,0–110,0 μm de comprimento, tricogínios pedicelados ou indistintamente pedicelados, claviformes, cilíndricos, subcilíndricos ou obcônicos; carposporófitos grandes (55,0–550,0 μm de comprimento e 30,0–420,0 μm de altura), maiores ou menores que o raio dos verticilos, sésseis, 1 a 2, raramente 3 por verticilo, inseridos centralmente no verticilo; carposporângios obovóides, piriformes ou elípticos, com 10–35 μm de comprimento e 5,3–24,0 μm de largura.

Chave de Identificação para as espécies da seção *Virescentia*

1. Fascículos primários e secundários curvos e unilateralmente ramificados.....2
1. Fascículos primários e secundários retos e irregularmente ramificados.....4
2. Filamentos involucrais unilaterais; carposporófito <90,0 μm de diâmetro.....*B. bakarensense*
2. Filamentos involucrais ao redor do carpogônio; carposporófito >90,0 μm de diâmetro.....3
3. Ramo carpogonial <10,0 μm de comprimento, com 1–2 células hexagonais.....*B. gombakense*
3. Ramo carpogonial >20,0 μm de comprimento, com 3–4 células doliformes.....*B. crispatum*
4. Ramo carpogonial curvo ou ligeiramente curvo.....5
4. Ramo carpogonial reto.....6
5. Tricogínio cilíndrico, ramo carpogonial com 12,0–35,0 μm de comprimento e 3–11 células.....*B. helminthosum*
5. Tricogínio claviforme ou cilíndrico, ramo carpogonial com 9,0–15,0 μm de comprimento e 3–5 células.....*B. transtaganum*
6. Carpogônio com 20–45 μm de comprimento.....7
6. Carpogônio com 30–110 μm de comprimento.....8
7. Fascículos secundários pouco numerosos e esparsos.....*B. gulbenkianum*
7. Fascículos secundários numerosos e sobre todo internó.....*B. vogesiacum*

8. Distribuição geográfica restrita às Américas.....9
8. Distribuição geográfica restrita à Ásia, região Paleártica (Japão)..... *Batrachospermum* sp.2
9. Distribuição geográfica restrita à região Neotropical (Brasil).....*B. viride-brasiliense*
9. Distribuição geográfica restrita à região Neártica (E.U.A.).....*Batrachospermum* sp.1

- 1) *B. bakarensis* Kumano et Ratnasabapathy, The Japanese Journal of Phycology, vol. 32, pp. 19-23, 1984 (Figs. 2a-d).

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas; verticilos contíguos, doliformes, 70,0–300,0 µm de diâmetro; fascículos primários curvos, unilateralmente ramificados, 7–10 células; células proximais cilíndricas, 18,0–24,0 µm de comprimento e 5,0–6,0 µm de diâmetro, células distais obovoides ou elípticas, 8,0–10,5 µm de comprimento e 4,0–5,0 µm de diâmetro; fascículos secundários numerosos e cobrindo todo internó; espermatângios esféricos, 4,0–5,0 µm de diâmetro; ramo carpogonial ligeiramente curvo, curto, com 10,0–25,0 µm de comprimento e 2–5 células, filamentos involucrais unilaterais, consistindo de numerosas células alongadas; carpogônios com 23,0–36,0 µm de comprimento e 4,0–6,0 µm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 55,0–90,0 µm de diâmetro e 30,0–60,0 µm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios claviformes ou obovoides, 13,0–18,0 µm de comprimento e 7,0–10,0 µm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratnasabapathy nº 13, 03.vi.1982, TNS-AL 169085.

ISÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratnasabapathy nº 3, 03.vi.1982.

LOCALIDADE-TIPO: Ásia, Malásia, Kelantan, Sungai Bakar. 5°41'–5°45'N e 102°14'–102°17'E.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada apenas para a localidade-tipo.

COMENTÁRIOS: *B. bakareense* foi incluída na seção *Virescentia* principalmente pela presença de ramo carpogonial curto, com 2–5 células, e tricogínio pedicelado e claviforme. Diferencia-se das demais espécies da seção por apresentar ramo carpogonial ligeiramente curvo, com filamentos involucrais produzidos unilateralmente e pelas menores dimensões dos carposporófitos (55,0–90,0 μm de diâmetro e 30,0–60,0 μm de altura).

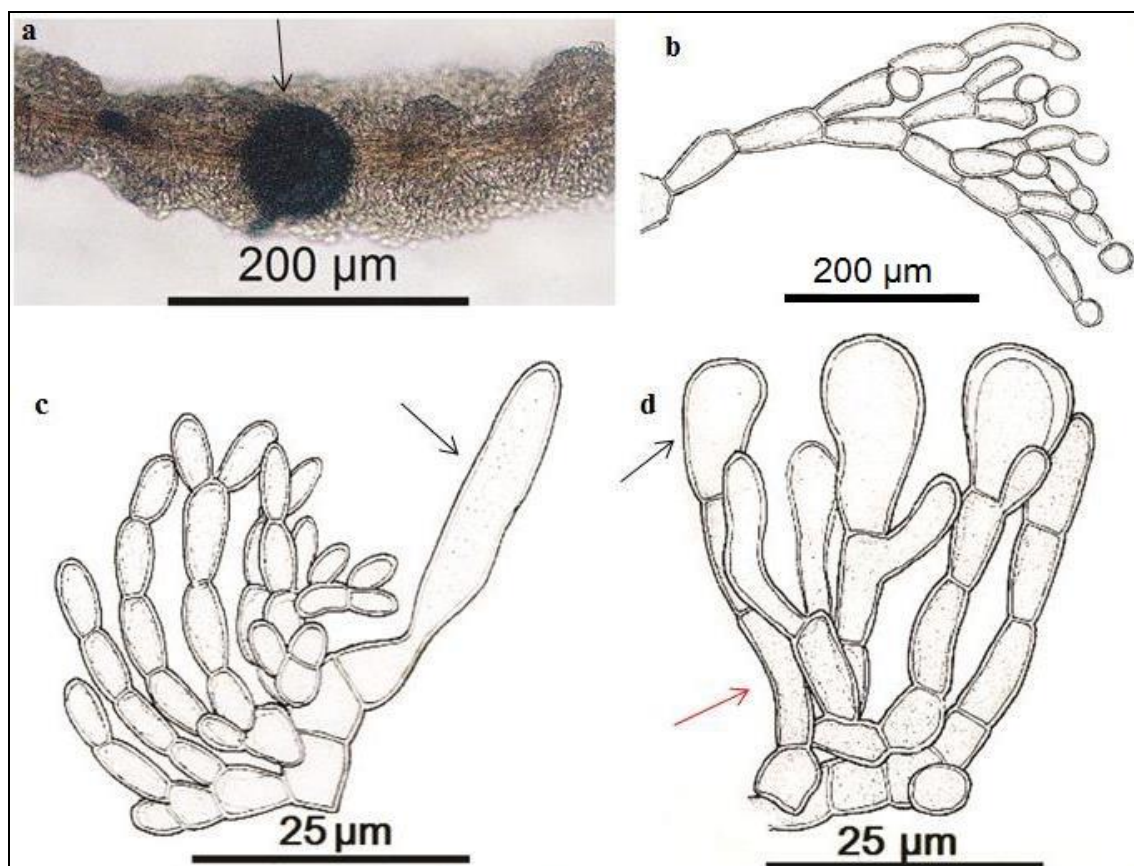


Figura 2. Caracteres morfológicos de *B. bakareense*. (a) Verticilos e carposporófito (seta). (b) Fascículo primário. (c) Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta) e filamentos involucrais unilaterais. (d) Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha). Figuras b, c, e d adaptadas de KUMANO & RATNASABAPATHY (1984).

- 2) *B. crispatum* Kumano et Ratnasabapathy, Journal of Phycology, vol. 30, pp. 15-22, 1982 (Figs. 3a-e).

DESCRIÇÃO: Plantas dioicas ou polioicas; verticilos separados ou contíguos, piriformes, 150,0–350,0 µm de diâmetro; fascículos primários curvos, unilateralmente ramificados, 5–13 células; células proximais cilíndricas, 22,0–26,2 µm de comprimento e 5,0–6,0 µm de diâmetro, células distais elípticas, 9,0–11,2 µm de comprimento e 4,5–7,4 µm de diâmetro; fascículos secundários numerosos, curvos e cobrindo todo internó; espermatângios esféricos ou ovoides, 6,0–8,0 µm de comprimento e 4,0–6,0 µm de diâmetro; ramo carpogonial ligeiramente curvo, curto, com 20,0–28,0 µm de comprimento e 3–4 células, filamentos involucrais numerosos, com células cilíndricas; carpogônios com 54,0–75,0 µm de comprimento e 5,0–9,0 µm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e cilíndrico; carposporófitos esféricos ou semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 140,0–300,0 µm de diâmetro e 70,0–135,0 µm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios claviformes ou obovoides, 14,0–30,0 µm de comprimento e 7,2–10,3 µm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratnasabapathy nº 21, 24.v.1974. TNS-AL 169089.

ISÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratanasabapathy nº 15, 24.v.1974.

LOCALIDADE-TIPO: Ásia, Malásia, Pulau Tioman, Sungai Ayer Besar, 02°49'7.98" N, 104°09'30.42" E.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada apenas para a localidade-tipo

COMENTÁRIOS: *B. crispatum* foi incluída na seção *Virescentia* principalmente pela forma dos tricogínios (pedicelado e cilíndrico) e dos carpósporos. Diferencia-se das demais espécies por apresentar fascículos primários e secundários curvos e unilateralmente ramificados.

