

PROJETO DE PESQUISA

Título: Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) de biomas da região sul do Brasil

Candidata: Nadia Martins Lemes da Silva

Supervisores: Dr. Luis Henrique Zanini Branco (IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto)

Dr. Juan C. López Bautista (Universidade do Alabama, EUA)

Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE/UNESP, câmpus de São José do Rio Preto, Departamento de Zoologia e Botânica

Período: agosto de 2013 a julho de 2015 (24 meses)

1. Resumo

Trentepohliales é um dos grupos mais representativos da microflora de ambientes terrestres e ainda pouco conhecido. Embora alguns levantamentos de flora tenham sido feitos, a flora e os fatores e processos que influenciam a diversidade desses organismos ainda permanecem pobremente conhecidos em grande parte dos biomas mundiais. Isto é válido também para os biomas brasileiros, onde estima-se que a diversidade de espécies é elevada e que podem representar um *hotspot* de biodiversidade para as Trentepohliales. Esse trabalho propõe o estudo das Trentepohliales em biomas da região sul do Brasil, intencionando fornecer informações florísticas, biogeográficas, ecológicas e filogenéticas do grupo e complementar as informações obtidas para outras áreas do Brasil e do continente americano. O estudo será realizado em 10 unidades de conservação, distribuídas no sul do país e abrangerá os quatro principais biomas que compõem esta região: floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, floresta estacional e campos. As coletas de material biológico deverão acontecer uma vez em cada unidade de conservação, onde as massas de Trentepohliales serão procuradas aleatoriamente dentro da maior área possível, sendo que para cada amostra recolhida serão tomados dados ambientais (umidade, temperatura e tipo e pH do substrato) e de posicionamento geográfico. As amostras coletadas serão destinadas ao detalhamento morfológico (hábito, características da massa, morfometria de células vegetativas e estruturas de reprodução) e estudo molecular, utilizando os marcadores SSU, *rbcL* e ITS.

2. Abstract

Trentepohliales is one of the most representative groups of the microflora from terrestrial environments. Although some floristic surveys have been carried out, the Trentepohliales flora still remains poorly known for the majority of the biomes of the world. This is also valid for the Brazilian biomes where species diversity is expected to be high and may represent a biodiversity hotspot for the Trentepohliales. Since they are abundant in these environments and therefore ecologically relevant, this research aims the study of the Trentepohliales in biomes from southern Brazil, in order to provide floristic, biogeographic,

ecological and phylogenetic information to complete the available data to other areas of Brazil and Americas. The study will be carried out in 10 protected areas, distributed throughout the Brazilian southern region and covering four major Brazilian biomes: rainforest, *Araucaria* forest, seasonal forests and grasslands. Samplings of algal growth will occur once in each protected area by random collection within the largest area possible. For each sample will be presented information of environmental data (humidity, temperature, pH and substrate type) and geographical position. Samples will be transferred to the laboratory for morphological evaluation (habit, mass characteristics, size and form of the vegetative cells and reproductive structures) and molecular study using SSU, *rbcL* and ITS markers.

3. Introdução

Os organismos fotossintéticos oxigênicos que vivem em ambientes terrestres fazem parte de um grupo muito heterogêneo e que representam diversas linhagens evolutivas. Embora as plantas vasculares sejam os elementos mais exuberantes, notáveis e morfologicamente complexos desses ambientes, esse conjunto de organismos também inclui um grande número de algas, as quais podem ocorrer em todos os tipos de habitat terrestres, incluindo os mais extremos (RINDI et al., 2009a).

Das linhagens de algas que conquistaram o ambiente terrestre, as algas verdes pertencentes à Streptophyta e Chlorophyta, além de Cyanobacteria, foram as que obtiveram o maior sucesso na colonização, embora representantes de outros grupos (p. ex. Bacillariophyta) possam ser, eventualmente, encontrados (AKINSOJI, 1991; HOFFMANN, 1989; NAKANO et al., 1991; BÜDEL et al., 1997; LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2007).

As algas verdes terrestres formam um grupo polifilético, originado de diversas colonizações independentes do continente, por diferentes linhagens de algas aquáticas, marinhas e dulcícolas (LEWIS & MCCOURT, 2004; LEWIS, 2007; CARDON et al., 2008). Entre essas, estão as Ulvophyceae, um grupo composto predominantemente por organismos marinhos (SLUIMAN, 1989), mas que inclui também as Trentepohliales, uma importante ordem de algas terrestres (LÓPEZ-BAUTISTA & CHAPMAN, 2003).

