

GISELA SIGNORELLI DE FARIA COELHO

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE UM GRUPO DA FAMÍLIA
SEMATOPHYLLACEAE (BRYOPHYTA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador(a): Dra. Cristine Chaves Barreto.

Co-orientador: Dr. Paulo Eduardo Câmara

Brasília
2012

C672r Coelho, Gisela Signorelli de Faria.

Relações filogenéticas de um grupo da família Sematophyllaceae
(Bryophita). / Gisela Signorelli de Faria Coelho – 2012.

56f. ; il.: 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2012.
Orientação: Profª. Dra. Cristine Chaves Barreto

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Eduardo Câmara

1. Briófitas. 2. Filogenia. 3. Musgo. 4. Plantas análise. I. Barreto, Cristine



Dissertação de autoria de Gisela Signorelli de Faria Coelho, intitulada “RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE UM GRUPO DA FAMÍLIA SEMATOPHYLLACEAE (BRYOPHYTA)” apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 25/06/2012 defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dra. Cristine Chaves Barreto
Orientadora
Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB

Prof. Dr. Paulo Eduardo Câmara
Co-Orientador
Botânica – UnB

Prof. Dra. Micheline Carvalho Silva
Botânica – UnB

Prof. Dra. Bárbara Medeiros Fonseca
Curso de Biologia – UCB

Dedico esse trabalho à minha
família, principalmente aqueles que
não estão mais aqui e aos meus
amigos pelo apoio e incentivo em
todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha imensa e eterna gratidão ao Dr. Paulo Eduardo Câmara, pela orientação, apoio, amizade e pelas incríveis oportunidades que me proporcionou; sem sua ajuda não seria possível terminar esse trabalho.

Agradeço imensamente também ao Prof. Dr. Ruy Caldas, por me proporcionar uma nova oportunidade e não me deixar desistir após os momentos mais difíceis.

À Prof. Dra. Cristine Chaves Barreto, pelo apoio e orientação.

À Dra. Micheline Carvalho Silva, pela imensa ajuda, amizade e solidariedade.

À Prof. Dra. Betânia Quirino, pelos protocolos de purificação.

À Sandy Boles, Lisa Karst e A. Jonathan Shaw, pela experiência incrível no Duke Bryology Lab.

Ao Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, por ceder seu recém inaugurado laboratório na UnB.

Ao Thiago Batista Moreira e Vitor Bonomo, pela ajuda e companhia no laboratório.

À Gláucia Midorikawa pela grande ajuda e compreensão, tanto dentro do laboratório como fora dele.

À Jussara Orlando, Isabelle Lamartine, Milena Hashimura, Manuela Pompeu e Flávia Oliveira, por me ajudar a voltar ao meu eixo.

Um agradecimento mais que especial ao meu cunhado, Fernando Quintans e a minha irmã Juliana Signorelli, por tudo que os dois fizeram por mim.

E à minha família, pelo apoio, carinho, ajuda e compreensão nessa jornada tão difícil.

“Há uma verdadeira grandeza nesta forma de considerar a vida que, juntamente com todas as suas diversas capacidades, teria sido insuflada em poucas formas, ou talvez em uma única, e que enquanto este planeta continua a girar na sua órbita, obedecendo à imutável Lei Gravitacional, as formas mais belas e admiráveis, originárias de um início tão simples, continuam a seguir esse desenvolvimento.”

Charles Darwin

RESUMO

Referência: COELHO, G.S.F. Relações filogenéticas de um grupo da família Sematophyllaceae (Bryophyta). 56 páginas. Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2012.

As Briófitas constituem o segundo maior grupo de plantas terrestres em número de espécies, seguindo-se às plantas vasculares, e são as únicas plantas terrestres com um gametófito dominante. A parafília dos três grupos de Briófitas, com os antóceros como grupo irmão das traqueófitas, seria a hipótese mais bem suportada, que pode ser apoiada em dados morfológicos e moleculares. A ordem Hypnales passou por um período de diversificação relativamente rápido no início de sua história e parece ser caracterizada por linhagens que cresceram exponencialmente. A convergência morfológica é generalizada entre os pleurocarpos. A família Sematophyllaceae é uma das mais difíceis famílias da Divisão Bryophyta. Ela é essencialmente tropical e possui a circunscrição instável. Assim, optou-se pela avaliação de um grupo dentro dessa família, a linhagem-*Sematophyllum*, utilizando-se de dois marcadores moleculares: mitocondrial (*nad5*) e plastidial (*rps4*). Nesse trabalho, 14 novas sequências de *rps4* foram obtidas para 10 espécimes, pertencentes a 5 gêneros, mais 8 novas sequências de *nad5* foram obtidas para 6 espécies, pertencentes a 2 gêneros. O gene *rps4* apresentou-se bastante conservado, enquanto o gene *nad5* apresentou-se bastante variável. É possível observar a formação de um clado chamado de linhagem-*Sematophyllum*. Com base nos dados apresentados, pode-se dizer que o uso de dois marcadores, plastidial e mitocondrial, não é suficiente para se resolver a circunscrição da família Sematophyllaceae.

PALAVRAS-CHAVE: Briófitas, Sematophyllaceae, *rps4*, *nad5*, linhagem-*Sematophyllum*.

ABSTRACT

The Bryophytes are the second largest group of land plants in number of species, followed by vascular plants, and are the only terrestrial plants with a dominant gametophyte. The paraphily of the three groups of bryophytes, with hornworts as sister group of tracheophytes, is the hypothesis that would be better supported, and can be supported by morphological and molecular data. The order Hypnales passed by a period of relatively rapid diversification early in its history, and seems to be characterized by lineages that grew exponentially. The morphological convergence is widespread among pleurocarpous mosses. The family Sematophyllaceae is one of the most difficult families of the Bryophyta division and is essentially tropical. This family has a unstable circumscription, then we decided to evaluate a group within this family, the Sematophyllum-lineage, using two molecular markers: mitochondrial (*nad5*) and plastid (*rps4*). In this study, 16 new *rps4* and *nad5* sequences were obtained for 8 specimens, belonging to 2 genera. The gene *rps4* presented to be very conserved, while gene *nad5* presented to be very variable. In this present study we can observe the formation of a clade called *Sematophyllum*-lineage. Based on the data presented here, it can be said that the use of two markers, plastid and mitochondrial, is not enough to resolve the circumscription of the family Sematophyllaceae.

KEY-WORDS: Bryophytes, Sematophyllaceae, *rps4*, *nad5*, *Sematophyllum*-lineage

SUMÁRIO

1	Revisão Bibliográfica	1
1.1	Importância Ecológica, Econômica e Conservação	6
2	Introdução.....	8
2.1	Filogenia das Briófitas.....	8
3	Sematophyllaceae	12
3.1	A Família Sematophyllaceae.....	12
3.2	Filogenia da Família Sematophyllaceae.....	13
3.3	Marcadores de Uso Recorrente em Briófitas.....	16
4	Justificativas	17
5	Objetivos.....	18
5.1	Objetivo Geral	18
5.2	Objetivos Específicos	18
6	Material e métodos	19
6.1	Plantas Utilizadas	19
6.2	Protocolos Utilizados.....	25
6.2.1	Obtenção do DNA	25
6.2.2	Amplificação	25
6.2.3	Purificação.....	27
6.2.4	Sequenciamento.....	27
6.3	Análise Filogenética	28
7	Resultados.....	29

8	Discussão	40
9	Perspectivas	45
10	Referências bibliográficas	46

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Ciclo de vida com alternância de gerações das Briófitas (Fonte: http://www.cliffsnotes.com/study_guide/A-Typical-Bryophyte-Life-Cycle.topicArticleId-23791,articleId-23760.html).....	1
Figura 2B – Filogenia proposta por MISHLER & CHURCHILL. 1984 e MISHLER et al. 1994.	5
Figura 2D – Filogenia proposta por QUI et al. (2006) e SHAW et al. (2011).	5
Figura 2C – Filogenia proposta por GARBARY & RENZAGLIA. 1998 e MALEK et al. 1996.	5
Figura 2A – Filogenia proposta por GARBARY et al. 1993 e NISHIYAMA et al. 2004.....	5
Figura 4 – Filogenia encontrada por Tsubota et al. (2001a) para a família Sematophyllaceae (Fonte: TSUBOTA et al., 2001a).	14
Figura 5 – Marcador <i>rps4</i> em musgos.....	26
Figura 6 – Marcador <i>nad5</i> para musgos.....	26
Figura 7 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) com todas as sequencias para o gene <i>rps4</i> de Sematophyllaceae. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.	31
Figura 8 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para o gene <i>rps4</i> . As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.	33
Figura 9 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para o gene <i>nad5</i> . As sequências em	

negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.34

Figura 10 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para os genes *rps4* e *nad5* concatenados. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.35

Figura 11 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para o gene *rps4*. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.37

Figura 12 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para o gene *nad5*. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.38

Figura 13 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para os genes *rps4* e *nad5* concatenados. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.39

Figura 14 Filograma de Máxima Parcimônia da Família Sematophyllaceae, com o marcador *rps4*.44

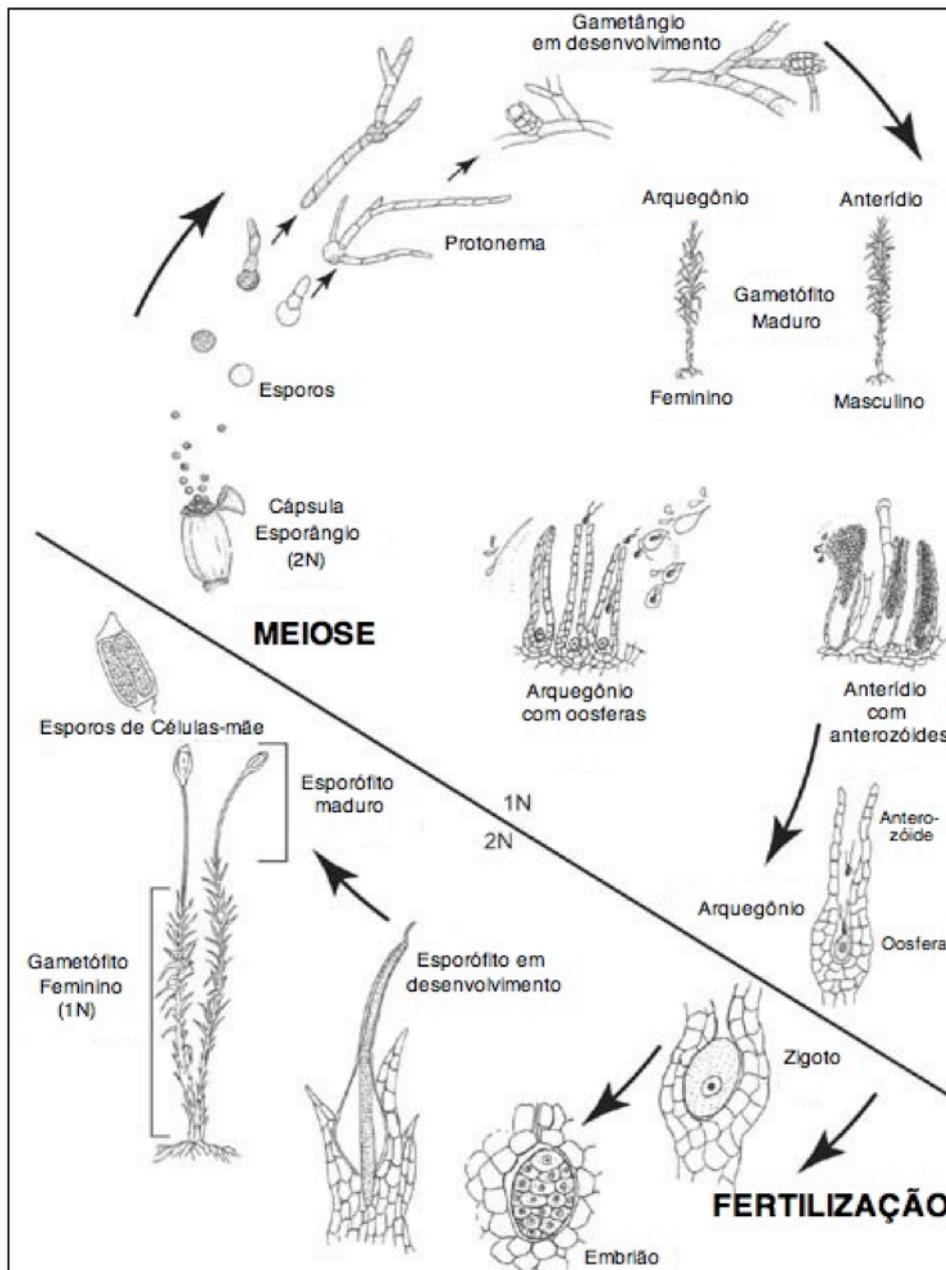
LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características das três linhagens de briófitas.	3
Tabela 2 – Espécies utilizadas na análise preliminar de rps4 com todas as Sematophyllaceae, as espécies destacadas em negrito foram as sequenciadas nesse estudo.	20
Tabela 3 – Características das árvores de Sematophyllaceae (<i>lato sensu</i>).	30
Tabela 4 – Características das árvores da linhagem- <i>Sematophyllum</i>	32
Tabela 5 – Características das árvores do subgrupo dentro da linhagem- <i>Sematophyllum</i>	36

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo 'Briófita' tem sua origem na língua grega, referindo-se às plantas que crescem sobre hidratação. Briófito é o nome genérico dado a plantas caracterizadas por um ciclo de vida que apresenta alternância das gerações haplóides e diplóides com o gametófito dominante (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida com alternância de gerações das Briófitas (Fonte: http://www.cliffsnotes.com/study_guide/A-Typical-Bryophyte-Life-Cycle.topicArticleId-23791,articleId-23760.html).



As briófitas constituem o segundo maior grupo de plantas terrestres em número de espécies (BUCK & GOFFINET, 2000), seguindo-se às plantas vasculares. As briófitas existentes pertencem às três linhagens parafiléticas: hepáticas (Marchantiophyta), musgos (Bryophyta, no sentido estrito) e antóceros (Anthocerotophyta). Essas linhagens compartilham diversas características com as outras plantas terrestres, como o embrião que dá nome a elas (embriófitas), e outros atributos que são únicos, por exemplo, esporófito não ramificado, com um único tecido produtor de esporos, ou esporângio. Como em outras plantas terrestres existentes, o gametófito não possui estômato (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009).

As três maiores linhagens de briófitas se diferenciam por uma variedade de atributos, mais visivelmente na arquitetura do corpo vegetativo (gametófito) e no esporófito (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais características das três linhagens de briófitas.

Característica	<i>Marchantiophyta</i> (Hepática)	<i>Bryophyta</i> (Musgo)	<i>Anthocerotophyta</i> (Antóceros)
Protonema (forma jovem do gametófito)	Protonema muito reduzido	Protonema bem desenvolvido	Sem protonema
	Taloso ou folhoso, com simetria bilateral, alguns talos com câmaras de ar e poros dorsais	Folhoso, geralmente com simetria radial, nunca talosas	Taloso, raramente com simetria bilateral, talos às vezes, com poros ventrais
Gametófito	Numerosos cloroplastos por célula Oleocorpos complexos e numerosos	Numerosos cloroplastos por célula Oleocorpos ausentes	Em geral, um só cloroplasto por célula Oleocorpos ausentes
	Rizóides lisos e unicelulares, talosas com espessamento interno nos rizóides	Rizóides lisos ou externamente papilosos, multicelulares	Rizóides sempre lisos, geralmente unicelulares
Filídios	Filídios dispostos em duas ou três fileiras, frequentemente lobados, costa ausente, células dos filídios alongadas	Filídios dispostos em três ou mais fileiras, raramente lobados, podem apresentar costa ou não, células dos filídios isodiamétricas, com trigônos	Não apresenta filídios
Arquegônio	Perianto ou involúcro envolvendo o arquegônio	Periquécio envolvendo arquegônio	Arquegônios imersos no talo
Paráfises	Paráfises ausentes	Paráfises, em geral, presentes	Paráfises ausentes
Esporófito	Seta incolor, de vida curta, crescimento determinado	Seta pigmentada, persistente, crescimento determinado	Seta ausente, crescimento indeterminado
	Caliptra na base do esporófito maduro	Caliptra no ápice do esporófito	Camada de revestimento na base do esporófito maduro, às vezes apical em esporófito jovem
Esporângio	Deiscência do esporângio por 4 fendas longitudinais, com elatérios	Esporângio abrindo-se por queda do opérculo, sem elatérios	Deiscência do esporângio por 1 ou 2 fendas longitudinais, com elatérios ou pseudoelatérios
	Sem columela	Columela geralmente presente	Columela presente

Na verdade, as briófitas são as únicas plantas terrestres com um gametófito dominante, apresentando uma diversidade morfológica sem paralelo com as traqueófitas (CRUM, 2001). Essa característica foi considerada, por muito tempo, como indicativo de um único ancestral comum, mas dependendo dos dados utilizados, como por exemplo dados da ultraestrutura dos anterozóides (GARBARY et al. 1993) e dados do genoma completo do cloroplasto (NISHIYAMA et al. 2004) podem mostrar que os três grupos fazem parte de uma linhagem parafilética (Figura 2A). As briófitas não possuem tecido vascular lignificado e conseqüentemente possuem poucos registros fósseis, mas análises filogenéticas dos caracteres morfológicos e moleculares indicam que elas são uma das primeiras ramificações de plantas terrestres (MISHLER & CHURCHILL, 1984; KENRICK & CRANE, 1997; BECKERT et al., 1999; NICKRENT et al., 2000; RENZAGLIA et al., 2007; SHAW et al., 2011).