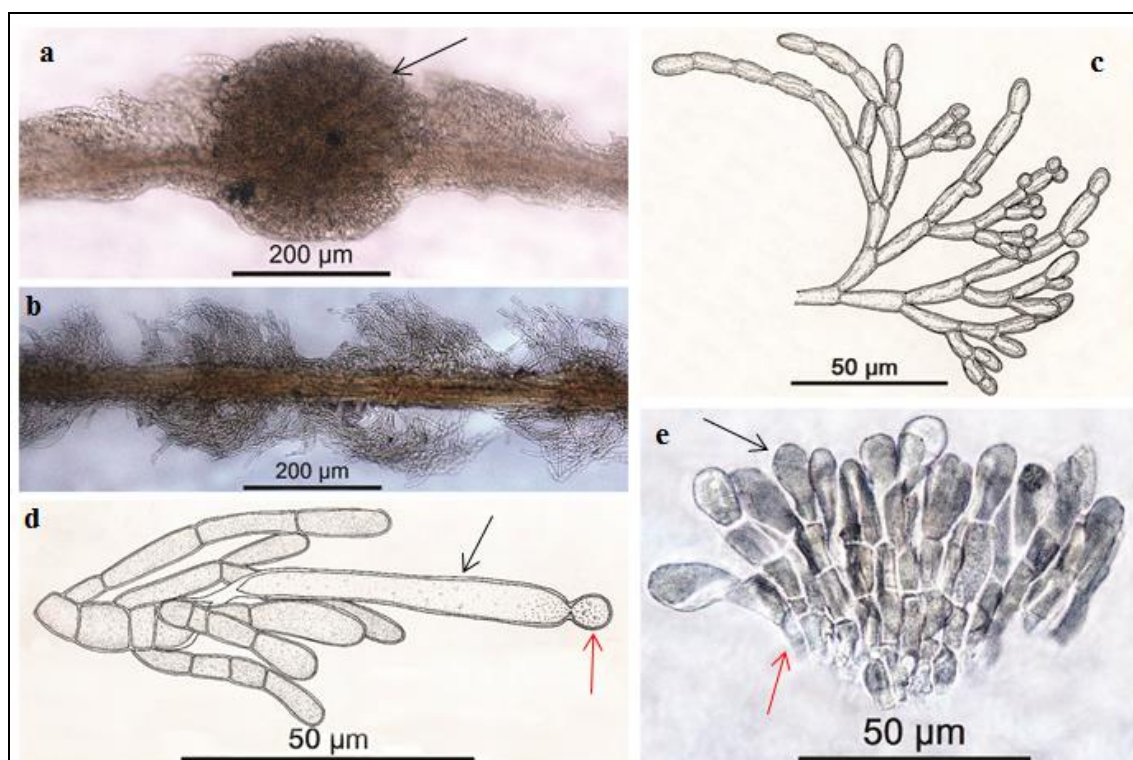


Figura 3. Caracteres morfológicos de *B. crispatum*. **(a)** Verticilos e carposporófito (seta). **(b)** Verticilos, podendo-se observar os fascículos primários e secundários curvos. **(c)** Fascículo primário curvo e unilateralmente ramificado. **(d)** Carpogônio com tricogínio bem desenvolvido (seta preta) e espermatócio aderido (seta vermelha). **(e)** Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha).

*Figuras **c** e **d** adaptadas de KUMANO & RATNASABAPATHY (1982).

- 3) *B. gombakense* Kumano et Ratnasabapathy, The Japanese Journal of Phycology, vol. 30, pp. 119-124, 1982 (Figs. 4a-e).

DESCRIÇÃO: Plantas dioicas; verticilos contíguos, doliformes, 150,0-400,0 µm de diâmetro; fascículos primários curvos, unilateralmente ramificados, 9-15 células; células proximais cilíndricas, 11,6-14,0 µm de comprimento e 4,5-8,0 µm de diâmetro, células distais doliformes, 6,0-7,5 µm de comprimento e 4,2-7,0 µm de diâmetro; fascículos secundários numerosos e cobrindo todo internó; espermatângios esféricos, 4,0-8,0 µm de diâmetro; ramo carpogonial reto, curto, com 4,0-9,0 µm de comprimento e 1-2 células hexagonais, filamentos involucrais numerosos, com 3-6 células cilíndricas ou elípticas; carpogônios com 40,0-50,0 µm de comprimento e 3,0-5,0 µm de diâmetro na base, com tricogínio indistintamente pedicelado e claviforme ou obcônico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, únicos, 185,0-300,0 µm de diâmetro e 140,0-210,0 µm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3-4 células cilíndricas; carposporângios obovóides, 20,0-25,0 µm de comprimento e 8,0-11,0 µm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratnasabapathy nº 1220, 31.v.1976. TNS-AL 169097.

ISÓTIPO: Herbário do Museu Nacional de Ciências, Tsukuba. Ratnasabapathy nº 1221, 31.v.1976.

LOCALIDADE-TIPO: Ásia, Malásia, Selangor, Sungai Gombak, 3°16'43.6"N, 101°44'26"E.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada apenas para a localidade-tipo e outra localidade no leste da Malásia, Sabah, em um tributário superior ao Sungai Tabin (KUMANO & RATNASABAPATHY, 1982).

COMENTÁRIOS: *B. gombakense* está inserido na seção *Virescentia* pela natureza do tricogínio (claviforme ou obcônico) e por apresentar um único e grande carposporófito inserido centralmente. Diferencia-se das demais espécies da seção por apresentar ramo carpogonial com uma ou duas células hexagonais, de onde se originam muitas brácteas, e pelo tricogínio indistintamente pedicelado.

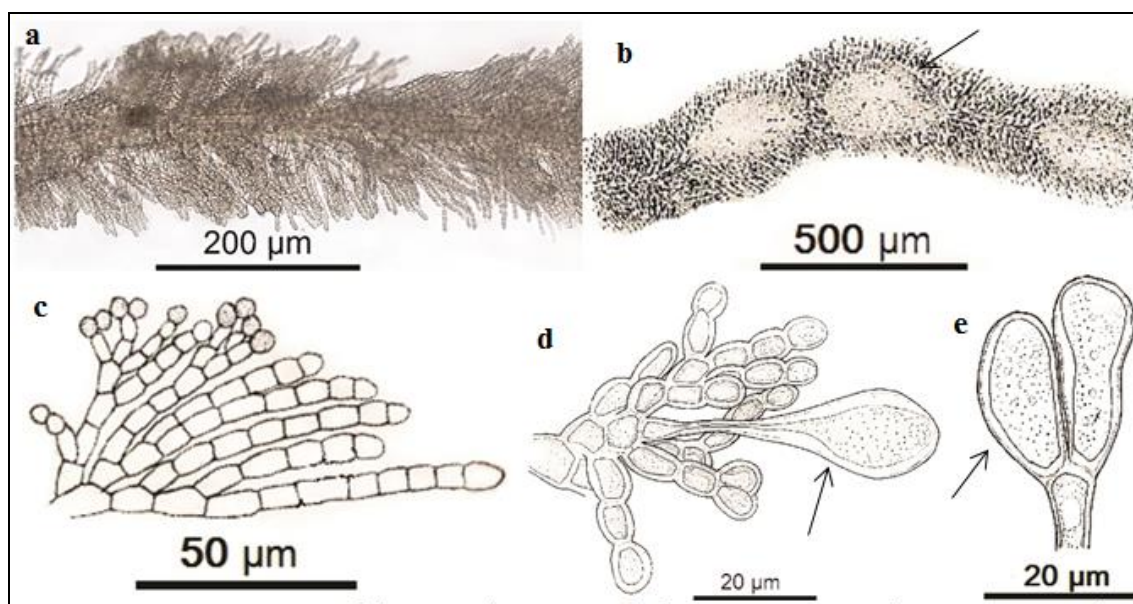


Figura 4. Caracteres morfológicos de *B. gombakense*. **(a)** Verticilos. **(b)** Verticilos e carposporófitos (seta). **(c)** Fascículo primário unilateralmente ramificado. **(d)** Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta). **(e)** Carposporângios (seta). *Figuras **b**, **c**, **d** e **e** adaptadas de KUMANO & RATNASABAPATHY (1982).

4) *B. gulbenkianum* Reis, Anuário da Sociedade Broteriana, vol. 31, pp. 31-45, 1965 (Figs. 5a-d).

SINÔNIMOS: *B. azeredoi* Reis, Boletim da Sociedade Broteriana, vol. 41, pp. 167-189, 1967; *B. ferreri* Reis, Boletim da Sociedade Broteriana, vol. 41, pp. 167-189, 1967.

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas ou polioicas; verticilos contíguos ou separados, esféricos ou semiesféricos, 430,0–810,0 μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 8–13 células; células proximais cilíndricas, 23,0–33,0 μm de comprimento e 4,5–6,0 μm de diâmetro, células distais obovoides ou elípticas, 8,9–11,0 μm de comprimento e 4,2–6,2 μm de diâmetro; fascículos secundários pouco numerosos e esparsos; espermatângios esféricos, 4,0–6,0 μm de diâmetro, filamentos involucriais numerosos, curtos, constituídos de células cilíndricas ou elípticas e encurvados sobre o carpogônio; ramo carpogonial reto, curto a longo, com 9,0–35,0 μm de comprimento e 3–12 células; carpogônios com 20,3–39,0 μm de comprimento e 5,0–9,8 μm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos esféricos ou semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–3 por verticilo, 120,0–300,0 μm de diâmetro e 60,0–150,0 μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 1–5 células cilíndricas; carposporângios obovoides ou piriformes, 10,0–17,9 μm de comprimento e 6,5–10,0 μm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra, COI. 456, P. Reis & A. Santos, 07.vi.1965.

LOCALIDADE-TIPO: Europa, Portugal, Confulcos, 'Rio Alfusqueiro'.
40°40'57.1"N, 8°08'50.3"W.

DISTRIBUIÇÃO: Europa, Portugal: Vila da Feira, 'Rio Caster'. 40°54'57.6"N,
8°33'36"W, 17-vi-1966, P. Reis et A. Santos; Ovar, Rio Gonde, 28-vi-1960, P. Reis et J.
Matos; Vale de Cambra, rio da 'Mina do Pintor'. 40°53'33.5"N, 8°27'42.5"W, 15-vi-
1966, P. Reis et A. Santos.

COMENTÁRIOS: A espécie foi inserida na seção *Virescentia* por apresentar ramificação radial, tricógnio pedicelado e claviforme ou cilíndrico e filamentos gonimoblásticos determinados (células cilíndricas, constituindo uma massa compacta de filamentos densos). *B. gulbenkianum* diferencia-se das demais espécies da seção por apresentar fascículos secundários pouco numerosos e esparsos e 1–3 carposporófitos em cada verticilo.

Reis (1967) propôs as espécies *B. azeredoi* e *B. ferreri* com base exclusivamente em características do estágio '*Chantransia*', distinguindo-as entre si pela presença de protonema filamentososo na primeira e protonema parenquimatoso na segunda. No entanto, são características consideradas desprovidas de significado taxonômico (ISRAELSON, 1942; MORI, 1975; NECCHI & OLIVEIRA, 2011). As espécies *B. azeredoi*, *B. ferreri* e *B. gulbenkianum* apresentaram grande sobreposição em todos os caracteres morfológicos e morfométricos analisados e disponíveis na literatura (REIS, 1965; REIS, 1967) e, além disso, as localidades-tipo estão geograficamente próximas (raio de 35 quilômetros). Esses dados sugerem corresponder a uma única espécie. Desse modo, *B. azeredoi* e *B. ferreri* estão sendo sinonimizadas com *B. gulbenkianum*.