Trentepohliales pode ser considerado um dos principais grupos de algas terrestres devido ao número e abundância das espécies (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2007). A presença de substâncias semelhantes à esporopolenina na parede das células (GOOD & CHAPMAN, 1978) e um padrão especial de carboidratos e alcoóis (FEIGE & KREMER, 1980; PATTERSON & VAN VALKENBURG, 1991) são provavelmente características adaptativas contra a dessecação no ambiente terrestre (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2002).

A maioria das formas possui um colorido brilhante, variando de amarelo a vermelho, devido à astaxina (hematocromo), um pigmento carotenóide que recobre a clorofila (THOMPSON & WUJEK, 1997). Além da coloração, os organismos dessa ordem distinguem-se de todas as outras algas verdes por uma combinação única de características, que inclui a ausência de pirenoídes no cloroplasto, aparato flagelar diferenciado, parede transversal da célula com plasmodesmos e ocorrência de esporângio lateral, uma estrutura de reprodução altamente diferenciada (RINDI et al., 2006).

Os organismos dessa ordem possuem células uni ou multinucleadas, os cloroplastos muitas vezes são parietais, podendo também ser discóides, em forma de fita ou reticulados. Os indivíduos são geralmente filamentosos, unisseriados e ramificados, ou são discos pseudoparenquimatosos e monoestromáticos prostrados. Outras formas são muito reduzidas e constituídas somente por um pequeno filamento vegetativo com poucas células (CHAPMAN, 1984; LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2002).

Trentepohliales compreende uma família, Trentepohliaceae, que contém, de acordo com critérios morfológicos, cinco (*Cephaleuros*, *Phycopeltis*, *Stomatochroon*, *Trentepohlia* e *Printzina*) ou seis gêneros (incluindo *Physolinum*), dependendo da classificação adotada. Atualmente, são reconhecidas, aproximadamente, 70 espécies pertencentes a essa ordem, no entanto existem conflitos sobre a circunscrição de gêneros e muitas espécies possuem posição taxonômica incerta (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2007).

Com relação à história filogenética, esse grupo ainda permanece pobremente caracterizado. Alguns gêneros são filogeneticamente resolvidos, como é o caso de *Cephaleuros*, um clado monofilético bem suportado com base em informações moleculares (LÓPEZ-

BAUTISTA et al., 2006). Outros ainda possuem circunscrição confusa, como são os casos de *Trentepohlia* e *Printzina* (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2006).

Membros desse grupo já foram registrados em levantamentos de várias regiões mundiais. Para o continente australiano, os trabalhos existentes sobre esses organismos foram realizados por Cribb (1958a, 1958b, 1963, 1967, 1968, 1970, 1972, 1987, 1989, 1993) e dizem respeito somente ao gênero *Trentepohlia*. Na Europa, foram reportadas espécies de *Trentepohlia* e *Printzina* por Rindi & Guiry (2003), em ambientes urbanos na Irlanda, e por Rindi et al. (2003), na França. Na Ásia, foram encontradas espécies de *Phycopeltis*, por Neustupa (2003, 2005), e de *Trentepohlia*, por Islam (1960). Jose & Chowdar (1980) e Panikkar & Sindhu (1993) encontraram espécies de *Trentepohlia* no território indiano e Brooks (2004) registrou espécies de *Cephaleuros*, *Phycopeltis* e *Stomatochroon* nas Ilhas Samoa. Tracanna (1989) encontrou espécies de *Trentepohlia* na Argentina. Alguns estudos sobre os organismos da ordem foram realizados em regiões tropicais, incluindo as Ilhas Havaianas (RINDI et al., 2005), África (RINDI et al., 2006), Guiana Francesa (RINDI & LÓPEZ-BAUTISTA, 2007, 2008), Panamá (RINDI et al., 2008) e Brasil (AKIYAMA, 1971; BICUDO & SANTOS, 2001; LEMES-DA-SILVA et al., 2010).