Essa relação de parafilia é apontada com base na morfologia, fisiologia e dados bioquímicos (MISHLER & CHURCHILL, 1984). Em seguida, posteriormente apoiada por dados de sequências moleculares, Mishler et al. (1994), colocaram os musgos como grupo irmão das traqueófitas (Figura 2B). Utilizando-se dados morfológicos do esporófito (GARBARY & RENZAGLIA, 1998) e dados da sequência do gene mitocondrial *cox3* (MALEK et al. 1996), os três grupos novamente aparecem parafiléticos e o grupo irmão das traqueófitas são as hepáticas (Figura 2C). A parafilia dos três grupos, colocando os antóceros como grupo irmão das traqueófitas (Figura 2D) é apoiada por Qui et al. (2006) e Shaw et al. (2011), que usou dados de sequências de cloroplasto, mitocôndria e núcleo de mais de cem táxons.

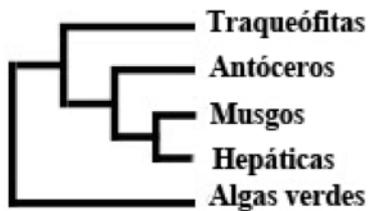


Figura 2A – Filogenia proposta por GARBARY et al. 1993 e NISHIYAMA et al. 2004.

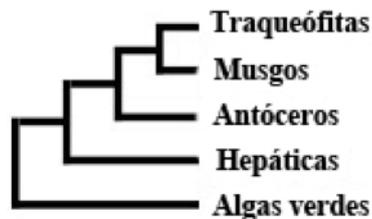


Figura 2B – Filogenia proposta por MISHLER & CHURCHILL. 1984 e MISHLER et al. 1994.

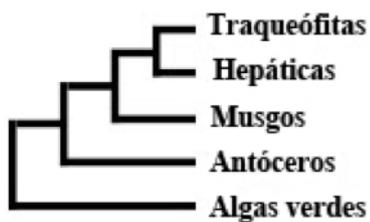


Figura 2C – Filogenia proposta por GARBARY & RENZAGLIA. 1998 e MALEK et al. 1996.

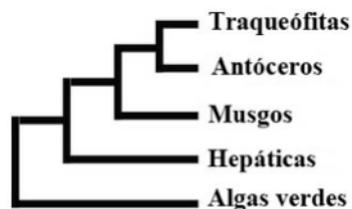


Figura 2D – Filogenia proposta por QUI et al. (2006) e SHAW et al. (2011).

Segundo Shaw et al. (2011) e Qui et al. (2006), a hipótese de parafilía em que os antóceros são o grupo irmão das traqueófitas (Figura 2D), seria a mais bem suportada para se trabalhar as relações das primeiras plantas terrestres. Para Qui et al. (2006) essa posição dos antóceros, como grupo irmão das traqueófitas, é a hipótese menos polêmica, por ser apoiada em dados morfológicos e moleculares.

1.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, ECONÔMICA E CONSERVAÇÃO

As briófitas ocorrem em praticamente todos os ecossistemas da Terra, exceto em água salgada, o que levanta questões sobre seu significado ecológico. Elas contribuem com uma proporção substancial da biomassa dos ecossistemas globais, e também desempenham um importante papel no ciclo de nutrientes. As briófitas são poiquilohídricas, ou seja, são capazes de ressecarem, ficarem ‘dormentes’ sem danificar seu conteúdo protoplasmático, e em seguida retomar a atividade fisiológica quando reidratadas, tolerando períodos mais longos de estresse hídrico que as plantas vasculares. As briófitas também apresentam um importante papel na formação dos solos, criando um habitat que facilita o crescimento de plantas vasculares e, em alguns casos, podem evitar o crescimento de plantas exóticas no processo de recolonização do solo. Elas também podem servir de abrigo para uma vasta gama de microorganismos e servir de fonte de alimentação para alguns invertebrados. São também ótimas bioindicadoras, tanto de solo, como da atmosfera e da água (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009; BATES, 2009; DeLUCIA et al., 2003; DE LUCA et al., 2002; ANDRADE & NOBEL, 1997; PROCTOR, 2009; TURETSKY, 2003; ELDRIDGE, 1998; JONGMANS et al., 2001; ZAMFIR, 2000; MORGAN, 2006; MERRIFIELD & INGHAM, 1998; PECK, 2006; LONGTON, 1992; PARKER et al., 2007; BATES, 1993; DELFANTI et al., 1999; GIOVANI et al., 1994; OTERO et al., 2008; SIEBERT et al., 1996).

Os principais interesses econômicos das briófitas são na produção de combustíveis e na horticultura. Elas também apresentam grande potencial para limpeza de lixo tóxico, na construção de casas e mobílias, além de serem muito usadas também na tradicional medicina chinesa. E durante a última década, mais de 400 novos compostos químicos foram isolados de briófitas e tiveram sua estrutura elucidada (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009; GLIME, 2007; SAXENA & HARINDER, 2004; FRAHM, 2004; TAN, 2003; PANT & TEWARI, 1990; ASAKAWA, 2007).

As principais mudanças ambientais que as briófitas enfrentam preocupam cada vez mais os pesquisadores envolvidos com a sua conservação. Devido ao seu diminuto tamanho, elas foram negligenciadas por anos, mas houve atualmente um aumento na conscientização de se incluir as criptógamas em geral, e briófitas em particular, nos programas de conservação (CLEAVITT, 2005). Elas podem sofrer

ameaças diretas, como a colheita para fim comercial, tanto na produção de combustíveis como na horticultura, e ameaças indiretas, como destruição, degradação e fragmentação de seu habitat. As briófitas localmente apresentam um nível de riqueza comparável, ou até mesmo maior, que às angiospermas. Em uma escala mundial, menos de 1% das briófitas são incluídas na lista vermelha da IUCN de 2011. Essa lista ainda não é abrangente e a condição de “endêmica restrita” impede a inclusão de espécies realmente raras, mas bem dispersas. (HYLANDER & JONSSON, 2007; VANDERPOORTEN & HALLINGBÄCK, 2009; BERLUNG & JONSSON, 2001; PHARO & BLANKS, 2000; SÉRGIO *et al.*, 2000; PHARO *et al.*, 2005; CLEAVITT, 2005; IUCN 2011; SHAW, 2001).

2 INTRODUÇÃO

2.1 FILOGENIA DAS BRIÓFITAS

A sistemática de briófitas teve seu nascimento após a adoção de técnicas para extração do sinal filogenético carregado pelos caracteres moleculares. A extração de DNA, a análise RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o método de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tiveram sua entrada nos laboratórios de briologia de forma lenta (GOFFINET & BUCK, 2004), somente após as técnicas se tornarem rotineiramente aplicadas em laboratórios de micologia e de plantas vasculares. Esse começo tardio, em meados da década de 90, pode ser explicado pela dificuldade de cultivo das briófitas em laboratório e da necessidade, pelo menos nos protocolos de extração mais antigos, de uma grande quantidade de tecido, um requisito não muito fácil de ser satisfeito pela maioria das briófitas. Agora, pequenas quantidades (na ordem de alguns miligramas) podem ser satisfatórias para render DNA suficiente como molde para uma amplificação bem sucedida (GOFFINET & BUCK, 2004).

Entretanto, os primeiros estudos filogenéticos que incluíram sequências de DNA de briófitas foram publicados apenas em meados dos anos 80 (HORI et al., 1985), e levaram mais sete anos para que os projetos de pesquisa fossem publicados (MISHLER et al., 1992, WATERS et al., 1992). Seguiu-se um novo período de latência, até que o campo da filogenia molecular atraísse o interesse dos pesquisadores da briologia.

Nos últimos anos, o interesse na filogenia dos musgos vem aumentando, primeiramente em resposta ao uso das sequências de DNA na sistemática (BUCK et al., 2000b). Através disso, muitas evidências vêm sendo acumuladas na filogenia de briófitas, expandindo o conhecimento na área, como resultado do desenvolvimento de técnicas moleculares. Inicialmente, os dados sequenciados eram utilizados para explorar as linhas de diversificação das briófitas (MISHLER et al., 1992; WATERS et al., 1992; CAPESIUS, 1995). Mais tarde, sequências de DNA foram aplicadas para inferir relações de nível inferior, como a delimitação de ordens, famílias e subfamílias, dando um enfoque maior na elucidação das relações filogenéticas entre as linhagens mais abrangentes das briófitas como, por exemplo, o grupo de musgos pleurocárpicos ou até mesmo de ordens (TSUBOTA et al., 1999; BUCK et al., 2000a;

DE LUNA et al., 2000; TSUBOTA et al., 2002; SHAW et al., 2003; BUCK et al., 2004).

As briófitas, que incluem os musgos e seu aliados, as hepáticas e antóceros, são separadas em três divisões: Divisão Marchantiophyta (hepáticas), Divisão Anthocerotophyta (antóceros) e Divisão Bryophyta (musgos) (Figura 3A). Existem oito classes dentro da divisão Musci, segundo o sistema de classificação de Goffinet & Buck (2004) (Figura 3B), são elas: Takakiopsida, Sphagnopsida, Andreaeopsida, Andreaobryopsida, Oedipodiopsida, Polytrichopsida, Tetrarhizopsida e Bryopsida. Bryopsida, ou os “musgos verdadeiros”, incluem mais de 90% da riqueza de musgos, em termos de número de espécies (SCHOFIELD, 1985; CRUM, 2001; GOFFINET & SHAW, 2009). Dentro da classe Bryopsida, há os musgos pleurocárpicos, que são aqueles que produzem o periquécio nas laterais dos ramos primários ou secundários de modo que o ramo principal tem a célula apical livre, o que permite crescimento contínuo (LA FARGE-ENGLAND, 1996). A monofilia dos musgos pleurocárpicos é fortemente sustentada por sequências de DNA do núcleo, do cloroplasto e da mitocôndria (DE LUNA et al., 1999; NEWTON et al., 2000; GOFFINET et al., 2001; COX et al., 2004; BUCK et al., 2005; MERGET & WOLF, 2010), e o clado é consistentemente resolvido como uma derivação relativamente recente dentro das Bryopsida (SHAW et al., 2001). Até os anos 2000, as três ordens de pleurocárpicos eram distinguidas como: Hookeriales, Leucodontales e Hypnales (Figura 3C). Buck et al. (2000a) mostraram que a Ordem Leucodontales é polifilética, o que fez com que uma parte das famílias pertencentes a essa ordem fossem transferidas para a Ordem Hypnales e a outra parte transferida para a Ordem Ptychomniales (Figura 3C). Buck et al. (2004) constataram, com base em sequências nucleares (*26S, rDNA*), plastidiais (*rps4, trnL-trnF*) e mitocondriais (*nad5*) que Ptychomniales é grupo irmão de Hypnales e Hookeriales. As Hypnales contam com cerca de 80% de todos os musgos pleurocárpicos, e quase 40% de todas as espécies de briófitas (CROSBY et al. 2000).

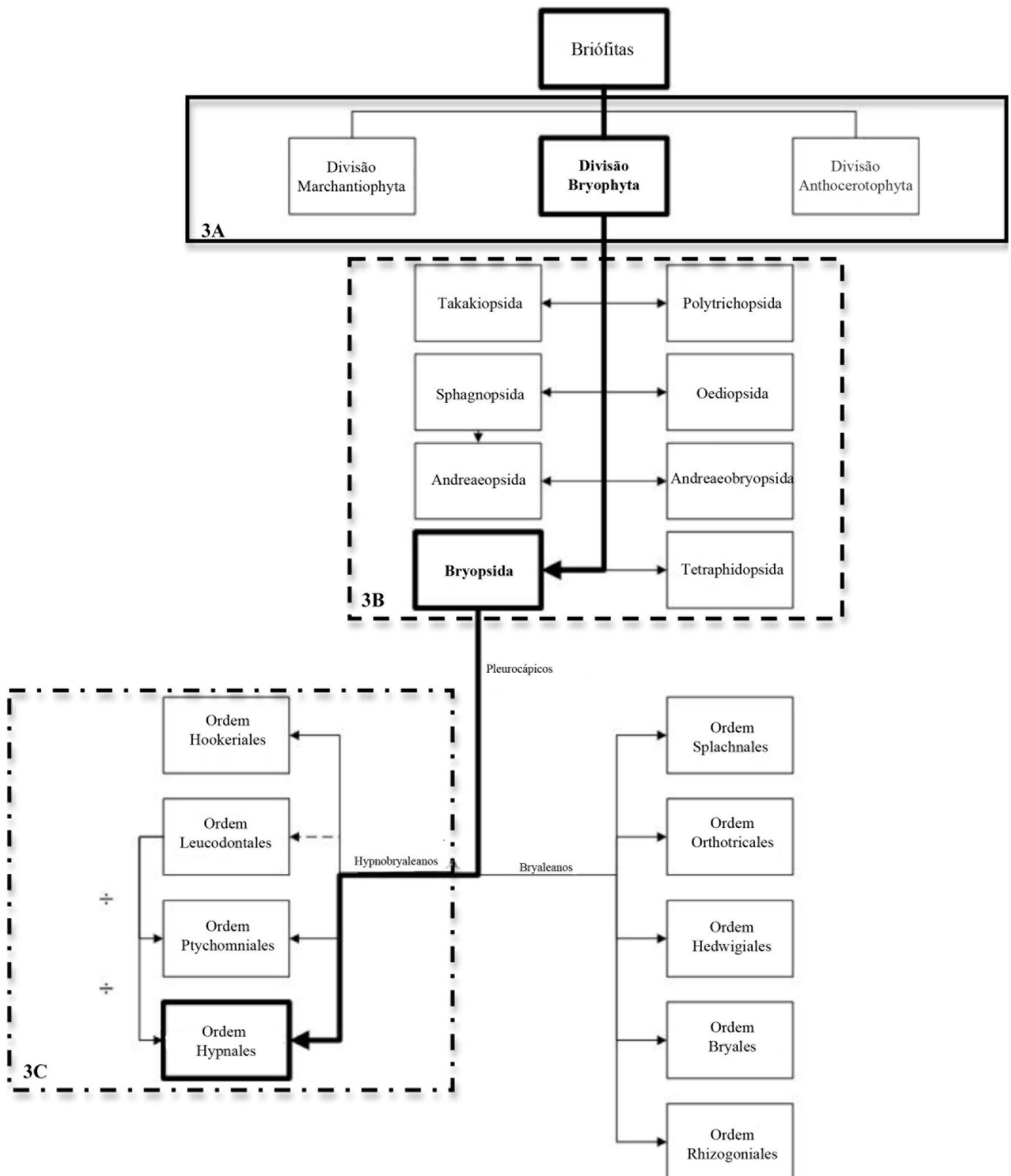


Figura 3A – Divisões no grupo Bryophyta; **3B** – Classes dentro da Divisão Musci; **3C** – Ordens da Classe Bryopsida.

Segundo Shaw et al. (2003), a ordem Hypnales passou por um período de diversificação relativamente rápido no início de sua história, e parece ser caracterizada por linhagens que cresceram exponencialmente. Entretanto, linhagens mais profundas, que diversificaram no início da história dos pleurocápicos, correspondem, na sua maioria, a famílias (e clados ainda mais inclusivos que as famílias) em vez de gêneros, que tendem a divergir mais perto da ponta da filogenia. Embora as Hypnales formem um clado grande, com mais de 4.000 espécies, todas estas espécies estão intimamente relacionados a um nível molecular (SHAW et al., 2003), e o padrão de morfologias diferentes juntamente com a homogeneidade no nível de sequência é sugestiva dessa radiação adaptativa (SHAW et al., 2003). Provavelmente, será necessário grandes quantidades de dados de nucleotídeos para se obter boa resolução desses nós (SHAW & RENZAGLIA, 2004).

A convergência morfológica é generalizada entre os pleurocarpos, o que explica a dificuldade na sistemática desse grupo de musgos (MERGET & WOLF, 2010). Na Ordem Hypnales há várias famílias polifiléticas, como a Hypnaceae, Neckeraceae, Leptodontaceae, Anomodontaceae, Hylocomiaceae, Amblystegiaceae, Brachytheciaceae, Lembophyllaceae, Meteoriaceae e Leskeaceae (BUCK et al., 2000a; OLSSON et al., 2009). Merget & Wolf (2010), ao analisarem a filogenia das Hypnales, mostraram as famílias Climaciaceae, Theliaceae, Trachylomataceae, Sematophyllaceae, Stereophyllaceae e Catagoniaceae como monofiléticas.