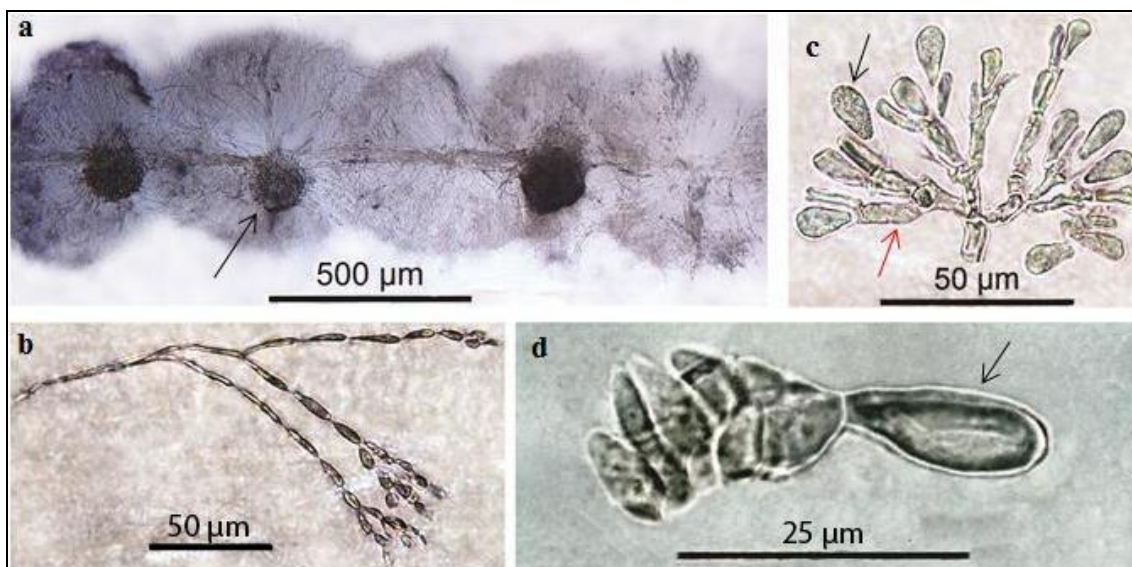


Figura 5. Caracteres morfológicos de *B. gulbenkianum*. **(a)** Verticilos e carposporófitos (seta). **(b)** Fascículo primário. **(c)** Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha). **(d)** Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta).

- 5) *B. transtaganum* Reis, Memórias da Sociedade Broteriana, vol. 21, pp. 23-26, 1970 (Figs. 6a-d).

DESCRIÇÃO: Plantas polioicas; verticilos contíguos ou separados, esféricos ou semiesféricos, 250,0–340,0 µm de diâmetro; fascículos primários retos, abundantemente ramificados, com 8–11 células; células proximais cilíndricas, 14,2–18,0 µm de comprimento e 4,2–5,8 µm de diâmetro, células distais obovóides ou elípticas, 6,0–10,0 µm de comprimento e 4,2–6,0 µm de diâmetro; fascículos secundários pouco numerosos e esparsos; espermatângios esféricos, 4,0–6,0 µm de diâmetro; ramo carpogonial geralmente curvo, curto, com 9,0–15,0 µm de comprimento e 3–5 células, filamentos involucrais numerosos, curtos, com células elípticas e envolvendo o carpogônio; carpogônios com 46,0–62,8 µm de comprimento e 6,0–9,7 µm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 165,0–220,0 µm de diâmetro; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios obovóides, 16,6–18,0 µm de comprimento e 10,0–11,0 µm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra, COI. 542a, P. Reis, 19.iv.1968.

LOCALIDADE-TIPO: Europa, Portugal, Odemira, 'Ribeira do Torgal'.
37°37'34.1"N, 8°38'13.9"W.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada apenas para a localidade-tipo e em um riacho tributário ao 'Rio Mira', Portugal.

COMENTÁRIOS: *B. transtaganum* foi inserida na seção *Virescentia* por apresentar carpogônio simétrico, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico e 1–2 carposporófitos por verticilo. Eloranta et al. (2011) sugeriram que *B. transtaganum* poderia ser transferido para o gênero *Kumanoa*, pois este é caracterizado por apresentar ramos carpogoniais curvos ou torcidos em hélice. No entanto, as espécies do gênero *Kumanoa* apresentam carpogônio assimétrico e somente um (raramente dois) carposporófitos por verticilo.

Batrachospermum transtaganum diferencia-se das demais espécies da seção *Virescentia* por apresentar fascículos secundários pouco numerosos e esparsos e ramo carpogonial geralmente curvo.

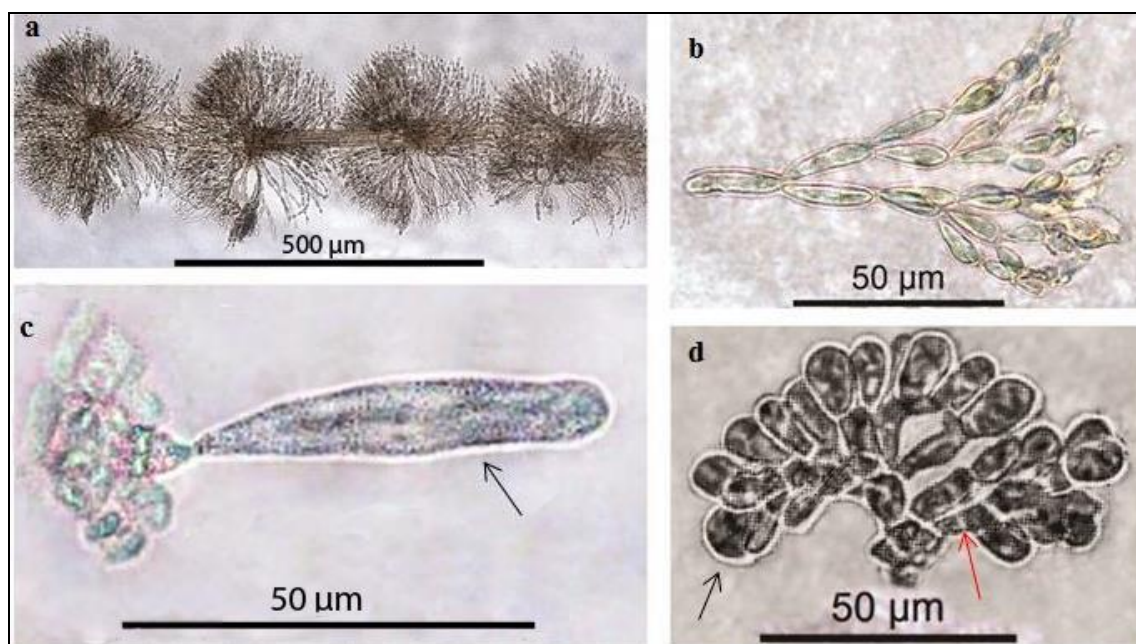


Figura 6. Caracteres morfológicos de *B. transtaganum*. (a) Verticilos. (b) Fascículo primário. (c) Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta). (d) Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha).

- 6) *B. viride-brasiliense* Necchi & Agostinho, Phycologia, vol. 53 (6), pp. 561–570, 2014 (Figs. 7a-d).

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas, dioicas ou polioicas; verticilos contíguos ou separados, doliformes, esféricos, piriformes ou obcônicos, 280,0–1100,0 μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 7–18 células; células proximais cilíndricas ou elípticas, 20,0–90,0 μm de comprimento e 4,0–15,0 μm de diâmetro, células distais elípticas, obovoides ou piriformes, 7,0–25,0 μm de comprimento e 3,0–10,5 μm de diâmetro; fascículos secundários variando de poucos e esparsos a abundantes e sobre todo internó; espermatângios esféricos, 4,0–9,0 μm de diâmetro; ramo carpogonial reto, curto a longo, com 4,0–37,5 μm de comprimento e 1–7 células, filamentos involucrais numerosos, alongados, cilíndricos ou elípticos e envolvendo o carpogônio; carpogônios com 40,0–110,0 μm de comprimento e 4,8–13,7 μm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou subcilíndrico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 200,0–550,0 μm de diâmetro e 100,0–300,0 μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–6 células cilíndricas ou doliformes; carposporângios obovoides, piriformes ou elípticos, 19,0–35,0 μm de comprimento e 10,0–24,0 μm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica, SJRP 29845.
M.O. Paiano, 15.xii.2009.

ISÓTIPO: Herbário Ficológico do Instituto de Botânica, SP428881.

LOCALIDADE TIPO: América do Sul, Brasil, São Paulo: Campos do Jordão, ‘Ducha da Prata’, 22°44’17”S, 45°34’10”W.

DISTRIBUIÇÃO: A espécie foi reportada para áreas predominantemente subtropicais e temperadas, menos frequentemente em tropicais, das regiões sudeste e sul, do estado de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (19°10’- 30°45’S) (NECCHI, 1990b; AGOSTINHO & NECCHI, 2014).

COMENTÁRIOS: *B. viride-brasiliense* diferencia-se de todas as espécies da seção pelo longo carpogônio, chegando este a 110 µm de comprimento (os demais membros da seção apresentam carpogônio com comprimento inferior a 70 µm). Todos os demais caracteres apresentaram grande sobreposição com as espécies *Batrachospermum* sp1 e *Batrachospermum* sp2. Diferencia-se das demais espécies com base nas maiores dimensões dos verticilos, carposporófitos e carposporângios.

Batrachospermum viride-brasiliense, *Batrachospermum* sp.1, e *Batrachospermum* sp.2, apresentam distribuições geográficas restritas ao Brasil, E.U.A. e Japão, respectivamente. Indivíduos dessas espécies apresentaram clara diferença genética, com diferenças superiores a 1,8% (22 pb) para as sequências do gene *rbcL* e 7,3% (48 pb) para as sequências do gene *cox1*, sugerindo serem espécies crípticas.

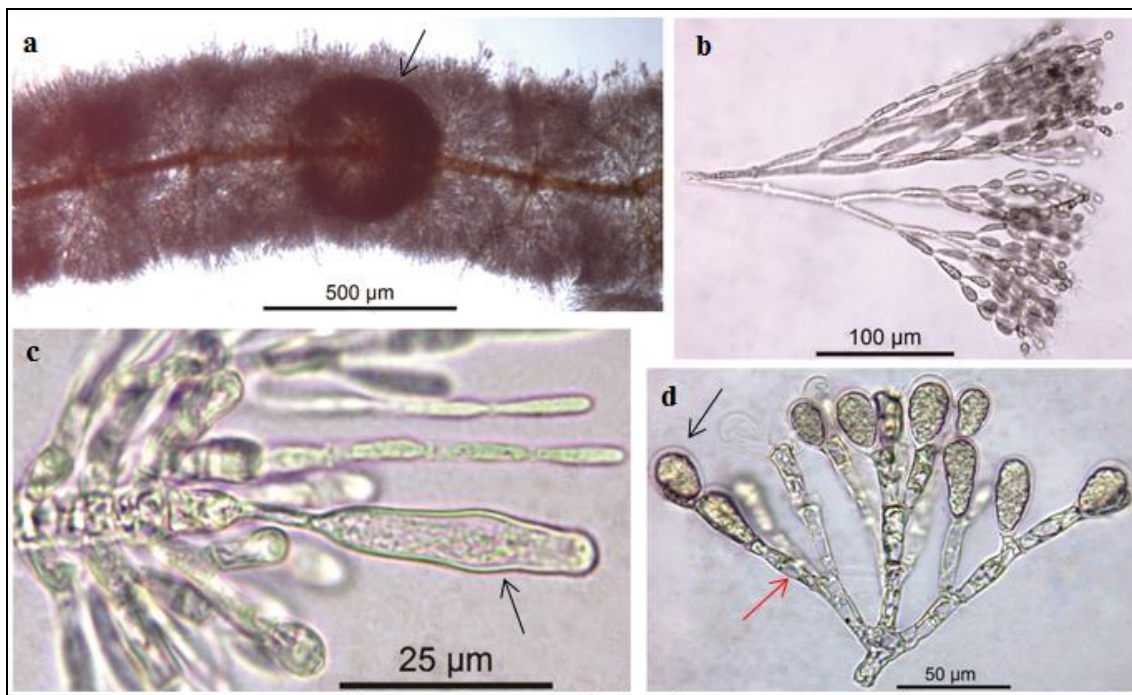


Figura 7. Caracteres morfológicos de *B. viride-brasiliense*. **(a)** Verticilos e carposporófito (seta). **(b)** Fascículo primário. **(c)** Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta). **(d)** Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha).