Apesar de terem sido registradas em todos os continentes, os padrões de distribuição geográfica desse grupo de algas terrestres são pobremente estudados e ainda pouco compreendidos, principalmente devido à falta de conhecimento da diversidade desses organismos (RINDI et al., 2009a). A informação mais concreta referente a essas questões é a de que, florestas tropicais, altamente úmidas, são ambientes favoráveis ao desenvolvimento de algas terrestres (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2007). Esses ambientes estão entre os mais diversos ecossistemas do planeta e com grande número de táxons endêmicos (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2007), como vem sendo demonstrado também para as Trentepohliales (RINDI & LÓPEZ-BAUTISTA, 2008; RINDI et al., 2008).

A área do território brasileiro compreende uma grande variedade de biomas e, assim como a maioria das regiões tropicais, ainda pouco conhecidos quanto a diversidade de quase todos os grupos de organismos, em especial, microrganismos. No Brasil, a investigação da

diversidade das Trentepohliales esta restrita ao estado de São Paulo (AKIYAMA, 1971; BICUDO & SANTOS, 2001; LEMES-DA-SILVA et al., 2010) e algumas outras áreas da região sudeste e centro-oeste (LEMES-DA-SILVA, 2013), sendo as demais áreas ainda totalmente inexploradas em relação ao conhecimento desse grupo.

4. Hipóteses

Durante a execução desse estudo serão testadas as seguintes hipóteses:

1. A amostragem em áreas da região do sul do Brasil deverá revelar a presença de novas espécies e aumentará o número de registros de ocorrência de espécies para o Brasil, já que essa região é ainda completamente desconhecida quanto à flora de Trentepohliales;
2. O tipo de formação vegetal das áreas deverá ser o fator mais importante na definição da flora local de Trentepohliales. Considerando que diferentes biomas serão amostrados na região sul, a flora encontrada em cada um deverá ser mais semelhante com as encontradas em formações vegetais correspondentes de outras regiões do Brasil ou mundiais, do que entre si.
3. O clima deverá ter influência secundária na composição de espécies. Embora o clima predominante da região sul (subtropical) seja mais próximo do clima temperado, essa relação climática não deverá ser determinante na flora de Trentepohliales.
4. A realização de estudos moleculares com novos espécimes e a inclusão de estudos com diferentes marcadores deverão ajudar na resolução da filogenia do grupo e na circunscrição das espécies.

5. Objetivos

Objetivos gerais

Tendo em vista a importância ecológica nos ambientes onde ocorrem e o desconhecimento desses organismos na maioria das regiões brasileiras, esse estudo tem como objetivo principal o levantamento e a caracterização da flora de Trentepohliales na região sul do Brasil.

Objetivos específicos

- a. Conhecer a flora e identificar as espécies de Trentepohliales dos biomas da região sul, com base na morfologia.
- b. Comparar a flora de Trentepohliales de diferentes biomas da região sul, relacionando as características ambientais de áreas geográficas e biomas contrastantes.
- c. Comparar a flora de Trentepohliales da região sul com a flora encontrada em biomas de outras regiões do Brasil (sudeste e centro-oeste).
- d. Inferir dados de distribuição ecológica e biogeografia de espécies para o continente americano, por meio da utilização de informações obtidas nesse trabalho e estudos de outras regiões do Brasil e do continente americano.
- e. Avaliar características morfológicas e moleculares de populações encontradas com populações de localidades geográficas distintas, inclusive de outras localidades mundiais, visando estudar as relações filogenéticas entre representantes da ordem.

6. Justificativa

Os vegetais, incluindo plantas e alguns grupos de algas, possuem grande relevância no entendimento da distribuição global da diversidade (KREFT & JETZ, 2006). As algas verdes formam um dos grupos de organismos eucarióticos mais diversos (PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007), no entanto, grande parte do conhecimento está restrita às formas aquáticas, sendo a diversidade dos organismos terrestres ainda pouco conhecida, limitando o entendimento dos padrões de distribuição geográfica.

Trentepohliales é o grupo de algas mais abundante em ambientes terrestres e, embora sejam notáveis em regiões tropicais também são frequentemente registradas em áreas subtropicais e temperadas (p. ex., RINDI & GUIRY, 2002a; RINDI & GUIRY 2002b; RINDI et al., 2003). Considerando que, os membros desse grupo são os mais proeminentes da comunidade algal de ecossistemas terrestres naturais, eles consistem em elementos importantes no funcionamento dos sistemas ecológicos, pois fazem parte da base da cadeia trófica e estão

vinculados a processos biogeoquímicos. Segundo Reisser (2002), algas que habitam troncos de árvores atingem aproximadamente 2% da produção primária realizada por folhas por ano.