3 SEMATOPHYLLACEAE

3.1 A FAMÍLIA SEMATOPHYLLACEAE

A família Sematophyllaceae é uma das mais difíceis famílias da Divisão Bryophyta. O problema reside em dois níveis: conceitos genéricos para a família e a insuficiente avaliação das espécies e gêneros, especialmente daquelas amplamente distribuídas perto de regiões subtropicais a tropicais (SEKI, 1968; HEDENÄS & BUCK, 1999).

As Sematophyllaceae são essencialmente tropicais, com poucos representantes na América do Norte e menos ainda na Europa (HEDENÄS & BUCK, 1999). Possuem aproximadamente 61 gêneros e 802 espécies (TROPICOS.ORG). Sua distribuição se dá, principalmente, em florestas úmidas, podendo ser corticícolas, ocasionalmente epífilas e mais raramente rupícolas e terrícolas (RAMSEY et al., 2002). No Brasil, é possível encontrar 11 gêneros da família Sematophyllaceae, sendo um endêmico, e 44 espécies tradicionalmente incluídas nessa família, sendo 15 endêmicas (COSTA et al., 2011). O cerrado possui cerca de 37% dessas espécies (COSTA et al., 2011).

As principais características da família são: filídios com costa em geral ausente, ou quando presente é dupla e restrita à base; células do filídio lineares ou rômbricas, células alares bem diferenciadas com células geralmente infladas e muitas vezes seriadas; caulídio geralmente avermelhado; pseudoparáfilas quando presentes são foliosas; opérculo é longo-rostrado; células exoteciais são geralmente colenquimatosas ou subcolenquimatosas; peristômio bem desenvolvido com exostômio e endostômio.

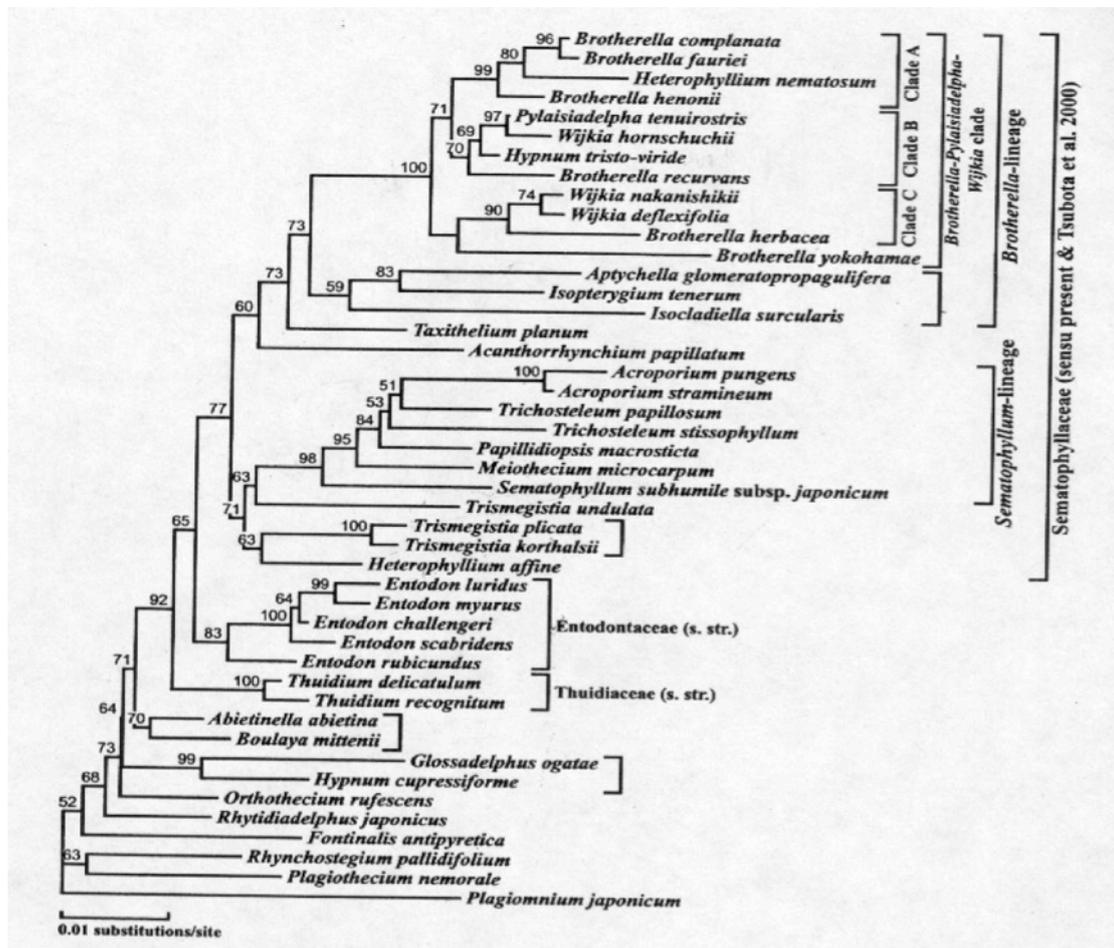
3.2 FILOGENIA DA FAMÍLIA SEMATOPHYLLACEAE

A primeira classificação da família Sematophyllaceae foi dada por Brotherus (1909). Depois, Fleischer (1912, 1923) retificou o conceito de Brotherus e dividiu as Sematophyllaceae em quatro subfamílias: Sematophylloideae, Clastobryoideae, Heterophylloideae e Macrohymenioideae. Gangulee (1980), Buck & Tan (1989), Tan & But (1997), Tan & Yu (1998), Tan & Jia (1999), Ramsay et al. (2004) e Jia et al (2005) apoiaram as quatro subfamílias, embora tivessem sugerido alguns rearranjos de gêneros dentro delas.

Vários estudos tiveram como foco a circunscrição da família Sematophyllaceae (HEDENAS & BUCK, 1999; TSUBOTA et al., 2000; 2001a; 2001b). Hedenäs & Buck (1999) reconstruíram a filogenia da família Sematophyllaceae através de estudos cladísticos usando dados morfológicos. Além disso, descreveram mais uma subfamília, a Wijkioideae – que corresponderia a uma parte da subfamília Heterophylloideae – e propuseram que a subfamília Sematophylloideae fosse subdividida em três grupos. Goffinet & Buck (2004) restringiram as inferências de Hedenäs & Buck (1999) para a hipótese filogenética inferida a partir de sequências de *rbcL* obtida por eles, e puderam identificar as sinapomorfias necessárias para diagnosticar as Sematophyllaceae, redefinida por Tsubota et al. (2001a). O valor dos caracteres morfológicos para a definição de gêneros dentro da família também tem sido questionado para vários gêneros, como por exemplo, *Trismegistia*, *Mastopoma* e *Wijkia*, que podem compor várias entidades polifiléticas (AKIYAMA & TSUBOTA, 2001; TSUBOTA et al., 2001b).

O estudo de Tsubota et al. (2001a) sugere que não existem as cinco subfamílias acima descritas, pois nenhuma delas formaria um grupo monofilético e, dessa forma, essa classificação caiu em desuso. No entanto, dois grandes clados monofiléticos foram encontrados, nenhum deles referente às subfamílias citadas anteriormente. Tsubota et al. (2001a) chamam esses grupos monofiléticos de “linhagem-*Brotherella*” e “linhagem-*Sematophyllum*”. O autor defende ainda que Sematophyllaceae seja reconhecida de forma ampla, abrangendo ambas linhagens (Figura 4). Goffinet & Buck (2004), adotando uma circunscrição mais restrita, definem Sematophyllaceae como apenas a “linhagem-*Sematophyllum*” e descreveram uma nova família chamada de Pylaisiadelphaceae para a “linhagem-*Brotherella*”. Essa classificação tem sido seguida desde então (Goffinet & Buck, 2004).

Figura 4 – Filogenia encontrada por Tsubota et al. (2001a) para a família Sematophyllaceae (Fonte: TSUBOTA et al., 2001a).



O que Tsubota et al. (2001a) chamam de “linhagem-*Sematophyllum*” possui as seguintes espécies: *Acroporium pungens* (Hedw.) Broth., *Acroporium stramineum* (Reinw. & Hornsch.) M. Fleisch., *Trichosteleum papillosum* (Hornsch.) A. Jaeger, *Trichosteleum stissophyllum* (Hampe & Müll. Hal.) A. Jaeger, *Papillidiopsis macrosticta* (Broth. & Paris) W.R. Buck & B.C. Tan, *Meiothecium microcarpum* (Harv.) Mitt. e *Sematophyllum subhumile* subsp. *japonicum* (Broth.) Seki. As espécies contidas nessa linhagem são de maioria asiáticas.

Hedenäs et al. (2008), utilizando somente espécies asiáticas e novamente o gene *rbcL*, apresentaram o gênero *Acroporium* como monofilético, e o grupo contendo os gêneros *Papillidiopsis*, *Radulina* e *Trichosteleum*, próximos de *Acroporium*.

A circunscrição instável da família Sematophyllaceae revela que a maioria dos caracteres usados historicamente na classificação não servem como recurso de diagnóstico para essas famílias, ou que tais caracteres sofreram modificações adicionais durante a evolução da família (GOFFINET & BUCK, 2004). Uma forma de tentar circunscrever a família Sematophyllaceae seria usando dados de marcadores moleculares. Como a família Sematophyllaceae é uma família complicada, optou-se por avaliar um grupo dentro dessa família, a “linhagem-*Sematophyllum*” de Tsubota et al. (2001a), pois é nesse grupo que podemos encontrar o gênero tipo da família.

3.3 MARCADORES DE USO RECORRENTE EM BRIÓFITAS

Vários marcadores têm sido utilizados para estudos moleculares em briófitas. Para cloroplasto, os marcadores mais utilizados são *rps4*, *trnL-trnF*, *trnG*, *rbcL*, espaçador *rbcl-atpb*, *psbT* e *Lsu*; para o genoma nuclear, os marcadores mais usados são *ITS*, *26S*, *Leafy*, *RAPD-A*, *RAPD-B* e *RAPD-F*, além de outras regiões pouco exploradas tais como, *gapC* e *hoI*. No genoma mitocondrial, os marcadores mais usados são *nad1*, *nad5*, *nad7* e *rps3* (STECH & QUANDT, 2010).

O marcador *rps4* é um gene plastidial de cópia única, codificante da proteína ribossomal S4, e seu tamanho é aproximadamente de 600 pb. Esse marcador foi inicialmente proposto por Nadot et al. (1994), como uma ferramenta para o estudo da filogenia de Poaceae, mas utilizado com sucesso em várias famílias de musgos (BUCK & GOFFINET, 2000).

O marcador *nad5* é a região codificante do maior gene de proteína do genoma mitocondrial (Beckert et al. 1999), é um gene de cópia única, que codifica a subunidade 5 do complexo I da cadeia respiratória, a NADH-dehidrogenase, e seu tamanho é de aproximadamente 1104 pb. Ele foi proposto por Beckert et al. (1999) para o estudo das relações filogenéticas das briófitas. O gene *nad5* possui uma região codificante que é complementada e estendida pela sequência do intron I. De acordo com Beckert et al. (1999) esse intron é conservado em todas as briófitas estudadas por eles.

4 JUSTIFICATIVAS

Apesar de serem plantas abundantes e diversas nos ecossistemas brasileiros, as briófitas são normalmente negligenciadas. Uma provável causa desta dificuldade é que, apesar da imensa diversificação metabólica e fisiológica desenvolvida pelas briófitas, sua morfologia reduzida diminui muito a visualização dos possíveis caracteres morfológicos para reconhecimento.

Paralelamente, as briófitas desenvolveram uma série de adaptações fisiológicas para ambientes extremos, que poderiam ser utilizadas com grande potencial biotecnológico. O desenvolvimento de ferramentas para avaliar esta diversidade pode permitir que um novo grupo taxonômico torne-se disponível para bioprospecção.

Considerando que a maior parte das briófitas brasileiras pertencem às famílias Pottiaceae, Hypnaceae e Sematophyllaceae (COSTA et al., 2011), a correta circunscrição destes grupos pode permitir a aplicação de métodos para a prospecção biotecnológica, até então impossível pela base taxonômica caótica vigente. E como a circunscrição da família Sematophyllaceae é extremamente controversa, visto que é a maior família dentro da maior ordem Hypnales de pleurocárpicos, optou-se pela avaliação de um grupo dentro dessa família.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a circunscrição de um grupo da família Sematophyllaceae usando marcadores moleculares de dois compartimentos celulares: mitocondrial (*nad5*) e plastidial (*rps4*).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o posicionamento taxonômico de algumas espécies dos gêneros *Sematophyllum*, *Acroporium*, *Paranapiacabaea* e *Meiothecium* que ocorrem no Brasil;
- Incluir plantas do Novo Mundo na amostragem de Tsubota et al. (2001a);
- Discutir a topologia com outras filogenias para a família Sematophyllaceae.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 PLANTAS UTILIZADAS

Uma análise preliminar foi realizada com um total de 57 sequências (Tabela 2), obtidas de 46 espécies, de 34 gêneros diferentes, adquiridas dos Herbários da Universidade de Brasília (UB) e do Missouri Botanical Garden (MO). Algumas das sequências utilizadas foram extraídas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para uma análise preliminar, foram utilizadas 57 sequências de *rps4* da família Sematophyllaceae de várias localidades. Após essa análise, foi delimitado o grupo de trabalho, a linhagem-*Sematophyllum* proposta por Tsubota et al. (2001a), que utilizou somente plantas asiáticas. Após a delimitação dessas espécies, foram utilizadas 21 sequências de *rps4* obtidas de 17 espécies, pertencentes a 11 gêneros diferentes. Foram utilizadas também 19 sequências de *nad5*, obtidas de 16 espécies, pertencentes a 11 gêneros diferentes. As plantas utilizadas nessa segunda análise são, em sua maioria, plantas dos trópicos, de ocorrência quase que exclusivamente sul americana, principalmente brasileira. Na tabela a seguir são apresentados todas as plantas utilizadas nesse trabalho.

Tabela 2 – Espécies utilizadas na análise preliminar de rps4 com todas as Sematophyllaceae, as espécies destacadas em negrito foram as sequenciadas nesse estudo.

Gênero	Espécie	Nº de Acesso rps4	Nº de Acesso nad5
<i>Acanthorrhynchium</i> M. Fleisch.	<i>Acanthorrhynchium papillatum</i> (Harv.) M. Fleisch.	AY908206	-
<i>Acroporium</i> Mitt.	<i>Acroporium caespitosum</i> (Hedw.) W.R. Buck	JX026841	JX026832
	<i>Acroporium caespitosum</i> (Hedw.) W.R. Buck	JX026842	JX026833
	<i>Acroporium caespitosum</i> (Hedw.) W.R. Buck	JX026845	JX026836
	<i>Acroporium esmeraldicum</i> (Müll. Hal.) W.R. Buck	JX026844	JX026835
	<i>Acroporium longirostre</i> (Brid.) W.R. Buck	JX026843	JX026834
	<i>Acroporium pungens</i> (Hedw.) Broth.	AF143028	-
	<i>Acroporium pungens</i> (Hedw.) Broth.	AY908207	AY908539
	<i>Acroporium secundum</i> (Reinw. & Hornsch.) M. Fleisch.	GQ254028	-
<i>Aptychella</i> (Broth.) Herzog	<i>Aptychella proligera</i> (Broth.) Herzog	AY908228	-
<i>Aptychopsis</i> (Broth.) M. Fleisch.	<i>Aptychopsis pyrrophylla</i> (Müll. Hal.) Wijk & Margad.	AY908212	AY908476

<i>Brotherella</i> Loeske ex M. Fleisch.	<i>Brotherella recurvans</i> (Michx.) M. Fleisch.	AY908227	-
<i>Chionostomum</i> Müll. Hal.	<i>Chionostomum rostratum</i> (Griff.) Müll. Hal.	AY908210	AY908477
<i>Clastobryella</i> M. Fleisch.	<i>Clastobryella kusatsuensis</i> (Besch.) Z. Iwats.	AY908226	-
<i>Clastobryophilum</i> M. Fleisch.	<i>Clastobryophilum bogoricum</i> (Bosch & Sande Lac.) M. Fleisch.	AY908208	-
<i>Clastobryopsis</i> M. Fleisch.	<i>Clastobryopsis planula</i> (Mitt.) M. Fleisch.	AY908229	-
<i>Clastobryum</i> Dozy & Molk.	<i>Clastobryum tenuirameum</i> (Mitt.) Dixon	AY908230	-
<i>Colobodontium</i> Herzog	<i>Colobodontium vulpinum</i> (Mont.) S.P. Churchill & W.R. Buck	AY908215	AY908534
<i>Donnellia</i> Austin	<i>Donnellia commutata</i> (Müll. Hal.) W.R. Buck	AY908211	AY908536
	<i>Donnellia commutata</i> (Müll. Hal.) W.R. Buck	JX026852	-
	<i>Donnellia commutata</i> (Müll. Hal.) W.R. Buck	JX026851	-
	<i>Donnellia commutata</i> (Müll. Hal.) W.R. Buck	JX026850	-
<i>Entodon</i> Müll. Hal.	<i>Entodon brevisetus</i> (Hook. & Wilson) Lindb.	AF143057	-
<i>Foreauella</i> Dixon & P. de la Varde	<i>Foreauella orthothecia</i> (Schwägr.) Dixon & P. de la Varde	AY908560	-
<i>Heterophyllum</i> (Schimp.) Kindb.	<i>Heterophyllum affine</i> (Hook.) M. Fleisch.	AY908577	-
<i>Isocradiella</i> Dixon	<i>Isocradiella surcularis</i> (Dixon) B.C. Tan & Mohamed	AY908204	-