7) *B. helminthosum* Bory, Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Bory de Saint-Vincent, [J.B.G.M.] 12: 177-190, 1808

SINÔNIMOS: *B. graibussoniense* Sirodot (1884:278, tab. 47, fig. 1-6); *B. bruziense* Sirodot (1884:281, tab. 45, fig. 1-7, tab. 46, fig. 1-8); *B. testale* Sirodot (1884:284, tab. 42, fig. 1-5, tab. 43, fig. 1-8); *B. virgatum* Sirodot (1884:286, tab. 44, fig. 1-6, tab. 50, fig. 1-5) nom. illeg.; *B. sirodotii* Skuja ex Flint (1950:775, fig. 13-20); *B. coerulescenes* Sirodot (1884:270, tab. 40, fig. 1-4, tab. 41, fig. 1-5)

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas ou polioicas; verticilos contíguos ou separados, doliformes, esféricos ou piriformes, 400,0–800,0 µm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 8–15 células; células proximais cilíndricas ou elípticas, 20,0–35,0 (–60) µm de comprimento e 6,0–9,0 µm de diâmetro, células distais obovóides ou elípticas, 13,0–16,0 µm de comprimento e 4,0–6,0 µm de diâmetro; fascículos secundários variando de poucos e esparsos a abundantes e sobre todo internó; espermatângios esféricos, 5,0–7,0 µm de diâmetro; ramo carpogonial reto ou ligeiramente curvo, curto a longo, com 12,0–35,0 µm de comprimento e 3–11 células, filamentos involucrais curtos; carpogônios com 25,0–60,0 µm de comprimento e 4,0–6,0 µm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e cilíndrico; carposporófitos esféricos, menores que o diâmetro do verticilo, 1–2 por verticilo, 148,0–400,0 µm de diâmetro; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios obovóides ou piriformes, 11,4–28,0 µm de comprimento e 7,0–12,0 µm de diâmetro.

HOLÓTIPO: Herbário PC Thuret, France, Fougères; S. Sirodot, 13.viii.1882. PC0591734.

LOCALIDADE-TIPO: Europa, França, Fougères, Riviere de Coesne.
48°20'15"N, 1°12'24"W.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada na França para a localidade-tipo e mais duas localidades: Le Boulet Prioult, 48°19'58.0"N, 1°39'44.2"W, coletada por W. Chiasson & E. Salomaki, 5 de outubro de 2011, BHO A-0901; Estrada para Chappelle Saint Clair-de-Gout, saída da rodovia D433, 44°14'14.6"N, 0°03'31.7"W, coletado por M. Vis, W. Chiasson & K. Chiasson, 29 de outubro de 2011, BHO A-0935, A-0936; América do Norte, E.U.A. (FLINT, 1950: 757; 1970: 74); América do Sul, Brasil (NECCHI, 1988); Ásia, Japão (MORI, 1975: 468; 1977: 191; KUMANO & HIROSE, 1977: 167; KUMANO, 1979: 95); Europa, Alemanha (REIS, 1960a: 49), França (BORY, 1808: 316; SIRODOT, 1884: 270; HAMEL, 1925: 83) e Portugal (REIS, 1962: 65; 1966: 39; 1972a: 198; 1974: 96).

COMENTÁRIOS: *B. helminthosum* apresentou grande sobreposição nas dimensões dos caracteres morfológicos com *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum* sp1 e *Batrachospermum* sp2, mas apresentou ramo carpogonial mais longo que as demais, com até 11 células. Chiasson et al. (2014a) coletaram espécimes de *B. helminthosum* na localidade-tipo e, através de análises filogenéticas com base no gene *rbcL*, evidenciaram uma alta diversidade genética entre as sequências de *B. viride-brasiliense*, *Batrachospermum* sp.1 e *Batrachospermum* sp.2, demonstrando se tratarem de táxons distintos.

8) *B. vogesiacum* T. G. Schultz ex Skuja, Die Süßwasserrhodophyceen der deutschen limnologischen Sunda-Expedition, Archiv für Hydrobiologie, Supplement 15: 603-637, 1938 (Figs. 8a-d).

SINÔNIMOS: *B. vagum* var. *flageliforme* Sirodot (1884:263, tab. 35, fig. 1–2; tab. 36, fig. 1–6; tab. 39, fig. 4; Kylin, Stud. schwed. Batr. p. 34); *B. flagelliforme* (Sirodot) Necchi (1988:11), *nom. illeg.*.

EXS.: Wittr. et Nordst., Alg. exs. n. 102

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas; verticilos mais ou menos separados ou contíguos, doliformes, obcônicos, piriformes, ou semiesféricos, 340,0–700,0 μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 6–14 células; células proximais cilíndricas ou fusiformes, 25,0–60,0 μm de comprimento e 5,0–9,0 μm de diâmetro, células distais obovóides ou elípticas; fascículos secundários numerosos e cobrindo todo internó; espermatângios esféricos, 5,0–8,0 μm de diâmetro; ramo carpogonial reto, curto a longo, com 13,0–25,0(–68,0) μm de comprimento e 4–8(–20) células, filamentos involucrais numerosos, curtos, consistindo de células isodiamétricas; carpogônios com 20,0–45,0 μm de comprimento e 4,0–7,0 μm de diâmetro na base, com tricogínio indistintamente ou curtamente pedicelado e obcônico ou cilíndrico; carposporófitos esféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 140,0–330,0 μm de diâmetro e 95–175 μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios obovóides, 9,5–19,0 (–25) μm de comprimento e 6,6–13,0 (–17) μm de diâmetro.

LECTÓTIPO: Museu Nacional de História Natural, Herbário PC (coleção de Thuret). S. Sirodot, 01.viii.1880, PC0591499.

LOCALIDADE-TIPO: França, Laugerie-Haute, 44°57'09"N, 1°00'24"E.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada para a localidade-tipo e mais duas localidades: La Paulie, Rt. 374, 43°52'50.8"N, 1°14'56.6"W, coletada por M. Vis, W. Chiasson & K. Chiasson, 27 de outubro de 2011, BHO A-0930, A-0931; riacho em St. Jacques, 43°55'44.5"N, 0°43'52.3"W, coletada por M. Vis, W. Chiasson & K. Chiasson, 26 de outubro de 2011, BHO A-0926, A-0927. Austrália (BAILEY, 1988); Europa, França (SIRODOT, 1884: 263; HAMEL, 1925: 81), Portugal (REIS, 1974: 120), Suécia (ISRAELSON, 1942: 43) e U.R.S.S. (SKUJA, 1928: 206).

COMENTÁRIOS: *B. vogesiacum* diferencia-se das demais espécies da seção principalmente com base no formato dos tricogínio (indistintamente ou curtamente pedicelado e obcônico ou cilíndrico). Chiasson et al. (2014a) confirmaram ser uma espécie distinta com base em dados morfológicos e moleculares. As sequências de *B. vogesiacum* apresentaram divergência superior a 9,4% (120 pb) para o gene *rbcL* em relação às demais sequências deste estudo. Estes valores são muito superiores a toda variação intraespecífica reportada para a membros da ordem Batrachospermales (VIS & SHEATH, 1997; VIS & ENTWISLE, 2000; HANYUDA et al., 2004; VIS et al., 2008; VIS et al., 2010; AGOSTINHO & NECCHI, 2014).

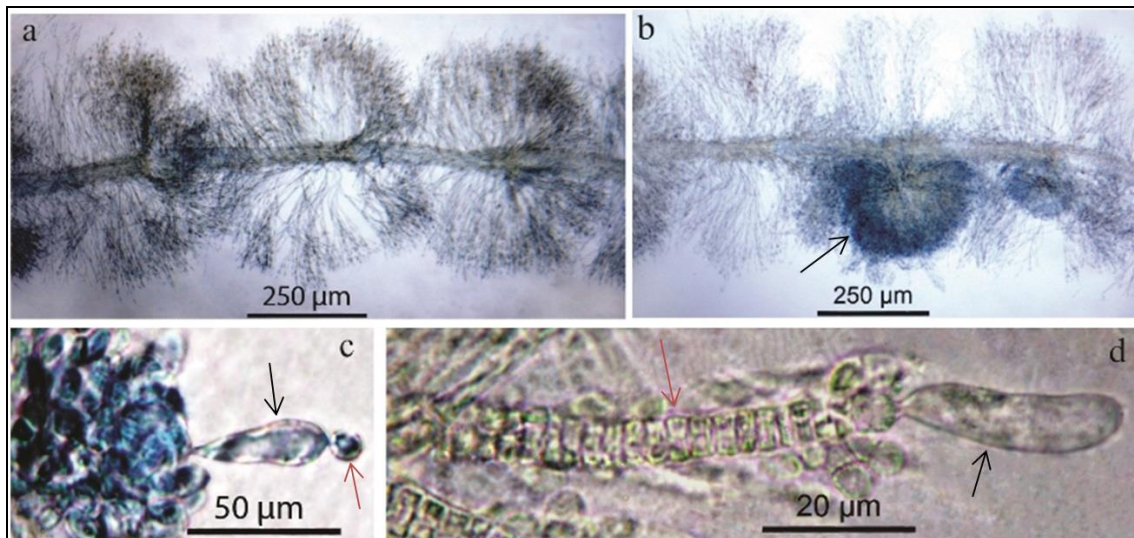


Figura 8. Caracteres morfológicos de *Batrachospermum vogesiacum*. (a) Verticilos (b) Verticilos e carposporófito (seta). (c) Carpogônio com um tricogínio obcônico (seta preta) e espermiócio aderido (seta vermelha). (d) Ramo carpogonial (seta vermelha) e carpogônio (seta preta)

9) *Batrachospermum* sp.1 (Região Neártica, E.U.A.) (Figs. 9a-d).

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas ou dioicas; verticilos contíguos ou separados, doliformes, esféricos ou piriformes, 280,0–940,0 μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 7–21 células; células proximais cilíndricas, 18,0–50,0 μm de comprimento e 5,0–17,6 μm de diâmetro, células distais obovoides ou elípticas, 6,0–12,0 μm de comprimento e 4,0–8,6 μm de diâmetro; fascículos secundários variando de poucos e esparsos a abundantes e sobre todo internó; espermatângios esféricos, 4,0–8,0 μm de diâmetro; ramo carpogonial reto, curto a relativamente longo, com 6,0–30,0 μm de comprimento e 1–7 células, filamentos involucrais numerosos, elípticos e envolvendo o carpogônio; carpogônios com 30,0–77,0 μm de comprimento e 4,0–13,7 μm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 120,0–415,0 μm de diâmetro e 70,0–420,0 μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 1–8 células cilíndricas; carposporângios obovoides ou piriformes, 9,8–27,6 μm de comprimento e 5,3–16,9 μm de diâmetro.

DISTRIBUIÇÃO: Reportada no leste dos EUA, de Louisiana a Vermont (HYLANDER, 1928; FLINT, 1948, 1950; SCHUMACHER & WHITFORD, 1961; MOUL & BUELL, 1979; SHEATH & BURKHOLDER, 1985; SHEATH et al., 1993a) e na porção oeste do país em Oregon (SHEATH et al., 1986) e Washington (SHEATH & HAMBROOK, 1988).

COMENTÁRIOS: Sheath et al. (1994) trabalharam com espécimes dos EUA exclusivamente com base em dados morfológicos e morfométricos, e propuseram várias

sinonímias, tratando esses indivíduos como *B. helminthosum*. No entanto, estudos posteriores com base em dados moleculares demonstraram que *B. helminthosum* é um grupo geneticamente diverso e pode representar mais táxons (AGOSTINHO & NECCHI, 2014; CHIASSON et al., 2014a). Como o tipo nomenclatural de *B. helminthosum* é um espécime descrito na França, esse grupo de algas dos EUA foi tratado como *Batrachospermum* sp.1.

Esta espécie apresentou morfologia bastante semelhante às espécies *B. viride-brasiliense* e *Batrachospermum* sp.2, com grande sobreposição em todos os caracteres morfológicos analisados. No entanto, as árvores filogenéticas geradas para os genes *rbcL* e *cox1* demonstram ser espécies distintas, com nítida separação biogeográfica, apresentando divergências de 8,6–10,3% (57–68 pb) e 1,9–5,1% (24–66 pb) para os genes *cox1* e *rbcL*, respectivamente.

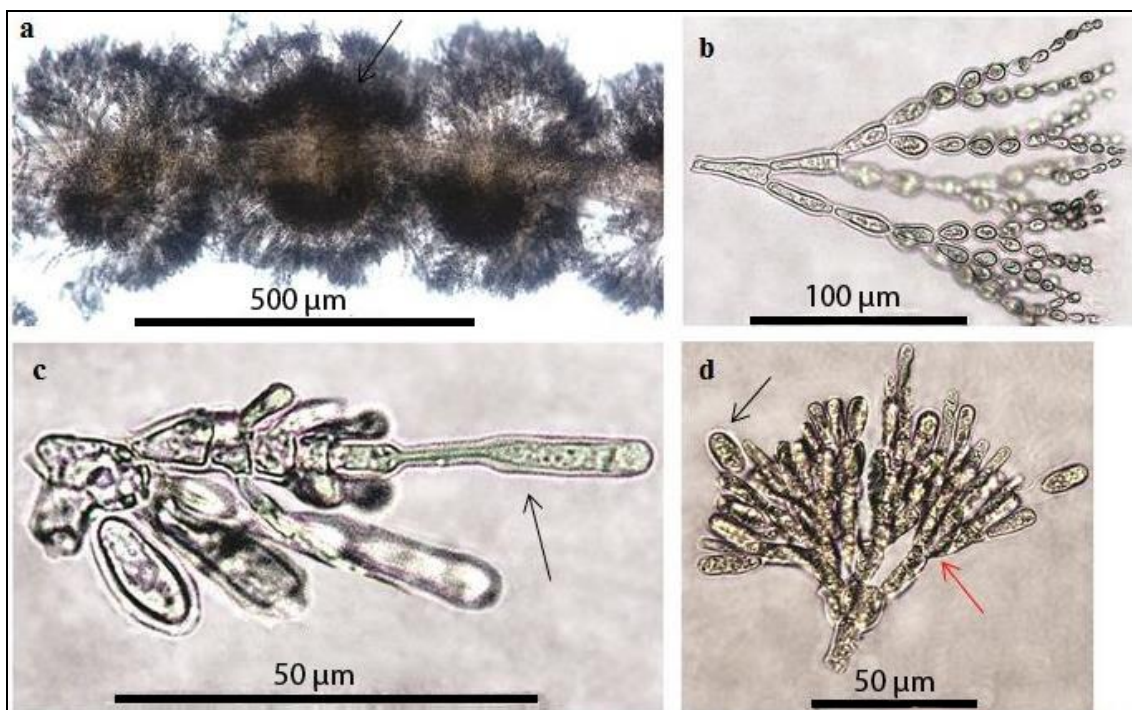


Figura 9. Caracteres morfológicos de *Batrachospermum* sp.1. **(a)** Verticilos e carposporófito (seta). **(b)** Fascículo primário. **(c)** Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta). **(d)** Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha).

Linhagens A e B de *Batrachospermum* sp.1

Com base na análise de 10 amostras de *Batrachospermum* sp.1, foram reconhecidas duas linhagens (A e B) para os genes *rbcL* e *cox1*.

Dentre os espécimes da linhagem A, as seguintes amostras foram analisadas: *Flemming Creek* (AF244110 / EU073847) e *Scarboro Creek* (AF244117 / EU073846). Plantas dioicas e apenas femininas; verticilos contíguos ou separados, doliformes ou esféricos, 280–860 (509,9±153,6 [média ± desvio padrão]) µm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 8–18 (12,2±3,3) células; células proximais cilíndricas, 18,0–38,0 x (28,5±6,9) µm de comprimento e 5,5–17,6 (9,9±3,8) µm de diâmetro, células distais obovoides ou elípticas, 7,2–12 (9,8±1,1) µm de comprimento e 4,0–6,8 (5,4±0,9) µm de diâmetro; fascículos secundários poucos numerosos e esparsos; carpogônios com 30,0–55,0 x (41,5±5,4) µm de comprimento e 4,0–9,6 (6,9±1,6) µm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 130,0–297,0 (197,5±42,1) µm de diâmetro e 83,0–200,0 (121,6±27,0) µm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–4 (3,4±0,5) células cilíndricas; carposporângios obovoides ou piriformes, 17,0–24,0 (20,0±1,7) µm de comprimento e 8,0–12,0 (9,8±1,0) µm de diâmetro (Tabelas 2 e 3).

A linhagem B apresentou maior número de sequências e maior número de espécimes analisados morfológicamente, dentre as quais as seguintes amostras foram utilizadas: *Big Run* (AF244111 / EU636733), *Poquoy Brook* (AF244115 / EU073839), *Otter Creek* (AF244118 / EU073845), *Wood River* (AF244119 / EU073836), *Five Mile Creek* (AF244120 / EU636736), *Chipuxet River* (AF029142), *Carvin Creek* (EU073835), *Sunfish Creek* (EU073841). Plantas monóicas ou dióicas; verticilos

contíguos ou separados, doliformes, esféricos obcônicos ou piriformes, 360,0–940,0 (551,9±140,3) μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, com 8–19 (12,4±2,6) células; células proximais cilíndricas, 22,0–50,0 (31,4±6,6) μm de comprimento e 5,0–12,0 (8,2±1,4) μm de diâmetro, células distais obovóides ou elípticas, 4,6–12,0 (8,5±1,6) μm de comprimento e 4,0–8,6 (5,7±1,1) μm de diâmetro; fascículos secundários variando de poucos e esparsos a abundantes e sobre todo internó; espermatângios esféricos, 4,0–8,0 (5,2±1,1) μm de diâmetro carpoângios com 40,0–77,0 (58±7) μm de comprimento e 5,0–9,0 (6,4±0,8) μm de diâmetro na base, com tricógnio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 156,0–391,0 (216,6±45,4) μm de diâmetro e 71,0–246,0 (107,1±27,3) μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–5 (4,1±0,6) células cilíndricas; carposporângios obovóides ou piriformes, 15,0–24,0 (18,5±2,1) μm de comprimento e 6,0–12,0 (9,6±1,5) μm de diâmetro (Tabelas 3 e 4).

Os caracteres analisados apresentaram grande variação entre si e ampla sobreposição entre os clados A e B, não sendo possível identificar diferenças morfológicas entre esses grupos.

Tabela 3. Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* das amostras dos E.U.A. (dimensões em μm). Códigos das amostras conforme Tabela 2. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). CI: cilíndricas; DO: doliforme; EL: elípticas; ES: esférico; NU: numerosos; OBC: obcônico; OBv: obovoide; PI: piriforme; PO: poucos.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fasc. 1 ^{arios} (n° céls.)	Tam. e Forma Céls. Fasc. 1 ^{ario}		Fasc. 2 ^{arios}
					proximais	distais	
Linhagem A							
AF244110 / EU073847	dioico ♀	DO, ES	375-860 (606 \pm 138,6)	14-18 (15,3 \pm 1,2)	CI 31,2-38 x 10,6-17,6 (35,7 \pm 2,7 x 14 \pm 2,3)	OBv, EL 9-12 x 5-6,8 (10,2 \pm 0,9 x 5,9 \pm 0,5)	PO - próximos ao nó
AF244117 / EU073846	dioico ♀	ES	280-555 (396,8 \pm 71,3)	8-12 (11 \pm 1,4)	CI 18-30 x 5,5-10 (23,6 \pm 3,7 x 7,3 \pm 1,4)	OBv, EL 7,2-11 x 4-6,3 (9,2 \pm 1,2 x 4,8 \pm 0,8)	PO - próximos ao nó
Linhagem B							
AF244111 / EU636733	dioico ♀	DO, ES	362-675 (464,6 \pm 94)	11-15 (12,1 \pm 1,4)	CI 22-30,6 x 6,3-8,2 (24,8 \pm 2,8 x 7,5 \pm 0,7)	OBv, EL 6,6-8,6 x 5,7-8,6 (7,5 \pm 0,7 x 7,2 \pm 0,9)	PO - próximos ao nó
AF244115 / EU073839	dioico ♂ e ♀	DO, ES, PI	610-940 (753,2 \pm 96,7)	12-19 (16 \pm 1,9)	CI 34-50 x 8-10 (39 \pm 6,3 x 8,7 \pm 0,8)	OBv, EL 9,7-11 x 5-7,7 (10,4 \pm 0,6 x 6,1 \pm 0,9)	NU - todo internó
AF244118 / EU073845	dioico ♀	DO, ES	383-634 (448,5 \pm 59,4)	11-15 (12,4 \pm 1,2)	CI 32,5-41,3 x 7,5-10,5 (36,3 \pm 3,6 x 8,4 \pm 1,2)	OBv, EL 6,6-9,6 x 4,7-5,9 (8,2 \pm 1,1 x 5,4 \pm 0,4)	PO a \pm NU - próximos ao nó
AF244119 / EU073836	dioico ♂ e ♀	ES, PI	535-914 (691,3 \pm 132,8)	9-14 (11,9 \pm 1,6)	CI 35,5-43,5 x 7-9 (39,8 \pm 2,7 x 7,9 \pm 0,8)	OBv, EL 8,5-11,5 x 4,2-5,7 (9,6 \pm 1,1 x 5 \pm 0,6)	NU - todo internó

Tabela 3 (Continuação). Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* das amostras dos E.U.A. (dimensões em μm). Códigos das amostras conforme Tabela 2. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). CI: cilíndricas; DO: doliforme; EL: elípticas; ES: esférico; NU: numerosos; OBc: obcônico; OBv: obovoide; PI: piriforme; PO: poucos.