<i>Isopterygium</i> Mitt.	<i>Isopterygium albescens</i> (Hook.) A. Jaeger	AF469818	-
	<i>Isopterygium minutirameum</i> (Müll. Hal.) A. Jaeger	AF469819	-
	<i>Isopterygium tenerum</i> (Sw.) Mitt.	AF143037	-
<i>Mastopoma</i> Cardot	<i>Mastopoma subfiliferum</i> Horik. & Ando	AY908224	-
<i>Meiothecium</i> Mitt.	<i>Meiothecium boryanum</i> (Müll. Hal.) Mitt.	JX026839	-
	<i>Meiothecium chlorocladum</i> (Broth.) Broth	AY908217	AY908483
	<i>Meiothecium revolubile</i> Mitt.	JX026849	-
<i>Papillidiopsis</i> (Broth.) W.R. Buck & B.C. Tan	<i>Papillidiopsis complanata</i> (Dixon) W.R. Buck & B.C. Tan	AY908220	-
<i>Paranapiacabaea</i> W.R. Buck & Vital	<i>Paranapiacabaea paulista</i> W.R. Buck & Vital	AY908218	AY908480
<i>Potamium</i> Mitt.	<i>Potamium lonchophyllum</i> (Mont.) Mitt.	AY908221	-
<i>Pseudotrismegistia</i> H. Akiy. & Tsubota	<i>Pseudotrismegistia undulata</i> (Broth. & Yasuda) H. Akiy. & Tsubota	AY908618	-
<i>Pterogonidium</i> Müll. Hal.	<i>Pterogonidium pulchellum</i> (Hook.) Müll. Hal.	AY908232	-
<i>Pterogoniopsis</i> Müll. Hal.	<i>Pterogoniopsis cylindrica</i> Müll. Hal.	AY908213	AY908537
<i>Pylaisiadelpha</i> Cardot	<i>Pylaisiadelpha tenuirostris</i> (Bruch & Schimp. ex Sull.) W.R. Buck	AF143053	-
<i>Radulina</i> W.R. Buck & B.C. Tan	<i>Radulina borbonica</i> (Bél.) W.R. Buck	AY908223	-

<i>Rhaphidostichum</i> M. Fleisch.	<i>Rhaphidostichum schwaneckeanum</i> (Müll. Hal.) Broth.	AY908222	-
<i>Schroeterella</i> Briq.	<i>Schroeterella zygodonta</i> Herzog	AY908209	AY908478
<i>Sematophyllum</i> Mitt.	<i>Sematophyllum adnatum</i> (Michx.) E. Britton	JX026846	JX026837
	<i>Sematophyllum demissum</i> (Wilson) Mitt.	JX026847	JX026838
	<i>Sematophyllum demissum</i> (Wilson) Mitt.	AY908214	AY908479
	<i>Sematophyllum demissum</i> (Wilson) Mitt.	AF143055	-
	<i>Sematophyllum</i> sp. Mitt.	AJ862343	-
	<i>Sematophyllum subpinnatum</i> (Brid.) E. Britton	JX026840	JX041895
	<i>Sematophyllum subpinnatum</i> (Brid.) E. Britton	GQ254034	GQ254026
	<i>Sematophyllum subpinnatum</i> (Brid.) E. Britton	HQ607407	-
<i>Taxithelium</i> Spruce ex Mitt.	<i>Taxithelium planum</i> (Brid.) Mitt.	AY908231	-
	<i>Taxithelium planum</i> (Brid.) Mitt.	AF143054	-
<i>Trichosteleum</i> Mitt.	<i>Trichosteleum papillosum</i> (Hornsch.) A. Jaeger	AF143056	
	<i>Warburgiella leucocytus</i> (Müll. Hal.) B.C. Tan, W.B. Schofield & H.P. Ramsay	AY908219	AY908538

Wikia H.A. Crum

Wikia extenuata (Brid.) H.A. Crum

AY908205

-

***Wikia flagellifera* (Broth.) H.A.Crum**

JX026848

-

6.2 PROTOCOLOS UTILIZADOS

6.2.1 Obtenção do DNA

O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo de mini-CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987), com modificações de Câmara (2010). O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi aquecido a 60°C em banho-maria e pedaços de aproximadamente 1cm das amostras foram colocados em tubos eppendorfs de 1,5mL. Em seguida, foi adicionado 250µL de CTAB quente às amostras, os quais foram maceradas com micro-pistilos. Após o material ser bem macerado, foi adicionado novamente mais 450µL de CTAB quente, para completar 700µL. O conteúdo dos tubos foi misturado levemente por inversão e incubado por 45 minutos à temperatura de 60°C, durante o tempo de incubação, misturou-se suavemente as amostras. Em seguida, na capela, adicionou-se 700µL de clorofórmio/álcool isoamílico (SEVAG), na proporção de 24:1 e novamente misturados várias vezes por inversão. Após o acréscimo do SEVAG, centrifugou-se a temperatura ambiente, por 1 minuto a 7.000rpm. Com uma ponteira de pipeta com a ponta cortada, para não quebrar mais o DNA, pipetou-se o sobrenadante para novos tubos eppendorfs e adicionou-se 700µL de isopropanol gelado, a -20°C, misturado por inversão, e em seguida colocado no freezer, durante a noite para precipitar. No dia seguinte, após retirar as amostras do freezer, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000rpm, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foi adicionado 1mL de etanol a 70%, e centrifugado novamente por 5 minutos, a 13.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos eppendorfs colocados para secar por, aproximadamente, 40 minutos. Quando seco, o DNA foi ressuspendido em 25µL de TE a 60°C e colocado em banho-maria por 5 minutos. Todo o material extraído foi estocado em freezer a -20°C.

6.2.2 Amplificação

Para o genoma plastidial foi utilizado o marcador *rps4* (Figura 5). As sequências iniciadoras (primers) foram o *rps5* (5'-ATG TCC CGT TAT CGA GGA CCT-3') e o *trnas* (5'- TAC CGA GGG TTC GAA TC-3'). Para o genoma mitocondrial, foi utilizado o marcador *nad5* (Figura 6), que foi amplificado por dois fragmentos que se sobrepõem. Suas sequências iniciadoras foram o *K* (5'-ATA TGT CTG AGG ATC CGC ATA G-3'), o *Li* (5'-GCT GCA TGA ATC RAA GCR GAT ACT GG-3'), o *Ki* (5'-ACT YGG TTA CCY GAT GCA ATG GAG GGT -3'), o *L* (5'-AAC TTT GGC CAA GGA TCC TAC AAA-3'). Quando o PCR não funcionou,

foi realizado o *nested*-PCR e suas seqüências iniciadoras foram o *4F* (5'- GAA GGA GTA GGT CTC GCT TCA-3'), o *3R* (5'-AAA ACG CCT GCT GTT ACC AT-3') e o *2220R* (5'- ATA TTC CAG TGG TTG CCG CG-3'). O desenho das seqüências iniciadoras são apresentadas a seguir.

Figura 5 – Marcador *rps4* em musgos.

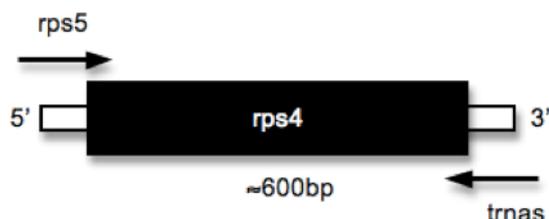
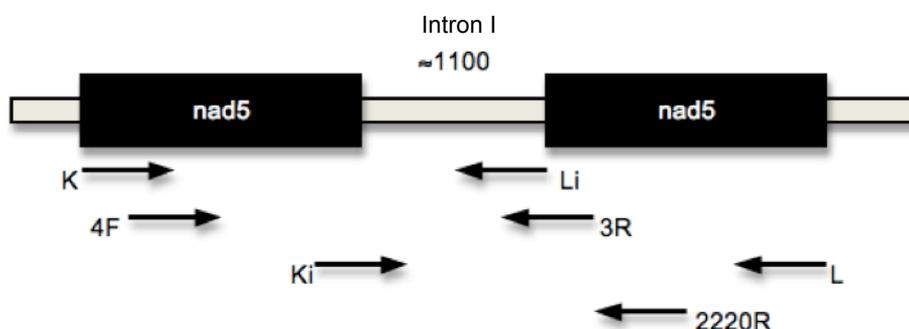


Figura 6 – Marcador *nad5* para musgos.



As reações de PCR foram realizadas em termocicladores, contendo 2µL de DNA, que foi diluído a 10:1, em 50µL de solução final. A solução de PCR continha as seguintes concentrações: 0,5µM do *primer forward* e 0,5µM do *primer reverse*, na presença de 0,2µM de dNTP, 0,4mg/mL de Albumina Bovina Sérica (BSA), mais 1x TaqBuffer (10x). Foi adicionado também 5mM de MgCl₂, e 0,05unidades/µL de TaqPolimerase e, por ultimo, água Milli-Q q.s.p., até completar o volume final de 50µL de reação. A amplificação tradicional dos marcadores *rps4* e *nad5* e o *nested*-PCR começaram com 1 minuto para a desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturar as fitas de DNA, 45 segundos a 54°C para o *rps4* e 52°C para o *nad5* para a ligação dos nucleotídeos livres, e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita de DNA. Por último, o material foi aquecido a 72°C por 5 minutos completando assim a amplificação do *rps4*. Em seguida, 3µL do produto da amplificação com mais 3µL de tampão de carregamento foi visualizado em gel de agarose a 1%, corados com Brometo de Etídio, a solução de tampão utilizada foi o TBE a 1X.

6.2.3 Purificação

Os produtos de PCR que apresentaram somente uma banda foram purificados com EXOSap-Ti (0,2µl de Exonuclease I mais 0,2µl de *Shrimp Alkaline Phosphatase* e 0,6µl dH₂O), aquecido a 37°C por 30 minutos e depois a 85°C por 15 minutos.

Quando os produtos de PCR apresentaram várias bandas, como no caso do *nested*-PCR, utilizou-se a purificação por Iodeto de Sódio. Os produtos que apresentaram bandas múltiplas tiveram o fragmento desejado extraído do gel de agarose LMP (*Low Melting Point*). Para a extração do fragmento do gel, a amostra foi corrida em um gel LMP a 0,8%, com a solução tampão TAE 1X, em câmara fria a 50V por 5 horas. Em seguida, foi corado com Brometo de Etídio. Após o gel ser corado, os fragmentos foram cortados do gel em um transiluminador UV, em fragmentos de aproximadamente 200mg – 300mg. Em seguida, foi adicionado 3 vezes o volume de *Ultra-Salt* (Iodeto de Sódio) nos tubos com os fragmentos os quais foram colocados em banho-maria a 55°C por 5 minutos. Foi adicionada 20µL de resina de sílica nos tubos, e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, misturando algumas vezes durante esse período. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 segundos à velocidade máxima. Após retirar o sobrenadando o pellet foi ressuscitado em 1mL de *Ultra-Wash*, uma solução que contém etanol, e centrifugado novamente por 15 segundos à velocidade máxima. O sobrenadante foi novamente descartado e acrescido mais 1mL de *Ultra-Wash* e centrifugado, e novamente descartado o sobrenadante. Após remover qualquer traço de etanol, o pellet foi ressuscitado em 20µL de água milli-Q e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi novamente centrifugado por 1 minuto e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

6.2.4 Sequenciamento

Os amplicons foram sequenciados na plataforma de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília - UCB, por meio de sequenciadores automáticos de DNA (ABI 3130). O mix usado para incorporação dos nucleotídeos marcados na reação de sequenciamento foi realizado em um volume final de 10µl, contendo 3µL do kit BigDye V3.1 (Applied Biosystems), 3,2 pmol de primer (1µM), 20ng do produto de PCR e água Milli-Q até completar o volume final. As amplificações foram realizadas em termociclador por trinta ciclos, cada ciclo contendo três etapas. A primeira etapa, a 95°C por 20 segundos para desnaturar as moléculas, seguido a 50°C

por 15 segundos para a ligação dos nucleotídeos marcados, terminando a 60°C por 1 minuto para a extensão das moléculas de DNA.

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados seguindo o protocolo do kit BigDye Terminator V3.1 de precipitação com Etanol/EDTA. Para um volume final de 20µL de reações de sequenciamento, a purificação foi realizada em placas de 96 poços. Foi adicionado 5µL de EDTA a 125mM para cada poço, também foi adicionado 60µL de Etanol a 100%, em seguida a placa foi selada e coberta com papel alumínio, misturada por inversão quatro vezes, e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação a placa foi centrifugada a 3000 x g por 30 minutos, imediatamente após o término da centrifugação, a placa foi invertida e foi realizado um *spin*, na centrífuga, a 185 x g. Em seguida foi adicionado 60µL de Etanol a 70% a cada poço e novamente centrifugado a 1650 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C. Novamente a placa foi invertida e um *spin* realizado a 185 x g por um minuto. E por último as amostras foram ressuspensas no tampão de injeção.

6.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A construção dos cladogramas seguindo os critérios de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana, foi realizada da seguinte forma: primeiramente, analisou-se o gene plastidial (*rps4*), em seguida o gene mitocondrial (*nad5*), e por último os dois genes concatenados.

Todas as sequências foram inicialmente alinhadas e editadas no CLC DNA Workbench v6.1 (© CLC bio). Em seguida, para a construção dos cladogramas pelos critérios de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança foi utilizado o programa Mega v5 (TAMURA et al., 2011). Tanto para a Máxima Parcimônia quanto para a Máxima Verossimilhança, o critério de confiabilidade foi o bootstrap, com 1000 réplicas para Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança. Já o cladograma construído pela Análise Bayesiana foi realizado utilizando-se o programa MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), baseado em 1.000.000 gerações, com amostragem a cada 5000 gerações. Para cada corrida, as primeiras 5.000 árvores foram descartadas como *burnin*, e o critério de confiabilidade adotado foi o das probabilidades posteriores. Os modelos de evolução foram obtidos com o programa jModelTest 0.1 package (GUINDON & GASCUEL, 2003; POSADA, 2008).

7 RESULTADOS

Quatorze novas sequências de *rps4* foram obtidas para dez espécimes, pertencentes a cinco gêneros: *Acroporium* Mitt. – três sequências de *Acroporium caespitosum* (Hedw.) W.R. Buck, uma sequência de *Acroporium longirostre* (Brid.) W.R. Buck e uma sequência de *Acroporium esmeraldicum* (Müll. Hal.) W.R. Buck. *Donnellia* Austin – três sequências de *Donnellia commutata* (Müll. Hal.) W.R. Buck. *Meiothecium* Mitt. – uma sequência para *Meiothecium boryanum* (Müll. Hal.) Mitt. E uma sequência para *Meiothecium revolubile* Mitt. *Sematophyllum* Mitt. – uma sequência de *Sematophyllum adnatum* (Michx.) E. Britton, uma sequência de *Sematophyllum demissum* (Wilson) Mitt. e uma sequência de *Sematophyllum subpinnatum* (Brid.) E. Britton. e *Wijkia* H.A. Crum – uma sequência para *Wijkia flagellifera* (Broth.) H.A.Crum. Mais oito novas sequências de *nad5* foram obtidas para seis espécies, pertencentes a dois gêneros: *Acroporium* – três sequências de *Acroporium caespitosum*, uma sequência de *Acroporium longirostre* e uma sequência de *Acroporium esmeraldicum* e *Sematophyllum* – uma sequência de *Sematophyllum adnatum*, uma sequência de *Sematophyllum demissum* e uma sequência de *Sematophyllum subpinnatum*. As sequências adicionais foram obtidas no GenBank. Com essas sequências, montou-se uma matriz alinhada para cada gene, seguindo-se a uma outra matriz alinhada com os genes concatenados.

Em uma análise preliminar, utilizando-se todas as sequências de *rps4* para as *Sematophyllaceae* (*lato sensu*) encontradas no Genbank e as obtidas nesse trabalho, obteve-se uma árvore (Figura 7). Na árvore obtida pode-se observar claramente a formação do Grupo das *Sematophyllaceae* Tropicias, que seria referente a Linhagem-*Sematophyllum*, como detectado por Tsubota et al. (2001a). *Bootstraps* abaixo de 50 são considerados de baixo suporte, entre 50 e 80 moderado e acima de 80 bom suporte. Para as probabilidades posteriores até 50% é um suporte baixo e acima de 95% suporte alto. As estatísticas das árvores são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características das árvores de Sematophyllaceae (*lato sensu*).