Amostra	Separação de sexo	Forma Verticilo	Verticilo (diâmetro)	Fasc. 1 ^{arios} (n° céls.)	Tam. e Forma Céls. Fasc. 1 ^{ario}		Fasc. 2 ^{arios}
					proximais	distais	
AF244120 / EU636736	dioico ♀	DO, ES	400-681 (522,8 \pm 54,3)	8-14 (10,1 \pm 1,9)	CI 22-32 x 6-9,5 (26,2 \pm 3,4 x 7,7 \pm 1)	OBv, EL 6-9,2 x 4-6,8 (7,7 \pm 1 x 5 \pm 0,9)	NU - todo internó
AF029142	dioico ♂ e ♀	ES	370-776 (610,7 \pm 111,9)	10-14 (11,8 \pm 1,3)	CI 22-30 x 5-8 (24,7 \pm 2,9 x 6,6 \pm 0,9)	OBv, EL 8-12 x 5,5-7,7 (10,1 \pm 1,4 x 6,5 \pm 0,7)	PO - próximos ao nó
EU073835	dioico ♀	DO, ES	474-668 (544,7 \pm 44,8)	13-17 (14,1 \pm 1,3)	CI 28-36,5 x 7,3-10 (31,5 \pm 3,6 x 8,5 \pm 1,1)	OBv, EL 8-12 x 4,6-8 (10,1 \pm 1 x 5,8 \pm 1,6)	\pm NU - 2/3 do internó
EU073841	dioico ♂ e ♀	DO, ES, OBc	360-490 (419,6 \pm 37,8)	9-12 (10 \pm 0,9)	CI 25-33 x 7-12 (28,4 \pm 2,6 x 10,1 \pm 1,5)	OBv, EL 7-11 x 4,5-6,5 (8,7 \pm 1 x 5,3 \pm 0,7)	PO - próximos ao nó
Médias							
Média linhagem A	dioico ♀	DO, ES	280-860 (509,9 \pm 153,6)	8-18 (12,2 \pm 3,3)	CI 18-38 x 5,5-17,6 (28,5 \pm 6,9 x 9,9 \pm 3,8)	OBv, EL 7,2-12 x 4-6,8 (9,8 \pm 1,1 x 5,4 \pm 0,9)	PO - próximos ao nó
Média linhagem B	dioico ♂ e ♀	DO, ES, OBc, Pi	360-940 (551,9 \pm 140,3)	8-19 (12,4 \pm 2,6)	CI 22-50 x 5-12 (31,4 \pm 6,6 x 8,2 \pm 1,4)	OBv, EL 4,6-12 x 4-8,6 (8,5 \pm 1,6 x 5,7 \pm 1,1)	PO a NU

Tabela 4. Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* de amostras dos E.U.A. Códigos das amostras conforme Tabela 2. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). OBv: obovoide; PI: piriforme.

Amostra	Carpogônio (comp. x larg.)	Carposporófito (larg. x alt.)	Carposporângio		No. células filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio (diâmetro)
			dimensões	forma		
Linhagem A						
AF244110 / EU073847	32,6-49,3 x 7-9,6 (42 \pm 5 x 8,1 \pm 1)	146-256 x 83-150 (193,2 \pm 25 x 104,2 \pm 14,7)	17-22,7 x 8,3-10,3 (19,7 \pm 1,7 x 9,4 \pm 0,6)	OBv, PI	3-4 (3,4 \pm 0,5)	---
AF244117 / EU073846	30-55 x 4-8,6 (41,8 \pm 5,8 x 6 \pm 1,4)	130-297 x 105-200 (201,5 \pm 53,7 x 137,9 \pm 25,5)	18-24 x 8-12 (20,1 \pm 1,8 x 10,1 \pm 1,2)	OBv, PI	3-4 (3,4 \pm 0,5)	---
Linhagem B						
AF244111 / EU636733	45-66 x 5,5-7,5 (54,5 \pm 5,7 x 6,3 \pm 0,7)	156-284 x 71-150 (218 \pm 35,9 x 104,7 \pm 19,8)	15-18,5 x 7,5-10,2 (16,8 \pm 1,1 x 9 \pm 0,8)	OBv, PI	3-4 (3,7 \pm 0,5)	---
AF244115 / EU073839	50-65 x 5,5-7,5 (58,1 \pm 4,9 x 6,2 \pm 0,5)	---	---	---	---	4,4-6 (4,9 \pm 0,4)
AF244118 / EU073845	47,8-65 x 5,5-7 (55,3 \pm 4 x 6,1 \pm 0,4)	157,6-391 x 75-246 (227,4 \pm 85,1 x 119,6 \pm 55,6)	19-20,1 x 10,5-11,3 (19,3 \pm 1,1 x 11 \pm 0,6)	OBv, PI	3-5 (4 \pm 0,5)	---
AF244119 / EU073836	40-75 x 5-8,5 (57,7 \pm 9,3 x 6 \pm 0,9)	---	---	---	---	4,5-6 (5,2 \pm 0,5)
AF244120 / EU636736	56,5-77 x 5,6-7 (64,4 \pm 6 x 6,4 \pm 0,4)	---	---	---	---	---
AF029142	43-60 x 5-7 (54 \pm 4,6 x 6 \pm 0,7)	161-230 x 80-132 (194,6 \pm 21,8 x 109 \pm 14,4)	15-23,6 x 6-10 (18 \pm 2,1 x 8 \pm 1,2)	OBv, PI	4-5 (4,6 \pm 0,5)	4-8 (5,6 \pm 1,6)
EU073835	50-74,5 x 5,4-9 (62,5 \pm 6,6 x 6,8 \pm 0,9)	---	---	---	---	-

Tabela 4 (continuação). Caracteres taxonômicos dos espécimes da seção *Virescentia* de amostras dos E.U.A. Códigos das amostras conforme Tabela 2. Para os dados numéricos os valores representam amplitude de variação (linha superior) e média \pm desvio-padrão (linha inferior). OBv: obovoide; PI: piriforme.

Amostra	Carpogônio (comp. x larg.)	Carposporófito (larg. x alt.)	Carposporângio		No. células filamentos Gonimoblásticos	Espermatângio (diâmetro)
			dimensões	forma		
EU073841	45-60 x 6-9 (53,3 \pm 4,4 x 7,5 \pm 0,8)	195-296 x 75-130 (231,9 \pm 29 x 99,9 \pm 13,3)	17-24 x 10-12 (20,5 \pm 2 x 10,8 \pm 0,9)	OBv, Pi	3-5 (4,2 \pm 0,6)	---
Médias						
Média linhagem A	30-55 x 4-9,6 (41,5 \pm 5,4 x 6,9 \pm 1,6)	130-297 x 83-200 (197,5 \pm 42,1 x 121,6 \pm 27)	17-24 x 8-12 (20-1,7 x 9,8 \pm 1)	OBv, PI	3-4 (3,4 \pm 0,5)	---
Média linhagem B	40-77 x 5-9 (58 \pm 7 x 6,4 \pm 0,8)	156-391 x 71-246 (216,6 \pm 45,4 x 107,1 \pm 27,3)	15-24 x 6-12 (18,5 \pm 2,1 x 9,6 \pm 1,5)	OBv, PI	3-5 (4,1 \pm 0,6)	4-8 (5,2 \pm 1,1)

10) *Batrachospermum* sp.2 (Região Paleártica, Japão) (Figs. 10a-e).

DESCRIÇÃO: Plantas monoicas, dioicas ou polioicas; verticilos contíguos ou separados, esféricos, doliformes ou piriformes, 635,0–1130,0 μm de diâmetro; fascículos primários abundantemente ramificados, 10–14 células; células proximais cilíndricas, 22,0–36,0 μm de comprimento e 6,0–8,0 μm de diâmetro, células distais elípticas, 13,0–16,0 μm de comprimento e 4,0–6,0 μm de diâmetro; fascículos secundários variando de poucos e esparsos a abundantes e sobre todo internó; espermatângios esféricos, 7,0 μm de diâmetro; ramo carpogonial reto, curto a longo, com 20,0–35,0 μm de comprimento e 4–8 células, filamentos involucrais numerosos, com células cilíndricas ou isodiamétricas e envolvendo o carpogônio; carpogônios com 50,0–75,0 μm de comprimento e 7,0–10,0 μm de diâmetro na base, com tricogínio pedicelado e claviforme ou cilíndrico; carposporófitos esféricos ou semiesféricos, menores que o raio do verticilo, 1–2 por verticilo, 165,0–290,0 μm de diâmetro e 100,0–180,0 μm de altura; filamentos gonimoblásticos com 3–4 células cilíndricas; carposporângios obovoides, 18,0–26,0 μm de comprimento e 10,0–12,4 μm de diâmetro.

DISTRIBUIÇÃO: No Japão, *B. helminthosum* (como circunscrito por Sheath et al., 1994) foi reportada para várias localidades como *B. graibussoniense*, *B. bruziense*, *B. coerulescens*, *B. helminthosum*, *B. testale*, *B. virgatum*, e/ou *B. sirodotii* (MORI, 1975; KUMANO, 1977, 1993)

COMENTÁRIOS: Assim como a espécie *Batrachospermum* sp.1, a espécie em questão também foi previamente identificada como *B. helminthosum* por Hanyuda et al.

(2004) em um estudo com espécimes do Japão e, aqui, foi então tratada como *Batrachospermum* sp.2. Esta espécie não apresentou nenhuma clara diferença morfológica com as espécies *B. viride-brasiliense* e *Batrachospermum* sp1, mas as análises moleculares com base no gene *rbcL* apresentaram divergência de 1,9–5,1% (24–66 pb).

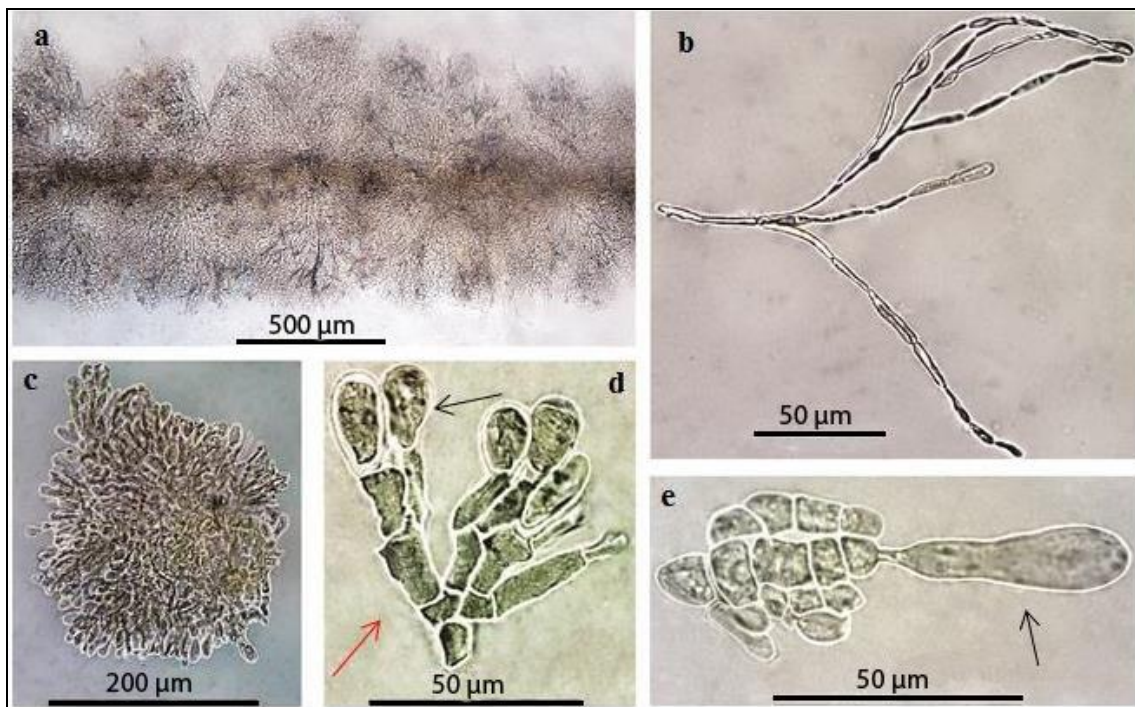


Figura 10. Caracteres morfológicos de *Batrachospermum* sp.2. (a) Verticilos. (b) Fascículo primário. (c) Carposporófito. (d) Carposporângios (seta preta) e filamentos gonimoblásticos (seta vermelha). (e) Carpogônio com um tricogínio bem desenvolvido (seta).

4. Discussão

Muitas das observações de Sirodot (1884) guiaram os estudos taxonômicos do gênero *Batrachospermum* até os dias atuais, sendo que várias das entidades taxonômicas descritas são reconhecidas até hoje (KUMANO, 2002). Grande parte da diversidade taxonômica de algas vermelhas de águas continentais está na ordem Batrachospermales. Essa ordem inclui os gêneros *Batrachospermum*, *Sirodotia*, *Tuomeya*, *Lemanea* and *Paralemanea* (KUMANO, 2002) e mais recentemente *Kumanoa* (ENTWISLE et al., 2009), *Sheathia* (SALOMAKI et al., 2014) e *Setacea* (ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016). O gênero *Batrachospermum* é reconhecido como parafilético desde os primeiros estudos moleculares da ordem e, atualmente, investigações tendem a descrever novos gêneros a partir das seções de *Batrachospermum* (ENTWISLE et al., 2009; SALOMAKI et al., 2014). Interessantemente, muitas das seções que estão sendo elevadas para o nível de gênero foram aquelas circunscritas por Sirodot (*Helminthoidea*, *Hybrida*, *Setacea* e *Virescentia*).

Como observado na árvore filogenética gerada para o gene *rbcL* (Capítulo 1, Figura 1) envolvendo espécies que representam o máximo possível a diversidade conhecida para a ordem Batrachospermales, os grupos mais proximamente relacionados à seção *Virescentia* apresentam diferenças morfológicas claras, que são brevemente comentadas a seguir. Necchi (1990) e Necchi & Entwisle (1990) propuseram que espécies de *Batrachospermum* previamente classificadas na seção *Setacea* (recentemente elevada ao nível de gênero – ROSSIGNOLO & NECCHI, 2016) fossem adicionadas à seção *Virescentia*. Ambos os grupos apresentam ramos carpogoniais retos, com poucas e curtas células, originando-se próximos ao eixo principal

(STARMACH, 1977; SHEATH et al., 1993b; SHEATH et al., 1994). Sheath et al. (1994a) rejeitaram a unificação das duas seções apenas com base nos dados morfológicos. Deve-se notar que verticilos reduzidos podem ocorrer ainda em outros grupos de Batrachospermales, como o gênero *Kumanoa* (NECCHI & VIS, 2012) e o grupo Australasica (VIS & ENTWISLE, 2000; NECCHI & VIS, 2012; VIS et al., 2012). A seção *Macrospora* apresenta-se mais proximamente relacionada à seção *Virescentia*). Considerado grupo-irmão da seção *Virescentia*, a seção *Macrospora* é reconhecida com base na presença de células terminais nos ramos carpogoniais dispostas em coroa e carposporângios de grandes dimensões (KUMANO 2002; ENTWISLE et al., 2009).

No presente estudo, o exame dos tipos nomenclaturais, bem como de amostras críticas na história do grupo, permitiu reconhecer 10 espécies para a seção *Virescentia* com base em caracteres morfológicos diagnósticos e distribuição biogeográfica. Os principais caracteres considerados como diagnósticos na seção foram: arranjo dos fascículos primários e secundários (retos x curvos e ramificados unilateralmente); abundância de fascículos secundários (poucos e esparsos x abundantes e sobre maior parte do interno), arranjo do ramo carpogonial (reto x curvo; número de células; comprimento do ramo), filamentos involucrais (unilaterais x abundantes sobre todo ramo carpogonial), comprimento do carpogônio, formato do tricogínio (pedicelado x indistintamente pedicelado; claviforme x cilíndrico x obcônico) e dimensões dos carposporófitos. Estes caracteres diagnósticos permitiram distinção inequívoca para a maioria das espécies da seção e concordam com trabalhos relevantes para a seção (SIRODOT, 1884; ISRAELSON, 1942; MORI, 1975; STARMACH, 1977; KUMANO, 1979).

Notamos ausência de disjunção clara nos caracteres morfológicos diagnósticos para distinção entre *B. viride-brasiliense*, *B. helminthosum*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum* sp.1 e *Batrachospermum* sp.2, o que sugere que a aplicabilidade destes caracteres não é universal para todas as espécies do grupo. Estas espécies foram reconhecidas por diferenças genéticas e biogeográficas, as quais foram altas e com disjunção evidente entre elas. Diferenças morfológicas entre duas espécies só tornam-se evidentes, muitas vezes, após decorrido tempo suficiente desde a divergência da linhagem e, portanto, as espécies recentemente divergentes podem permanecer não detectáveis (crípticas). A evolução morfológica convergente, a estase morfológica, a plasticidade fenotípica e o polimorfismo são fenômenos comuns em vários grupos de algas (VERBRUGGEN et al., 2009). Estudos filogenéticos moleculares revelaram numerosos casos de espécies distintas de grupos específicos de algas que são morfolologicamente indistinguíveis (ZUCCARELLO & WEST, 2003; DE CLERCK et al., 2005; KUCERA & SAUNDERS, 2012; PAYO et al., 2013).

A grande amplitude de variação dos caracteres nas amostras de *Batrachospermum* sp.1 sugere a existência de mais de uma espécie na região Neártica, indicação que é corroborada pelas análises com base nas sequências de *rbcL* e *cox1* e “mini-barcode”, em que se nota a presença de clados menores claramente separados. A árvore de *rbcL* indica ainda a existência de pelo menos mais um clado adicional para sequências de *Batrachospermum* sp.2, além da existência de haplótipo divergente (sequência AB114646).

Chiasson et al. (2003), visitaram a região de Rennes (França), onde Sirodot coletou os espécimes-tipo de seu trabalho. Foram coletadas cinco espécies envolvendo os gêneros *Batrachospermum* e *Sheathia* (*B. gelationosum*, *B. helminthosum*, *B. turfosum*, *B. vogesiacum* e *Sheathia confusa*). Estes autores analisaram estas espécies

com base em dados morfológicos e moleculares e reconheceram *B. vogesiacum* e *B. helminthosum* da seção *Virescentia* como espécies distintas.

Algumas espécies reconhecidas para a seção (*B. azeredoi* e *B. ferreri*) careciam de revisão, pois foram baseadas principalmente nas características da fase “Chantransia”, consideradas atualmente desprovidas de significado taxonômico (ISRAELSON, 1942; MORI, 1975; NECCHI & OLIVEIRA, 2011). Esse estágio corresponde à fase tetrasporofítica do histórico de vida de membros das Batrachospermales e Thoreales (NECCHI & ZUCCHI, 1997; PUESCHEL et al., 2000; ZUCCHI & NECCHI, 2003)

Foram reconhecidas dez espécies para a seção com base em caracteres morfológicos: *B. bakarensis*, *B. crispatum*, *B. gombakense*, *B. gulbenkianum*, *B. transtaganum*, *B. helminthosum*, *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum* sp.1, *Batrachospermum* sp.2.

O tipo nomenclatural de *B. desickachary* não foi localizado nos herbários da Índia e o status taxonômico desta espécie não pôde, portanto, ser reavaliado. Das dez espécies reconhecidas, cinco puderam ser propostas ou confirmadas com base na divergência genética de dois marcadores moleculares (*rbcL* e *cox1*).

Em síntese, análises morfológicas e, principalmente, moleculares de material europeu (espécimes-tipo ou topótipos), de onde foram descritas a maioria das espécies da seção, são necessárias para melhor entendimento das relações filogenéticas e definição das espécies dentro da seção *Virescentia*.

5. Referências

- AGOSTINHO, D. C.; NECCHI, O. J. Systematics of the section *Virescentia* of the genus *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Brazil. **Phycologia**, v. 53, n. 6, p. 561-570, 2014.
- BRAND, F. Über *Batrachospermum*. **Bot. Centralbl.**, v. 61, 1895.
- CHIASSON, W. B.; MACHESKY, N. M.; VIS, M. L. Phylogeography of a freshwater red alga, *Batrachospermum helminthosum* (Rhodophyta), in North America. **Phycologia**, p. 42:654–60, 2003.
- CHIASSON, W. B.; SALOMAKI, E. D.; VIS, M. L. New Collections of Freshwater Red Algae (Batrachospermales, Rhodophyta) from Historically Important Areas in France. **Cryptogamie, Algologie**, v. 35, n. 3, p. 303-316, 2014/08/01 2014a.
- CHIASSON, W. B.; SALOMAKI, E. D.; VIS, M. L. New Collections of Freshwater Red Algae (Batrachospermales, Rhodophyta) from Historically Important Areas in France. **Cryptogamie, Algologie**, v. 35(3), p. 303-316, 2014b.
- DE CLERCK, O.; GAVIO, B.; FREDERICQ, S.; BARBARA, I.; 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, p. 391-410, 2005.
- ELORANTA, P.; ELORANTA, A.; PERÄMÄKI, P. Intensive study of freshwater red algae (Rhodophyta) in Finland. **Fottea**, v. 16, n. 1, p. 122-132, 2016.
- ELORANTA, P.; KWANDRANS, J.; KUSEL-FETZMANN, E. **Süßwasserflora Von Mitteleuropa, Bd. 7 / Freshwater Flora of Central Europe, Vol. 7: Rhodophyta and Phaeophyceae.** Heilderberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2011. ISBN 9783827420510.
- 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.; 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.
- FLINT, L. H. Studies of fresh-water red Algae. **Am J Bot**, v. 35, n. 7, p. 428-33, Jul 1948.
- FLINT, L. H. Fundamental lengths and masses of fundamental particles. **Nature**, v. 166, n. 4209, p. 30, Jul 1 1950.