Marcador	<i>rps4</i>
Taxas incluídos	57
Tamanho da matriz	446
Sítios variáveis	287
Sítios informativos para a parcimônia	232
Número de árvores	38
Comprimento da árvore	463
Índice de consistência (CI)	0,723542
Índice de retenção (RI)	0,916066
Modelo de evolução	HKY+G
Log da verossimilhança	-2634,34

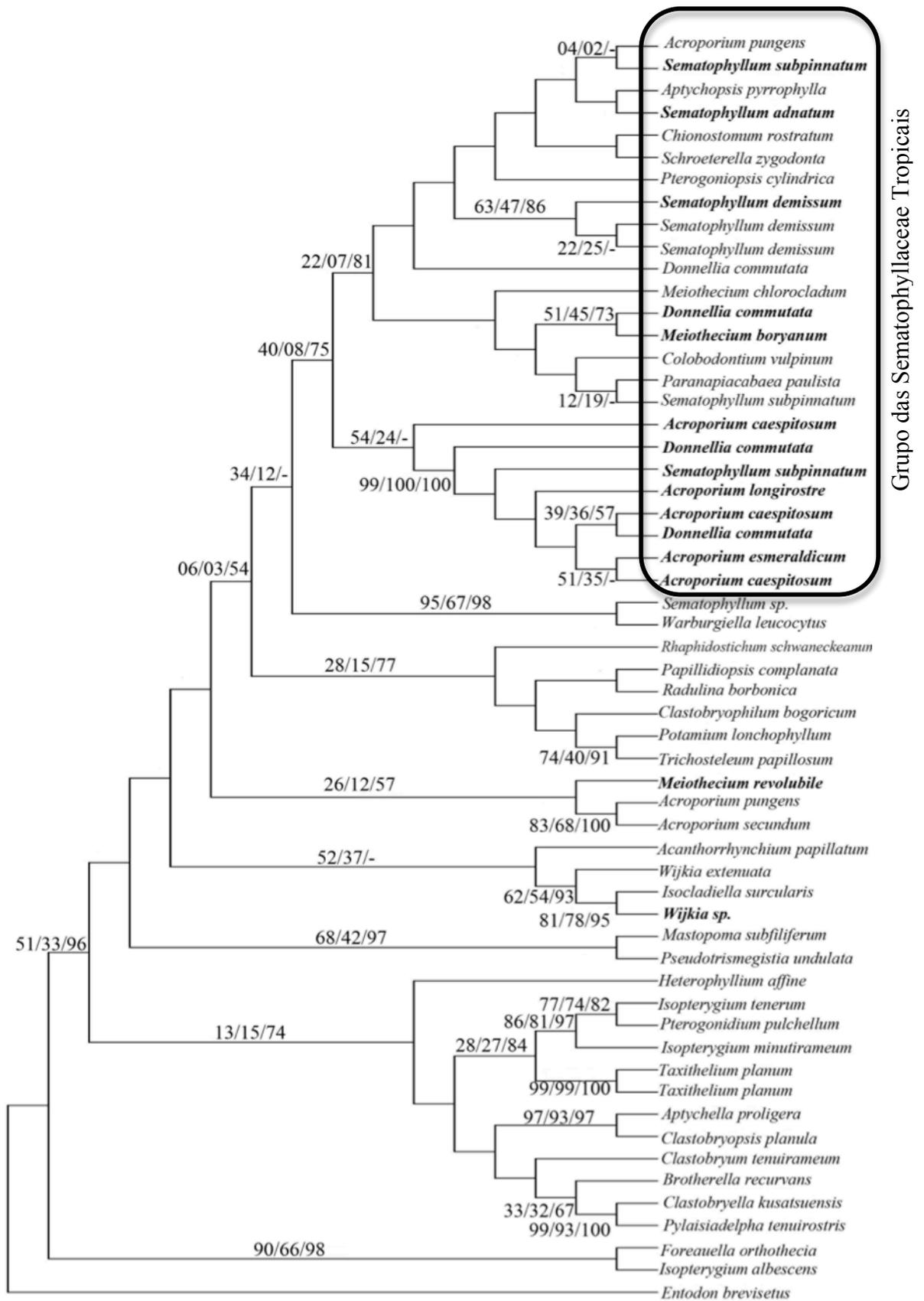


Figura 7 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) com todas as sequências para o gene *rps4* de Sematophyllaceae. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.

O Grupo das Sematophyllaceae Tropicais, que é o foco principal desse trabalho, mostrou um *bootstrap* para máxima parcimônia e máxima verossimilhança baixo (40 e 08 respectivamente), mas para a análise Bayesiana o índice das probabilidades posteriores foi moderado (75).

Posteriormente foram realizados novamente as análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana com o clado em que as espécies são consideradas pertencentes a linhagem-*Sematophyllum*, que apareceram no Grupo das Sematophyllaceae Tropicais, formando assim um subgrupo contendo vinte espécies dentro desse grupo (Figuras 8, 9 e 10). As estatísticas das árvores são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características das árvores da linhagem-*Sematophyllum*.

Marcador	<i>rps4</i>	<i>nad5</i>	<i>rps4</i> e <i>nad5</i> concatenados
Taxas incluídos	21	19	19
Tamanho da matriz	625	1146	1807
Sítios variáveis	90	951	998
Sítios informativos para a parcimônia	14	381	303
Número de árvores	189	65	95
Comprimento da árvore	81	473	425
Índice de consistência (CI)	0,925956	0,807611	0,863529
Índice de retenção (RI)	0,777778	0,405229	0,570370
Modelo de evolução	HKY+I	HKY+G+I	K2+G
Log da verossimilhança	-1070,81	-1933,04	-2954,19

Nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e bayesiana (AB), para o grupo das Sematophyllaceae Tropicais com o gene *rps4*, houve a separação de dois clados – clado I e clado II (Figura 8), com um suporte fraco (*bootstrap* de 43, 35 e probabilidade posterior de 50). Dentro do clado I houve três clados constantes, *Acroporium longirostre* e *Acroporiumrium caespitosum*, com *bootstrap* moderado de 67 (MP), 72 (MV) e probabilidade posterior baixa (50%), *Paranapiacabaea paulista* com *Sematophyllum subpinatum*, com *bootstrap* baixo de 10 (MP), 56 (MV) e probabilidade posterior de baixa 50%, e *Acroporium pungens* e

Pterogoniopsis cylindrica, com *bootstraps* baixos de 25 (MP), 50 (MV) e probabilidade posterior alta (100%). Nas três análises, junto com o agrupamento de *A. pungens* e o *P. cylindrica*, apareceu o *Sematophyllum demissum*, com *bootstraps* baixos de 45 (MP), 43 (MV) e probabilidade posterior baixa (50%).

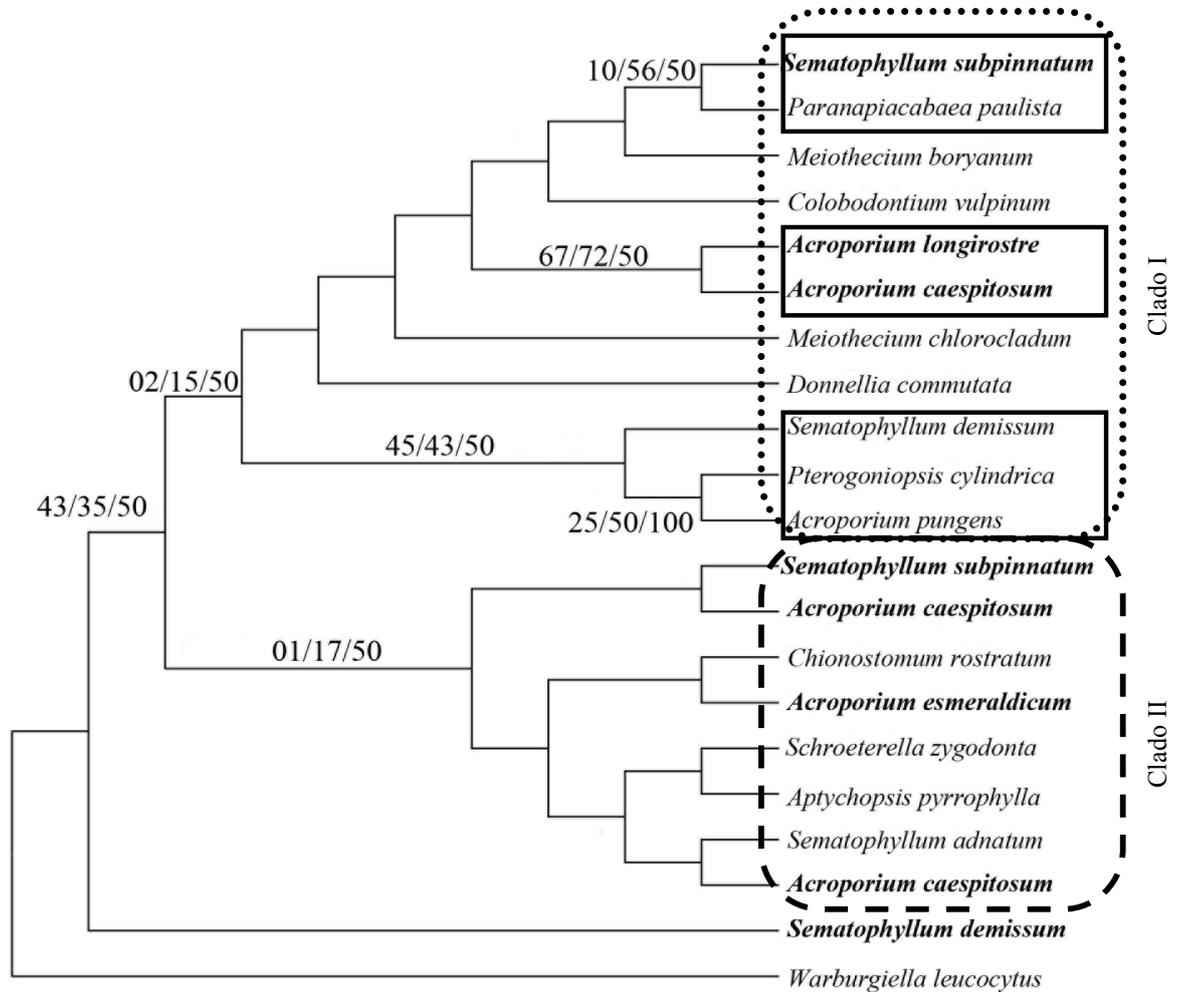


Figura 8 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para o gene *rps4*. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.

Para a análise do grupo das *Sematophyllaceae* tropicais, com o gene *nad5* nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e bayesiana (AB) não houve a separação entre as espécies como apresentado pelo gene *rps4* (Figura 9). Mas houve novamente agrupamento em clados na análise de máxima parcimônia entre *Paranapiacabaea paulista* com *Sematophyllum subpinatum*, clado 2, mas com um baixo *bootstrap* (20). Já o clado 4 com *Pterogoniopsis cylindrica* e *Sematophyllum demissum* ocorreu tanto na análise de MP quanto na de MV, mas com

bootstrap baixíssimo (03 e 08, respectivamente). Nas três análises houve a formação do clado 1 de *Meiothecium chlorocladum* e *Colobodontium vulpinum*, com *bootstraps* baixos de 35 (MP), 51 (MV) e probabilidade posterior alta 100%. Outro agrupamento que ocorreu nas três análises do *nad5* foi o clado 3, contendo todos os *Acroporium*, exceto *Acroporium pungens*, formando um clado monofilético com o *Sematophyllum adnatum* e *Sematophyllum demissum*. Todos os clados apresentaram *bootstraps* moderados.

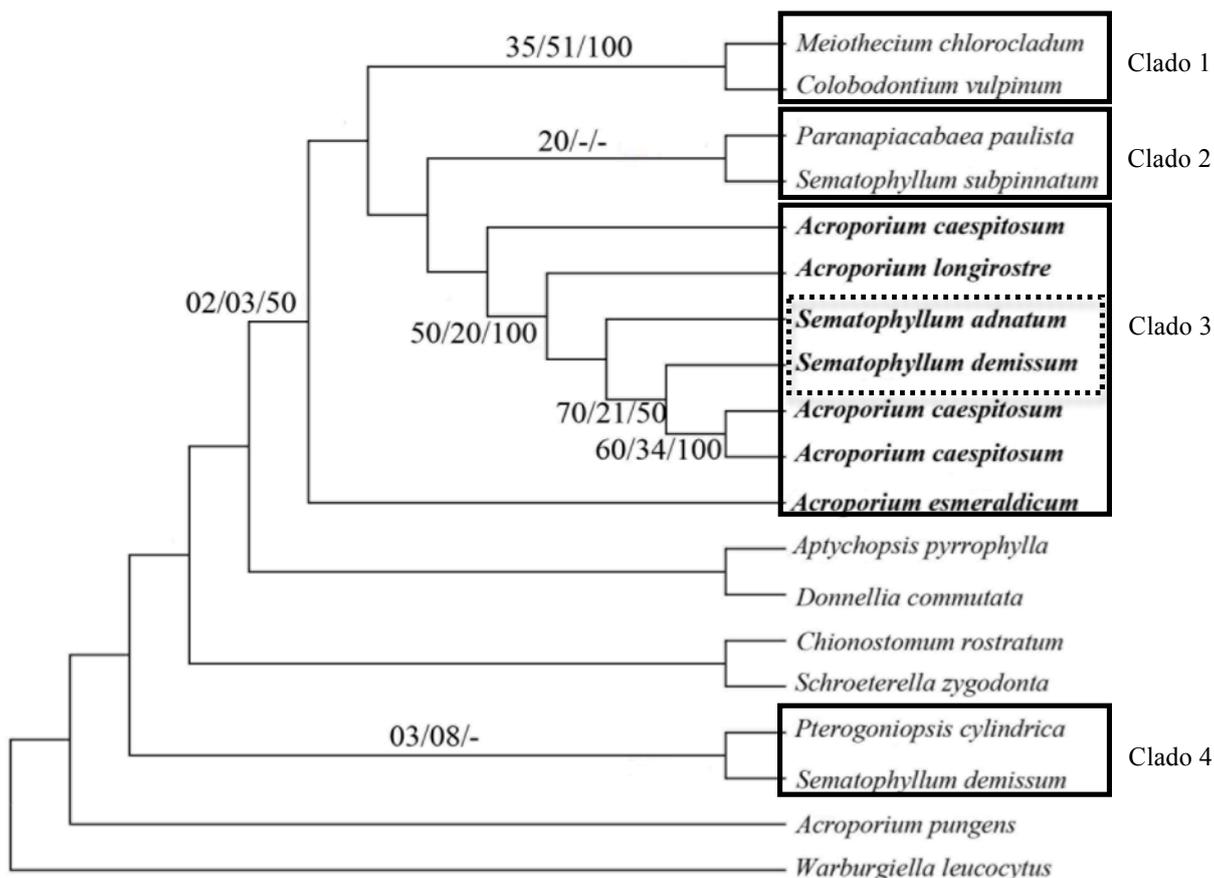


Figura 9 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para o gene *nad5*. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados em ordem: MP/MV/AB.

Na análise do grupo das *Sematophyllaceae* tropicais com os dois genes concatenados, as análises de máxima parcimônia (MP) e de máxima verossimilhança (MV) (Figura 10) geraram novamente a separação das espécies em dois clados – clado A e B. Dentro do clado A, o *Sematophyllum demissum* e o *Acroporium longirostre* formaram o clado A.I com *bootstrap* de 55 (MP) e de 83 (MV). Outro clado formado dentro do clado A foi o clado A.II onde *Acroporium caespitosum* e o

Sematophyllum adnatum agruparam-se com *bootstrap* de 99 (MP), 98 (MV) e probabilidade posterior de 100%. No clado A.III, o *Acroporium pungens*, com *bootstrap* de 37 (MP), 25 (MV) e probabilidade posterior de 50%, se mostrou parafilético com o clado de *Pterogoniopsis cylindrica* e *Sematophyllum demissum*, que ocorreu novamente nas três análises, com *bootstrap* de 30 (MP), 27 (MV) e probabilidade posterior de 50%. Outro clado que apareceu novamente foi o clado A.IV onde a *Paranapicabaea paulista* agrupou-se com o *Sematophyllum subpinnatum*, com *bootstrap* de 21 (MP), 58 (MV) e probabilidade posterior de 100%.

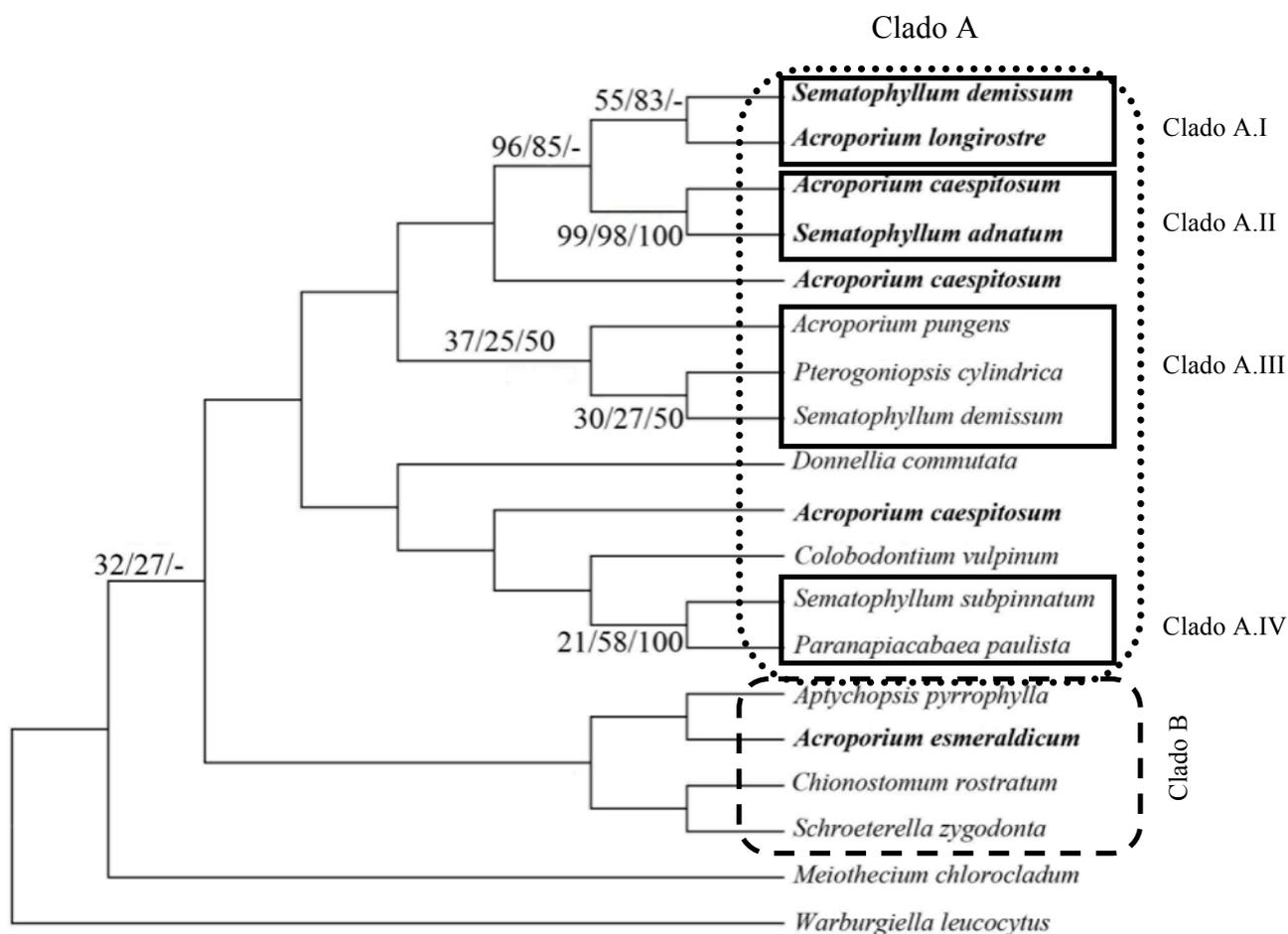


Figura 10 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) para os genes rps4 e nad5 concatenados. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.

Após verificar a ocorrência de certas divisões e agrupamentos, foram realizadas novas análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana com o grupo de espécies que mais apareceram juntas, formando assim um subgrupo

contendo doze espécies, que foi novamente analisado. Da mesma forma que nas análises anteriores, os testes de confiabilidade de máxima parcimônia e máxima verossimilhança foram o *bootstrap* e da análise bayesiana foi o probabilidades posteriores. As estatísticas das árvores são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Características das árvores do subgrupo dentro da linhagem-*Sematophyllum*.

Marcador	<i>rps4</i>	<i>nad5</i>	<i>rps4</i> e <i>nad5</i> concatenados
Taxas incluídos	12	12	12
Tamanho da matriz	625	1146	1771
Sítios variáveis	48	677	725
Sítios informativos para a parcimônia	7	63	70
Número de árvores	98	34	18
Comprimento da árvore	45	667	711
Índice de consistência (CI)	0,955556	0,974513	0,974684
Índice de retenção (RI)	0,894737	0,763889	0,802198
Modelo de evolução	HKY+G	HKY+G+I	HKY+G
Log da verossimilhança	-896,45	-3284,14	-4443,11

Na análise do subgrupo do grupo das *Sematophyllaceae* tropicais para o gene *rps4*, houve separação das espécies em dois grupos, clado I e II (Figura 11). No primeiro clado I, sua monofilia aparece mas com *bootstraps* baixos de 34 (MP), 50 (MV) e probabilidade posterior de 50%. Dentro desse clado novamente ocorreu o agrupamento de *Paranapicabea paulista* e *Sematophyllum subpinnatum* (I.I), com *bootstraps* de 16 (MP), 71 (MV) e probabilidade posterior de 50%. Junto dessas duas espécies apareceu o *Colobodontium vulpinum* com *bootstraps* de 14 (MP), 50 (MV) e probabilidade posterior de 50%. Formando um grupo irmão, apareceram os *Acroporium caespitosum* e *Acroporium longirostre* (I.II), com *bootstraps* de 69 (MP), 69 (MV) e probabilidade posterior de 100%. Já no clado I.III, os *bootstraps* foram de 56 (MP), 67 (MV) e probabilidade posterior de 100% para agrupamento de *Pterogoniopsis cylindrica* com o outro agrupamento recorrente de *Acroporium pungens* e *Sematophyllum demissum*, que nesse caso apresentou os *bootstraps* de 23 (MP), 38 (MV) e probabilidade posterior de 100 %.

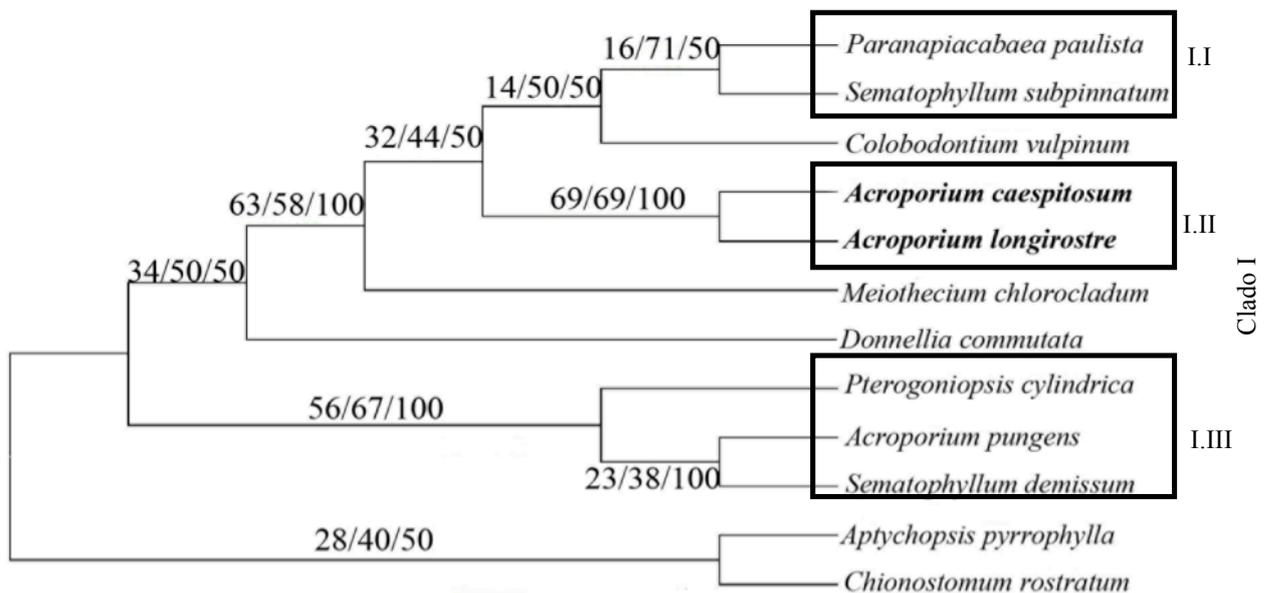


Figura 11 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para o gene *rps4*. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.

Na análise do subgrupo de espécies para o gene *nad5*, houve novamente a separação das espécies em dois clados, clados 1 e 2, com *bootstraps* de 52 (MP), 29 (MV) e probabilidade posterior de 80% (Figura 12). No clado 1.A, ocorreu novamente o agrupamento de *Acroporium caespitosum* e *Acroporium longirostre*, com *bootstraps* de 99 (MP) e 80 (MV). Outro clado que ocorreu foi o clado 1.B, com *Colobodontium vulpinum* e *Meiothecium chlorocladum*, com *bootstraps* de 65 (MP), 42 (MV) e probabilidade posterior de 94%. E novamente notou-se a ocorrência de *Pterogoniopsis cylindrica* com o outro agrupamento recorrente de *Acroporium pungens* e *Sematophyllum demissum*, formando o clado 1.C, que nesse caso apresentou os valores de *bootstraps* baixos.

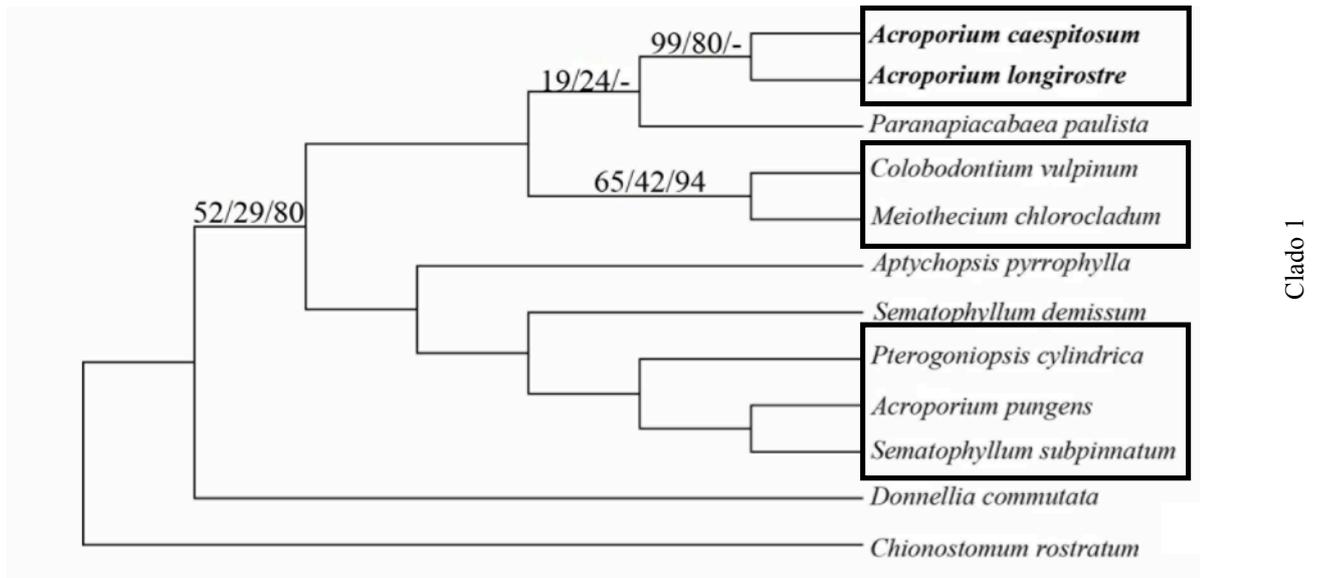


Figura 12 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para o gene *nad5*. As seqüências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.

E, por último, na análise do subgrupo do grupo das Sematophyllaceae tropicais com os genes *rps4* e *nad5* concatenados, novamente vê-se a separação de dois clados, clado A e B, com *bootstrap* de 51 (MP) e 44 (MV) (Figura 13). Novamente *Acroporium caespitosum* e *Acroporium longirostre* apareceram juntos no clado A.I, com *bootstraps* de 99 (MP), 68 (MV) e probabilidade posterior de 83 %. Outro grupo que ocorreu novamente foi o clado A.II, com o *Colobodontium vulpinum* e o *Meiothecium chlorocladum*, com *bootstraps* de 59 (MP), 60 (MV) e probabilidade posterior de 96%. E o clado A.III com *Acroporium pungens*, *Pterogoniopsis cylindrica* e *Sematophyllum demissum* ocorreu novamente nesta análise, com *bootstraps* de 47 (MP), 44 (MV) e probabilidade posterior de 96%.

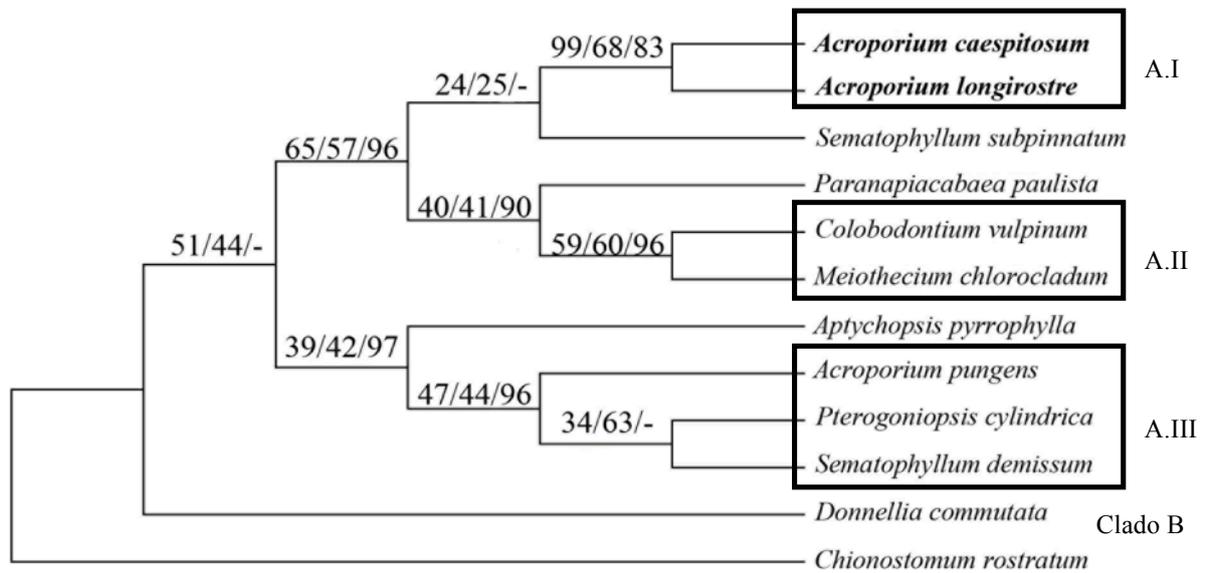


Figura 13 – Árvore consenso das topologias obtidas nas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) do subgrupo de espécies para os genes rps4 e nad5 concatenados. As sequências em negrito foram as obtidas nesse trabalho. Os valores de bootstrap e probabilidades posteriores estão apresentados na ordem: MP/MV/AB.

8 DISCUSSÃO

O gene *rps4* mostrou-se altamente conservado, pois dos 625 sítios, 530 são conservados e, no presente estudo, esse gene não apresentou resolução suficiente mas pode-se observar que o gene *rps4* possui uma quantidade maior de sítios informativos para a parcimônia do que o *rbcL*. Na análise realizada dessa família como um todo, utilizando o *rps4*, que é um marcador de cloroplasto, pôde-se facilmente reconhecer um clado, que possui similaridade com o clado proposto por Tsubota et al. (2001a). Estes utilizaram outro marcador de cloroplasto, o gene *rbcL*, chamou de linhagem-*Sematophyllum*. Já o gene *nad5*, que foi usado na avaliação dos taxons dentro da linhagem-*Sematophyllum*, possui um intron, e apresentou-se bastante variável; dos 1146 sítios, 677 são variáveis.