- HANYUDA, T.; SUZAWA, Y.; SUZAWA, T.; ARAI, S.; SATO, H.; UEDA, K. Biogeography and taxonomy of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Japan inferred from *rbcl* gene sequences. **J. Phycol.**, v. 40, p. 581–8, 2004.
- HYLANDER, C. J. **The Algae of Connecticut**. 245 p. incl. XXVIII pl. Ph. D Yale University, Hartford,. 1928.
- ISRAELSON, G. **The freshwater Florideae of Sweden**. Uppsala,: A.-b. Lundequistska bokhandeln, 1942. 135 p.
- KUCERA, H.; SAUNDERS, G. W. A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity. **J. Phycol.** , v. 48, p. 869-882, 2012.
- KUMANO, S. Rhodophyceae. In: HIROSE, H. e YAMAGISHI, T. (Ed.). **Illustrations of the Japanese Freshwater Algae**. Japan: Uchidarokakuho-shinsha, 1977. p.157–75.
- KUMANO, S. **Studies on the taxonomy and the phylogenetic relationships of the Batrachospermaceae of Japan and Malaysia**. 138 (Doctorate Thesis). Kyoto University 1979.
- KUMANO, S. Taxonomy of the family Batrachospermaceae (Batrachospermales, Rhodophyta). **The Japanese Journal of Phycology**, v. 41, p. 253–272, 1993.
- KUMANO, S. Freshwater red algae of the world. **Bristol, Biopress Ltd**, p. 375 p, 2002.
- KUMANO, S.; RATNASABAPATHY, M. Studies on freshwater red algae of Malaysia II. Three species of *Batrachospermum* from Sungai Gombak and Sungai Pusu, Selangor, West Malaysia. **Journal of Phycology**, v. 30, p. 15-22, 1982.
- KUMANO, S.; RATNASABAPATHY, M. Studies on freshwater red algae of Malaysia IV. *Batrachospermum bakarensense*, sp. Nov. from Sungai Bakar, Kelantan, West Malaysia. **The Japanese Journal of Phycology**, v. 32, p. 19-23, 1984.
- KYLIN, H. Studien uber die Schwedischen Arten der Gattungen *Batrachospermum* Roth und *Sirodotia* nov. gen. . **Nova Acta Soc. sci. upsal.**, v. 3, p. 1-40, 1912.
- LAM, D. W.; ENTWISLE, T. J.; ELORANTA, P.; KWANDRANS, J.; VIS, M. L. Circumscription of species in the genus *Sirodotia* (Batrachospermales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. **European Journal of Phycology**, v. 47, n. 1, p. 42-50, 2012/02/01 2012.
- MORI, M. Studies of the genus *Batrachospermum* in Japan. **Jap. J. Bot**, v. 20, p. 461–84, 1975.
- MOUL, E. T.; BUELL, H. F. Algae of the Pine Barrens. In: FORMAN, R. T. T. (Ed.). **Pine Barrens: Ecosystem and Landscape**: Academic Press, New York, 1979. p.425-40.

NECCHI, O.; OLIVEIRA, M. C. Phylogenetic affinities of “Chantransia” stages in members of the Batrachospermales and Thoreaales (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 680-686, 2011.

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.; 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 ;.

NECCHI, O. J.; ZUCCHI, M. R. *Audouinella macrospora* (Acrochaetiaceae, Rhodophyta) is the Chantransia stage of *Batrachospermum* (Batrachospermaceae). **Phycologia**, v. 36, n. 3, p. 220-224, 1997.

PAYO, D. A.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; D'HONDT, S.; CALUMPONG, H. P.; DE CLERCK, O. Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. **Proc. R. Soc. B**, v. 280, 2013.

PUESCHEL, C. M.; SAUNDERS, G. W.; WEST, J. A. Affinities of the freshwater red alga *Audouinella macrospora* (Florideophyceae, Rhodophyta) and related forms based on ssu rRNA gene sequence analysis and pit plug ultrastructure. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 2, p. 433-440, 2000.

REIS, M. P. *Batrachospermum gulbenkianum*, sp. nov. **Anuário da Sociedade Broteriana**, v. 31, p. 31-45, 1965.

REIS, M. P. Duas espécies novas de *Batrachospermum* Roth: *B. azeredoi* e *B. ferreri*. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 41, p. 167-189, 1967.

REIS, M. P. Chaves para a identificação das espécies portuguesas de *Batrachospermum* Roth. **Anu. Soc. Brot.**, v. 40, p. 37-129, 1974.

SALOMAKI, E. D.; KWANDRANS, J.; ELORANTA, P.; VIS, M. L. Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. **J Phycol**, v. 50, n. 3, p. 526-42, Jun 2014.

SCHUMACHER, G. J.; WHITFORD, L. A. Additions to the fresh-water algae in North Carolina. **J. Elisha Mitchell Sci. Soc.**, p. 77:274-80, 1961.

SHEATH, R.; BURKHOLDER, J. Characteristics of softwater streams in Rhode Island II. Composition and seasonal dynamics of macroalgal communities. **Hydrobiologia**, v. 128, n. 2, p. 109-118, 1985/09/01 1985.

SHEATH, R. G.; HAMBROOK, J. A. Mechanical adaptations to flow in freshwater red algae. **Journal of Phycology**, v. 24, n. 1, p. 107-111, 1988.

SHEATH, R. G.; MORISON, M. O.; COLE, K. M.; VANALSTYNE, K. L. A new species of freshwater Rhodophyta, *Batrachospermum carpocontortum*. **Phycologia**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 1986/09/01 1986.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 2. Chromosome numbers. **J. Phycol.**, p. 32:304-6, 1993a.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 3. Section *Setacea*. **J. Phycol.**, v. 29, p. 719-25, 1993b.

SHEATH, R. G.; VIS, M. L.; COLE, K. M. Distribution and systematics of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America. 4. Section *Virescentia*. **J. Phycol.**, v. 30, p. 108-17, 1994.

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

SIRODOT, S. **Les Batrachospermes, Organisation, fonctions, Développement, Classifications**. Librairie de Académie de Médecine, Paris, 1884.

SKUJA, H. Einiges zur Kenntnis der brasilianischen Batrachospermen. **Hedwigia** v. 71, p. 297-309, 1931a.

SKUJA, H. Untersuchungen über die Rhodophyceen des Süßwassers, I-II. **Arch Protistenk**, v. 74, p. 297-309, 1931b.

SKUJA, H. Die Batrachospermaceen und Lemnaceen Finnlands. **Mem. Soc. Fauna Flora Fenn**, v. 9, 1933a.

SKUJA, H. Untersuchungen über die Rhodophyceen des Süßwassers, III. **Arch Protistenk**, v. 80, p. 357-366, 1933b.

SKUJA, H. Die Süßwasserrhodophyceen der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition. **Arch. Hydrobiol.**, v. 15, p. 603-637, 1938.

SKUJA, H. Eigentümliche morphologische Anpassung eines *Batrachospermum* gegen mechanische Schädigung in fließendem Wasser. **Öst. bot. S.**, v. 116, n. 55-64, 1969.

STARMACH, K. **Phaeophyta – Brunatnice, Rhodophyta – Krasnorosty**. In: starmach, K. & sieminska, J. (eds): Flora słodkowodna Polski 14: 1-445 pp., Polska Akad. Nauk, Warszawa & Krakow., 1977.

STARMACH, K. Some taxa of freshwater red algae (Rhodophyta) from Cuba. **Frag. Flor. Geobot.**, p. 31-32:473-94, 1986-1987.

VERBRUGGEN, H.; VLAEMINCK, C.; SAUVAGE, T.; SHERWOOD, A. R.; LELIAERT, F.; DE CLERCK, O. Phylogenetic analysis of *Pseudochlorodesmis* strains reveals cryptic diversity above the family level in the siphonous green algae (Bryopsidales, Chlorophyta). **J. Phycol.**, v. 45, p. 726-731, 2009.

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.; ENTWISLE, T. J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa. **J. Phycol.**, v. 36, p. 1175-182, 2000.

VIS, M. L.; FENG, J.; CHIASSON, W. B.; XIE, S.-L.; STANCHEVA, R.; ENTWISLE, T. J.; CHOU, J.-Y.; WANG, W.-L. Investigation of the molecular and morphological variability in *Batrachospermum arcuatum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from geographically distant locations. **Phycologia**, v. 49, n. 6, p. 545-553, 2010/11/02 2010.

VIS, M. L.; 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.; SHEATH, R. G. Biogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America based on molecular and morphological data. **J. Phycol.**, v. 33, p. 520-6, 1997.

ZUCCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: Molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans/B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. **J. Phycol.**, v. 39, p. 948-959, 2003.

ZUCCHI, M. R.; NECCHI, O. J. Blue-greenish acrochaetioid algae in freshwater habitats are 'Chantransia' stages of Batrachospermales sensu lato (Rhodophyta). **Cryptogamie, Algologie**, v. 24, p. 117-131, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos através de análises morfológicas e moleculares das sequências de *rbcL* e das regiões de “barcode” e “mini-barcode” de *cox1* de representantes da seção *Virescentia* do gênero *Batrachospermum* em âmbito mundial, podemos concluir que:

- 1) A seção *Virescentia* foi confirmada como grupo monofilético com alto suporte dentro do gênero *Batrachospermum*;
- 2) A seção *Virescentia* deve ser elevada ao nível gênero dentro de *Batrachospermales*, seguindo tendência mais universal dos trabalhos recentes;
- 3) A presença de clados bem definidos, com nítida repartição biogeográfica e associados a uma divergência relativamente alta nas sequências entre estes grupos sugere que as amostras das diferentes regiões do globo correspondem a, pelo menos, cinco espécies distintas: *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *B. helminthosum*, *Batrachospermum* sp1, *Batrachospermum* sp2.
- 4) Foram reconhecidas dez espécies para a seção com base em caracteres morfológicos: *B. bakareense*, *B. crispatum*, *B. gombakense*, *B. gulbenkianum*, *B. transtaganum*, *B. helminthosum*, *B. viride-brasiliense*, *B. vogesiacum*, *Batrachospermum* sp.1, *Batrachospermum* sp.2.

Para melhor elucidar os limites intra e interespecíficos da seção *Virescentia*, identificar com precisão as distintas espécies e definir os critérios morfológicos diagnósticos para separação das espécies da seção, serão necessários novos estudos envolvendo, principalmente, dados moleculares dos espécimes-tipo, de localidades-tipo ou historicamente críticos (descritos no Capítulo 2).