Ao realizar uma análise acrescentado taxons da América do Sul à linhagem-*Sematophyllum*, as seguintes espécies apareceram no clado: *Acroporium pungens*, *Acroporium caespitosum* (Hedw.) W.R. Buck, *Acroporium longirostre* (Brid.) W.R. Buck, *Acroporium esmeraldicum* (Müll. Hal.) W.R. Buck, *Sematophyllum adnatum* (Michx.) E. Britton, *Sematophyllum demissum* (Wilson) Mitt., *Sematophyllum subpinnatum* (Brid.) E. Britton, *Meiothecium boryanum* (Müll. Hal.) Mitt., *Meiothecium chlorocladum* (Broth.) Broth., *Aptychopsis pyrrophylla* (Müll. Hal.) Wijk & Margad., *Chionostomum rostratum* (Griff.) Müll. Hal., *Schroeterella zygodonta* Herzog, *Pterogoniopsis cylindrica* Müll. Hal., *Donnellia commutata* (Müll. Hal.) W.R. Buck, *Colobodontium vulpinum* (Mont.) S.P. Churchill & W.R. Buck e *Paranapiacabaea paulista* W.R. Buck & Vital (Figura 8, 9, 10). Com exceção de *C. rostratum*, todas essas plantas são tropicais. No outro clado também apareceram plantas que, segundo o trabalho de Tsubota et al. (2001a), estariam incluídas na linhagem-*Sematophyllum*, como *Papillidiopsis complanata* (Dixon) W.R. Buck & B.C. Tan, *Trichosteleum papillosum* (Hornsch.) A. Jaeger, *Meiothecium revolubile* Mitt., *Acroporium secundum* (Reinw. & Hornsch.) M. Fleisch., e *Acroporium pungens* (Hedw.) Broth., possivelmente porque foi usado um outro gene, o *rps4*, que comparado com o gene *rbcL* utilizado por Tsubota et al. (2001a), fornece uma quantidade maior de sítios informativos para a parcimônia (STECH & QUANDT, 2010).

Um clado recorrente foi o de *Sematophyllum subpinatum* e *Paranapiacabaea paulista* (Figuras 11, 12 e 13). Corroborando com os achados de Câmara (2006), que ao analisar a posição do gênero *Paranapiacabaea* utilizando de três marcadores plastidiais, sugeriu a sua inclusão dentro do gênero *Sematophyllum*, pois a diferenciação entre esses gêneros ocorre somente pelo esporófito, quando presente.

No presente estudo os táxons *Acroporium* se mostraram polifiléticos, *Acroporium caespitosum* e *A. longirostre*, duas espécies que não estavam inclusas no trabalho de Hedenäs et al. (2008), se apresentaram distantes dos três gêneros apresentados por eles, *Radulina* W.R. Buck & B.C. Tan, *Trichosteleum* Mitt. e *Papillidiopsis* (Broth.) W.R. Buck & B.C. Tan (FIGURAS 11, 12 e 13). Já em outro trabalho Hedenäs & Buck (1999), propõem que o *Acroporium* seja dividido em vários grupos menores. *Acroporium longirostre* e *Acroporium caespitosum*, que formaram um clado monofilético bem suportado, são espécies oriundas do Novo Mundo, e o *Acroporium pungens*, que apareceu em outro um clado polifilético, é oriundo do Velho Mundo. As espécies de *Acroporium* do Novo Mundo, que possuem cápsula ereta e peristômio reduzido, já pertenceram ao gênero *Schraderobryum* M. Fleisch., descrito em 1923 por Fleischer. Em 1993, Buck & Schäfer-Verwimp os transferiram para *Acroporium*.

A separação das três espécies de *Acroporium caespitosum*, ocorreu porque as três espécies foram retidas de exsicatas de herbários, o que indica provavelmente que ocorreu uma identificação errada para essas plantas.

A polifilia do *Acroporium* pode ser explicada pela suposição de que as espécies asiáticas são diferentes das espécies existentes nas Américas, principalmente em se tratando da morfologia, em que o formato e o tamanho do filídio são bem diferentes nos dois Mundos. Nos resultados apresentados, os gêneros que formaram um clado monofilético com os *Acroporium* foram *Paranapiacabaea*, *Colobodontium*, *Sematophyllum* e *Meiothecium*, todas espécies pertencentes ao Novo Mundo, mas de acordo com Akiyama & Tsubota (2001), Tan & Chang (2004), Tsubota et al. (2001a e 2002) que colocam o *Meiothecium* e *Sematophyllum*, mas eles incluíram outros gêneros juntos, como *Papillidiopsis*, *Piloecium*, *Radulina*, , *Trichosteleum* e *Warburgiella* junto com *Acroporium* do Velho Mundo. Como as espécies do gênero *Acroporium* não são monofiléticas, mais estudos são necessários para a sua revisão.

O gênero *Colobodontium* é um gênero monotípico, restrito às terras baixas neotropicais, principalmente ao norte e oeste da Bacia Amazônica. Não há na literatura nenhuma informação sobre sua posição dentro da família Sematophyllaceae, ou seja, nesse estudo sua posição filogenética é tratada pela primeira vez, e apareceu com frequência junto do gênero *Meiothecium*, formando um clado monofilético com suporte moderado (Figuras 11, 12 e 13). Esses dois gêneros possuem algumas características em comum. As características mais úteis para distinguir o gênero de *Colobodontium* são os filídios obovados a amplamente ovais, cápsulas eretas a sub-eretas, base ampla e abruptamente estreitada, dentes do exostômio distalmente papilosas, membrana basal quase ausente com segmentos rudimentares ou filiformes. Já o *Meiothecium* possui filídios mais ou menos ovados, possuindo também cápsulas eretas a sub-eretas, como o *Colobodontium*, e os dentes do exostômio são espaçados e também papilosos. Ou seja, as características em comum desses dois gêneros são encontradas, em sua maioria, no esporófito.

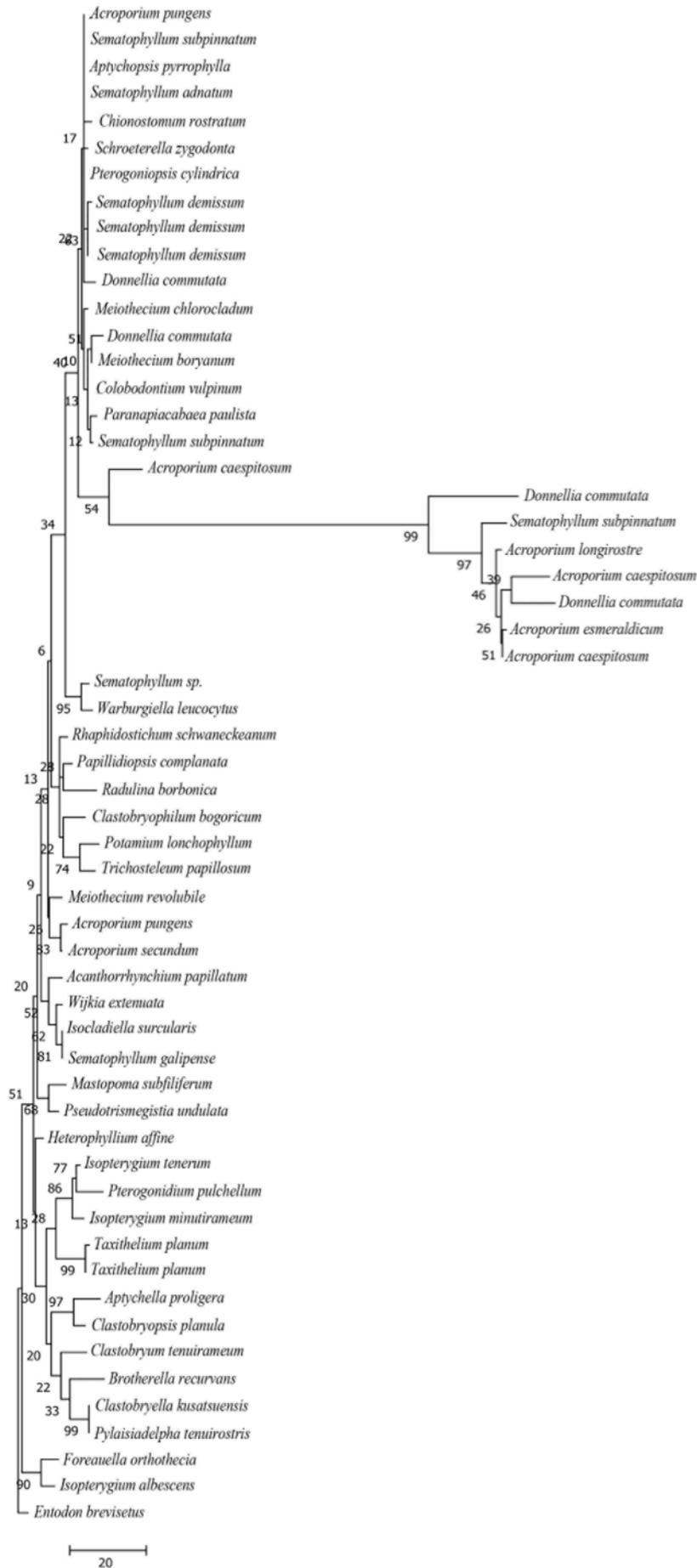
Para os clados de *Pterogoniopsis cylindrica*, *Acroporium pungens* e *Sematophyllum demissum* (Figuras 11 e 12), somente na análise dos genes concatenados houve mudança da posição de *P. cylindrica* e *A. pungens* (Figura 13). Em três trabalhos diferentes utilizando os marcadores *trnL-trnF* e *rps4* (BUCK et al., 2000a; BUCK et al., 2000b) ou somente o marcador *rps4* (GOFFINET et al., 2001), o *A. pungens* e o *S. demissum* apareceram juntos como nos resultados apresentados aqui. O *S. demissum* sempre dentro do grupo monofilético com uma espécie do gênero *Trichosteleum* e o *A. pungens* monofilético a esse grupo. O *S. demissum* e o *A. pungens* também apareceram da mesma forma, mas o clado formado com o *S. demissum* foi com o gênero monotípico *Pterogoniopsis*. Também não há na literatura nenhuma informação sobre sua posição dentro da família Sematophyllaceae, sendo também tratada pela primeira vez nesse estudo. Morfologicamente, o gênero *Pterogoniopsis* é frequentemente confundido com o gênero *Paranapiacabaea*, pois ambos apresentam o mesmo formato de filídios e ambos possuem dentes do exostômio papilosos e segmentos do endostômio tão altos quanto ou mais altos que os dentes do exostômio, mas a análise molecular mostrou que são dois gêneros distantes. Fleischer (1923), com base somente na morfologia e sem nenhuma razão específica (BUCK, 1989), posicionou *Pterogoniopsis* junto com o gênero *Donnellia*, e considerou esses dois gêneros como derivados do gênero *Chionostomum*. Nos

resultados, os clados que foram formados junto com o gênero *Pterogoniopsis* se mostraram parafiléticos com o gênero *Donnellia* (Figuras 11, 12 e 13), e o gênero *Chionostomum* apareceu em outro clado completamente diferente (Figuras 8, 9 e 10).

Com base nos dados apresentados nesse trabalho, pode-se dizer que o uso de dois marcadores, plastidial e mitocondrial, não foi suficiente para se resolver a circunscrição de um grupo da família Sematophyllaceae. O uso de uma quantidade maior de marcadores e a análise da morfologia juntamente com a filogenia poderão acarretar em uma circunscrição bem mais definida dessa família.

Como a Ordem Hypnales passou por um período rápido de diversificação no início de sua história, podemos ver no filograma da família Sematophyllaceae (Figura 14), que os ramos são muito curtos, eles são um indicativo dessa rápida diversificação, ou seja, para se conseguir elucidar as relações da família Sematophyllaceae, é necessário uma quantidade muito grande de dados, pois os musgos pleurocárpicos ainda estão em processo de especiação.

Figura 14 Filograma de Máxima Parcimônia da Família Sematophyllaceae, com o marcador *rps4*.



9 PERSPECTIVAS

Esse estudo é apenas uma análise preliminar das relações filogenéticas da família Sematophyllaceae. Para análises futuras a consideração de alguns pontos seriam essenciais:

- Amostragem mais extensa das espécies, com mais espécies de cada gênero, como por exemplo, o *Sematophyllum*, que só no Brasil apresenta dezoito espécies, e no presente estudo, somente quatro espécies foram usadas;
- Inclusão de mais marcadores, como marcadores nucleares, além de uma quantidade maior marcadores plastidiais e mitocondriais;
- Estudo da ecologia desses espécies também pode ser um fator que ajude na resolução da filogenia, já que essas plantas são morfologicamente muito parecidas;
- Estudos morfológicos e morfométricos mais aprofundados também podem ser adicionados.

Como vários estudos de revisão de espécies e famílias estão em desenvolvimento, eles podem futuramente esclarecer melhor as relações filogenéticas de qualquer família de briófitas.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J.L. & NOBEL, P.S. Microhabitats and Water Relations of Epiphytic Cacti and Ferns in a Neotropical Forest. **Biotropica**, 29(3): 261-270. 1997.
- ASAKAWA, Y. Biologically active compounds from bryophytes. **Pure and Applied Chemistry**, 74(9):557-580. 2007.
- AKIYAMA, H. & TSUBOTA, H. Pseudotrimegistia H. Akiy. & Tsubota, a new genus of the Sematophyllaceae. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**. 52:85-95. 2001.
- BATES, J.W. Regional Calcicoly in the Moss *Rhytidiadelphus triquetrus*: Survival and Chemistry of Transplants at a Formerly SO₂-polluted Site with Acid Soil. **Annals of Botany**, 72: 449-455. 1993.
- _____. Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. In GOFFINET, B. & SHAW, J.A. (Eds.), **Bryophyte Biology**. Cambridge:Cambridge University Press, 2009. p.299-356. 2ª Edição. 2009.
- BECKERT, S.; STEINHAUSER, S.; MUHLE, H. & KNOOP, V. A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial *nad5* gene. **Plant Systematics and Evolution**, 218: 179–192. 1999.
- BERLUNG, H. & JONSSON, B.G. Predictability of plant and fungal species richness of old-growth boreal forest islands. **Journal of Vegetation Science**, 12: 857-866. 2001.
- BROTHERUS, V. F. Bryales, Teil I. In ENGLER, H. G. A. & PRANTL, K. A. E. (Eds.) **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. Verlag von Wilhelm Engelmann: Leipzig. 1909.
- BUCK, W. R. The Status of the South American Moss Genus *Syringothecium*. **The Bryologist**, 92(4): 529-532. 1989.

_____; COX, C.J.; SHAW, A. J. & GOFFINET, B. Ordinal relationships of pleurocarpous mosses, with special emphasis on the Hookeriales. **Systematics and Biodiversity**, 2: 121–145. 2005.

_____ & GOFFINET, B. Morphology and classification of mosses. *In* Shaw & Goffinet, **Bryophyte Biology**, Cambridge University Press, p 72–124. 2000.

_____ & SCHÄFER-VERWIMP, A. A Reassessment of Schraderebryum (Sematophyllaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. 7(3): 645-654. 1993.

_____ & TAN, B.C. The Asiatic genera of Sematophyllaceae associated with *Trichosteleum*. **Acta Bryolichenologica Asiatica**, 1: 5-19. 1989.

_____ & COX, C.J.; SHAW, A.J. & GOFFINET, B. Ordinal relationships of pleurocarpous mosses, with special emphasis on the Hookeriales. **Systematics and Biodiversity**, 2(2): 121-145. 2004.

_____; GOFFINET, B. & SHAW, A. J. Testing morphological concepts of orders of pleurocarpous mosses (Bryophyta) using phylogenetic reconstructions based on trnL-trnF and rps4 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 16(2):180-198. 2000a.

_____; _____ & _____. Novel Relationships in Pleurocarpous Mosses as Revealed by cpDNA Sequences. **The Bryologist**, 103(4): 774-789. 2000b.

CÂMARA, P.S. Molecular Contribution on the Systematics Placement of the Moss Genus *Paranapiacabeae*. **Boletim do Instituto de Botânica**, 18: 159-162. 2006.

_____. Métodos de extração de DNA de Bryophyta para análises filogenéticas. **Heringeriana**, 3:11-17. 2010.

CAPESIUS, I. A molecular phylogeny of bryophytes based on the nuclear encoded 18S rRNA genes. **Journal of Plant Physiology**, 146: 59–63. 1995.

CLEAVITT, N. Patterns, Hypotheses and Processes in the Biology of Rare Bryophytes. **The Bryologist**, 108(4): 554-566. 2005.

- COSTA, D.P.; CÂMARA, P.S.; PORTO, K.C.; LUIZI-PONZO, A.P. & ILKIU-BORGES, A.L. Musgos *In Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB096933>). 2011.
- COX, C. J.; GOFFINET, B.; SHAW, A. J. & BOLES, S. Phylogenetic relationships among the mosses based on heterogeneous Bayesian analyses of multiple genes from multiple genomic compartments. **Systematic Botany**, 29: 234–250. 2004.
- CROSBY, M.R.; MAGILL, R.E.; ALLEN, B. & HE, S. **A Checklist of the Mosses**. Versão 20 dezembro de 1999. p 317. disponível na internet, www.mobot.org. 2000.
- CRUM, H. A. **Structural Diversity of Bryophytes**. Ann Arbor: University of Michigan. 2001.
- DE LUCA, T.H.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C. & SELLSTEDT, A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. **Nature**, 419: 917-920. 2002.
- DE LUNA, E.; BUCK, W.R.; AKIYAMA, H.; ARIKAWA, T.; TSUBOTA, H.; GONZÁLEZ, D.; NEWTON, A.E. & SHAW, A.J. Ordinal Phylogeny within the Hypnobryalean Pleurocarpous Mosses Inferred from Cladistic Analyses of Three Chloroplast DNA Sequence Data Sets: *trnL-F*, *rps4*, and *rbcL*. **The Bryologist**, 103(2): 242-256. 2000.
- _____; NEWTON, A.E.; WITHEY, A.; GONZALEZ, D. & MISHLER, B.D. The transition to pleurocarpy: a phylogenetic analysis of the main diplolepidous lineages based on *rbcL* sequences and morphology. **The Bryologist**, 102(4): 634-650. 1999.
- DELFANTI, R.; PAPUCCI, C. & BENCO, C. Mosses as indicators of radioactivity deposition around a coal-fired power station. **The Science of The Total Environment**, 227(1): 49-56. 1999.
- DELUCIA, E. H.; TURNBULL, M.H.; WALCROFT, A.S.; GRIFFIN, K.L.; TISSUE, D.T.; GLENNY, D.; MCSEVENY, T.M. & WHITEHEAD, D. The contribution of bryophytes to the carbon exchange for a temperate rainforest. **Global Change Biology**, 9(8), 1158-1170. 2003.

DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11–15. 1987.

ELDRIDGE, D.J. Trampling of microphytic crusts on calcareous soils, and its impact on erosion under rain-impacted flow. *Catena*, 33, 221 - 239. 1998.

FLEISCHER, M. Laubmoose. **Nova Guinea : résultats de l'expédition scientifique néerlandaise à la Nouvelle-Guinée**, 8(2): 735-753. 1912.

_____. **Die Musci der Flora von Buitenzorg**, V. 4. Brill: Leiden. 1923.

FRAHM, J.-P. Recent Developments of Commercial Products from Bryophytes. **The Bryologist**, 107 (3): 277 – 283. 2004.

GANGULEE, H.C. Mosses of Eastern India and adjacent regions. **A monograph. Fascicle 8. Hypnobryales, Hypninae**. Calcutta. p.1753-2042. 1980.

GARBARY, D.J. & RENZAGLIA, K.S. Bryophyte phylogeny and the evolution of land plants: Evidence from development and ultrastructure. In: Bates, J.W.; Ashton, N.W. & Duckett, J.G. (Eds). **Bryology for the Twenty-first Century**. Leeds: Maney Publishing. Pp. 45-63. 1998.

_____; _____ & DUCKETT, J. G. The phylogeny of land plants: A cladistic analysis based on male gametogenesis. **Plant Systematics and Evolution**, 188 : 237–269. 1993.

GIOVANI, C.; NIMIS, P.L.; BOLOGNINI, G.; PADOVANI, R. & USCO, A. Bryophytes as indicators of radiocesium deposition in northeastern Italy. **Science of The Total Environment**, 157: 35-43. 1994.

GLIME, J. M. Economic and Ethnic Uses of Bryophytes. In **Flora of North America**, pp. 14 - 41. 2007.

GOFFINET, B. & BUCK, W. R. Systematics of Bryophytes (Mosses): From Molecules to a Revised Classification. In GOFFINET, B.; HOLLOWELL, V., & MAGILL, R. (Eds.): Molecular Systematics of Bryophytes. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, 98: 205-239. Missouri: Missouri Botanical Garden Press. 2004.

_____ & SHAW, A.J. **Bryophyte Biology**. Cambridge: Cambridge University Press. 2009.

_____; COX, C.J.; SHAW, A.J. & HEDDERSON, T.A.J. The Bryophyta (Mosses): Systematic and Evolutionary Inferences from an rps4 Gene (cpDNA) Phylogeny. **Annals of Botany**, 87(2): 191-208. 2001.

GUINDON, S. & GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, 52: 696-704. 2003.

HEDENÄS, L. & BUCK, W.R. A Phylogenetic analysis of the Sematophyllaceae. **Lindbergia**, 24: 103-132. 1999.

_____; TAN, B.C. & CHANG, Y. Morphological and Molecular Data Suggest Different Evolutionary Relationships Among Species of *Acroporium* and Closely Related Genera (Sematophyllaceae). In MOHAMED, H.; BAKI, B.B.; NASRULHAQ-BOYCE, A. & LEE, P.K.Y. (Eds.) **Bryology in the New Millennium**. Kuala Lumpur: University of Malaya, pp.259-276. 2008.

HORI, H.; LIM, B.-L. & OSAWA, S. Evolution of Green Plants as Deduced from 5S rRNA Sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83 (3): 820 – 823. 1985.

HYLANDER, K. & JONSSON, B.G. The Conservation Ecology of Cryptogams. **Biological Conservation**, 135:311-314. 2007.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Desenvolvido pela International Union for Conservation of Nature and Natural. (<http://www.iucnredlist.org/>). 2011.

JIA, Y., WU, P.-C. & TAN, B.C. **Moss Flora of China** (English version): Sematophyllaceae, 8: 40. 2005.

JONGMANS, A.G.; BREEMEN, van N.; GRADSTEIN, S.R. & OORT, van F. How liverworts build hanging gardens from volcanic ash in Costa Rica. **Catena**, 44(1): 13-22. 2001.

KENRICK, P.R. & CRANE, P.R. The origin and early evolution of land plants. **Nature**, 389:33-39. 1997.

- LA FARGE-ENGLAND, C. Growth form, branching pattern, and perichaetial position in mosses: cladocarpy and pleurocarpy redefined. **The Bryologist**, 99:170-186. 1996.
- LONGTON, R.E. The role of bryophytes and lichens in terrestrial ecosystems. In BATES, J.W. & FARMER, A.M. (Eds.) **Bryophytes in a Changing Environment**. Oxford: Clarendon Press. p.32-76. 1992.
- MALEK, O., LATTIG, K.; HIESEL, R.; BRENNICKE, A. & KNOOP, V. RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. **The European Molecular Biology Organization Journal**, 15: 1403-1411. 1996.
- MERGET, B. & WOLF, M. A molecular phylogeny of Hypnales (Bryophyta) inferred from ITS2 sequence-structure data. **BMC Research Notes**, 3: 320-327. 2010.
- MERRIFIELD, K. & INGHAM, R.R. Nematodes and other aquatic invertebrates in *Eurhynchium oregonum* from Mary's Peak, Oregon Coast Range. **The Bryologist**, 101: 505-511. 1998.
- MISHLER B. D.; THRALL, P. H.; HOPPLE, J. S; DE LUNA, E. & VILGALYS, R. A Molecular Approach to the Phylogeny of Bryophytes: Cladistic Analysis of Chloroplast-Encoded 16S and 23S Ribosomal RNA Genes. **The Bryologist**, 95 (2):172–180. 1992.
- _____ & CHURCHILL, S.P. A cladistic approach to the phylogeny of "bryophytes." **Brittonia**, 36:406-424. 1984.
- _____; LEWIS, L.A.; BUCHHEIM, M.A; RENZAGLIA, K.S.; GARBARY, D.L.; DELWICHE, C.F.; ZECHMAN, F.W.; KANTZ, T.S. & CHAPMAN, R.L. Phylogenetic relationships of the "green algae" and "bryophytes". **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 81: 451-483. 1994.
- MORGAN, J.W. Bryophyte Mats Inhibit Germination of Non-native Species in Burnt Temperate Native Grassland Remnants. **Biological Invasions**, 8: 159-168. 2006.
- NADOT, S.; BAJON, R. & LEJEUNE, B. The chloroplast gene *rps4* as a tool for study of Poaceae phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, 191:27-38. 1994.

- NEWTON, A.E.; COX, C.J.; DUCKETT, J.G.; WHEELER, J.A.; GOFFINET, B.; HEDDERSON, T.A.J & MISHLER, B.D. Evolution of the Major Moss Lineages: Phylogenetic Analyses Based on Multiple Gene Sequences and Morphology. **The Bryologist**, 103(2): 187-211. 2000.
- NICKRENT, D.L.; PARKINSON, C.L.; PALMER, J.D. & DUFF R.J. Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. **Molecular Biology and Evolution**, 17(12): 1885-1895. 2000.
- NISHIYAMA, T.; WOLF, P. G.; KUGHITA, M.; SINCLAIR, R. B.; SUGITA, M.; SUGIURA, C.; WAKASUGI, T.; YAMADA, K.; YOSHINAGA, K.; YAMAGUCHI, K.; EUDA, K. & HASEBE, M. Chloroplast phylogeny indicates that bryophytes are monophyletic. **Molecular Biology and Evolution**, 21: 1813-1819. 2004.
- OLSSON, S.; BUCHBENDER, V.; ENROTH, J.; HEDENÄS, L.; HUTTUNEN, S. & QUANDT, D. Phylogenetic analyses reveal high levels of polyphyly among pleurocarpous lineages as well as novel clades. **The Bryologist**, 112(3): 447-466. 2009.
- OTERO, S.; CEZÓN, K.; MARTÍNEZ-ABAIGAR, J. & NÚÑEZ-OLIVERA. Ultraviolet-absorbing capacity of aquatic bryophytes from Tierra del Fuego (Argentina). **Journal of Bryology**, 30: 290–296. 2008.
- PANT, G. & TEWARI, S. D. Bryophytes and mankind. **Ethnobotany**, 2: 97-103. 1990.
- PARKER, J.D., BURKEPILE, D.E., COLLINS, D.O., KUBANEK, J. & HAY, M.E. Stream mosses as chemically-defended refugia for freshwater macroinvertebrates. **Oikos**, 116:302-312. 2007.
- PECK, J.E. Towards sustainable commercial moss harvest in the Pacific Northwest of North America. **Biological Conservation**, 128: 289-297. 2006.
- PHARO, E. J. & BLANKS, P. A. M. Managing a neglected component of biodiversity: a study of bryophyte diversity in production forests of Tasmania's northeast. **Australian Forestry**, 63(2): 128-135. 2000.

_____; KIRKPATRICK, J.B.; GILFEDDER, L.; MENDEL, L. & TURNER, P.A.M. Predicting bryophyte diversity in grassland and eucalypt-dominated remnants in subhumid Tasmania. **Journal of Biogeography**, 32: 2015-2024. 2005.

POSADA, D. *In press*. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**. 2008.

PROCTOR, M.C.F. Physiological ecology. In GOFFINET, B. & SHAW, J.A. (Eds.), **Bryophyte Biology**. Cambridge:Cambridge University Press, 2009. p.237-268. 2^a Edição. 2009.

QIU, Y.-L.; LI, L.; WANG, B.; CHEN, Z.; KNOOP, V.; GROTH-MALONEK, M.; DOMBROVSKA, O.; LEE, J.; KENT, L.; REST, J.; ESTABROOK, G.F.; HENDRY, T.A.; TAYLOR, D.W.; TESTA, C.M.; AMBRS, M.; CRANDALL-STOTLER, B.; DUFF, R.J.; STECH, M.; FREY, W.; Quandt, D. & Davis, C.C. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 103: 15511-15516. 2006.

RAMSAY, H.P., SCHOFIELD, W.B. & TAN, B.C. The family Sematophyllaceae (Bryopsida) in Australia. Part 1: Introduction, family data, key to genera and the genera Wijkia, Acanthorrhynchium, Trismegistia and Sematophyllum. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 92: 1-50. 2002.

_____, _____ & _____. The family Sematophyllaceae (Bryopsida) in Australia. Part 2. Acroporium, Clastobryum, Macrohymenium, Meiotheciella, Meiothecium, Papillidiopsis, Radulina, Rhabdorrhynchium, Trichosteleum, and Warburgiella. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 95: 1- 69. 2004.

RENZAGLIA, K. S., SCHUETTE, S., DUFF, R. J., LIGRONE, R., SHAW, A. J., MISHLER, B. D., & DUCKETT, J. G. Bryophyte phylogeny: Advancing the molecular and morphological frontiers. **The Bryologist**, 110(2), 179-213. 2007.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19:1572-1574. 2003.

SAXENA, D.K. & HARINDER, Uses of bryophytes. **Resonance**, 9(60): 56-65. 2004.

- SCHOFIELD, W.B. **Introduction to Bryology**. Caldwell: The Blackburn Press. 1985.
- SEKI, T. A revision of the family Sematophyllaceae of Japan with special reference to a statistical demarcation of the family. **Journal of Science of Hiroshima University** 12:1–80. 1968.
- SÉRGIO, C.,; ARAUJO, M. & DRAPPER, D. Portuguese bryophyte diversity and priority areas for conservation. **Lindbergia**, 25: 116-123. 2000.
- SHAW, A.J. Biogeographic patterns and cryptic speciation in bryophytes. **Journal of Biogeography**, 28(2): 253-261. 2001.
- _____ & RENZAGLIA, K.S. Phylogeny and diversification of bryophytes. **American Journal of Botany**, 91:1557-1581. 2004.
- _____; COX, C.J.; GOFFINET, B.; BUCK, W.R. & BOLES, S.B. Phylogenetic Evidence of a Rapid Radiation of Pleurocarpous Mosses (Bryophyta). **Evolution**, 57(10):2226-2224. 2003.
- _____; SZOVENYI, P. & SHAW, B. Bryophyte diversity and evolution: Windows into the early evolution of land plants. **American Journal of Botany**, 98(3): 1-18. 2011.
- SIEBERT, A., BRUNS, I., KRAUSS, G.-J., MIERSCH, J. & MARKERT, B. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals : 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. **Science of The Total Environment** 177(1-3): 137-144. 1996.
- STECH, M. & QUANDT, D. 20,000 species and five key markers: The status of molecular bryophyte phylogenetics. **Phytotaxa**, 9:196 - 228. 2010.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731 – 2739. 2011

TAN, B. C. Bryophytes (mosses). In: WINTER, W. P. de & AMOROSO, V. B. (Eds). **Cryptogams: Ferns and Fern Allies**. Leiden: Backhuys Publishers. Pp. 195–200. 2003.

_____ & BUT, P.P.-H. A revision of post-war collections of Hong Kong Sematophyllaceae. **Journal of Bryology**, 19: 787-798. 1997.

_____ & CHANG, Y. Molecular contribution to the systematic position of *Mastopoma scabrifolium* (Broth. in Moell.) B. C. Tan & Tran Ninh (Sematophyllaceae, Bryopsida). **Cryptogamie Bryologie**, 25: 301–308. 2004.

_____ & JIA., Y. A preliminary revision of Chinese Sematophyllaceae. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**. 86: 1-70. 1999.

_____ & YU. J. A cladistic study of the family Sematophyllaceae in China. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 84: 49-55. 1998.

TROPICOS.org. Botanical information system at the Missouri Botanical Garden. 15 Jul 2011 <http://www.tropicos.org/Name/35002815>. 2011.

TSUBOTA, H.; AKIYAMA, H.; YAMAGUCHI, T. & DEGUCHI, H. Molecular phylogeny of the Sematophyllaceae (Hypnales, Musci) Based on Chloroplast rbcL Sequences. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 90: 221-240. 2001a.

_____; _____; _____ & _____. Molecular phylogeny of the genus *Trismegistia* and related genera (Sematophyllaceae, Musci) based on chloroplast rbcL sequences. **Hikobia**, 13:529-549. 2001b.

_____; ARIKAWA, T.; AKIYAMA, H.; DE LUNA, E.; GONZALEZ, D.; HIGUCHI, M. & DEGUCHI, H. Molecular Phylogeny of Hypnobryalean mosses as Inferred From a Large-Scale Dataset of Chloroplast rbcL, With Special Reference to the Hypnaceae and Possibly Related Families. **Hikobia**, 13(4): 645-665. 2002.

_____; NAKAO, N.; ARIKAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; HIGUCHI, M.; DEGUCHI, H. & SEKI, T. A Preliminary Phylogeny of Hypnales (Musci) as Inferred from Chloroplast rbcL Sequence Data. **Proceedings of the Bryological Society of Japan - Bryological Research**, 7(8): 233-248. 1999.

_____; _____; YAMAGUCHI, T.; SEKI, T. & DEGUCHI, H. Preliminary Phylogenetic Relationship of the Genus *Brotherella* and Its Allied Genera (Hypnales, Musci) Based on Chloroplast *rbcL* Sequence Data. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 88:79-99. 2000.

TURETSKY, M.R. The Role of Bryophytes in Carbon and Nitrogen Cycling. **The Bryologist**, 106(3): 395-409. 2003

VANDERPOORTEN, A. & GOFFINET, B. **Introduction to Bryophytes**. Cambridge: Cambridge University Press. 2009.

_____ & HALLINGBÄCK, T. Conservation Biology. In GOFFINET, B. & SHAW, J.A. (Eds.), **Bryophyte Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p.357-391. 2ª Edição. 2009.

WATERS, D. A.; BUCHHEIM, M. A.; DEWEY, R. A. & CHAPMAN, R. L. Preliminary Inferences of the Phylogeny of Bryophytes from Nuclear-Encoded Ribosomal RNA Sequences. **American Journal of Botany**, 79(4): 459–466. 1992.

ZAMFIR, M. Effects of bryophytes and lichens on seedling emergence of alvar plants: evidence from greenhouse experiments. **Oikos**, 88:603-611. 2000.