Um estudo sobre a diversidade desse grupo e seus aspectos filogenéticos e ecológicos foi concluído, onde foram amostradas seis áreas, incluindo diferentes biomas, em seis áreas naturais das regiões centro-oeste e sudeste brasileiras (Parque Estadual da Serra do Mar, Parque Nacional de Itatiaia, Parque Estadual de Campos do Jordão, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e fragmentos florestais do noroeste paulista). Durante esse trabalho, foram registrados 33 táxons específicos e infra-específicos, de espécies filamentosas e pseudoparenquimatosas, sendo que grande parte deles constitui novos registros para o Brasil ou são novos para a ciência. Além do levantamento de flora e estudo morfológico, foram produzidas 11 sequências de *rcbL* e as análises filogenéticas demonstraram que o grupo é confuso com relação as características genéticas e morfológicas, concordando com os dados encontradas na literatura. Acredita-se que o estudo de outras regiões geográficas, que incluam outros biomas, como é o caso da região sul do Brasil, podem complementar os dados, devendo proporcionar uma visão holística da diversidade e biogeografia desse grupo. Como parte do estudo deverá ser realizado junto ao laboratório *Phycolab* da Universidade do Alabama (carta anexa), os resultados obtidos deverão ampliar os estudos de Trentepohliales em termos continentais, já que regiões da América do Norte e Central já foram estudadas pelo grupo do referido laboratório, o que deverá proporcionar importantes considerações biogeográficas.

7. Resultados esperados

Considerando o número de novos registros de ocorrência e descoberta de novos táxons relatados em estudos recentes realizados no continente americano, acredita-se que o principal produto desse estudo é a realização do levantamento de flora, contribuindo com o mapeamento das espécies, por meio de novos registros para a região abordada, além do estudo das características morfológicas, ecológicas e moleculares. Esses resultados deverão ainda ser utilizados para complementar outros estudos feitos em território nacional e no continente

americano, o que deverá possibilitar avaliações da filogenia e da biogeografia das espécies do grupo.

Entre os produtos previstos, espera-se a elaboração de artigos científicos abordando a flora encontrada, estudos taxonômicos incluindo, além da taxonomia clássica, abordagens moleculares, aspectos filogenéticos e considerações sobre filogeografia de espécies selecionadas.

8. Dificuldades esperadas

Os maiores problemas previstos dizem respeito às análises moleculares, o que já foi observado em estudos anteriores. As principais dificuldades foram relacionadas com a amplificação dos genes, já que as amostras provenientes de campo estão, geralmente, misturadas com outros com plantas e fungos e vários *primers* disponíveis são inespecíficos, o que permite a amplificação de quaisquer desses elementos citados. Acredita-se que esses problemas poderão ser minimizados com a utilização de outros *primers* e marcadores, sendo de fundamental importância também a colaboração do Prof. Juan López-Bautista (Universidade do Alabama), que possui grande experiência nesses estudos.

9. Material e métodos

Área de estudo

Na região sul do Brasil, são encontrados dois grandes domínios vegetacionais: Mata Atlântica, composto essencialmente por biomas florestais (incluindo a floresta ombrófila densa, a floresta ombrófila mista e a floresta estacional), e o domínio dos Campos Sulinos, composto por biomas campestres (IBGE 2004) (Figura 1).

A floresta ombrófila densa se estende pela costa leste e ocorre principalmente nos estados de Santa Catarina e Paraná. Este tipo de vegetação é constituído por formas vegetais específicas, em especial lianas lenhosas e epífitas em abundância, sendo que, sua característica ecológica principal reside nos ambientes ombrófilos, apresentando fatores climáticos tropicais de elevadas temperaturas (médias de 25°C) e de alta e bem distribuída precipitação durante o

ano (de 0 a 60 dias secos), o que determina uma situação bioecológica praticamente sem período seco (IBGE 1992).

O bioma floresta ombrófila mista ocorre nos três estados do Sul e tem como elemento caracterizador a espécie *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, porém outros gêneros são considerados típicos deste bioma como *Drymis* Juss. e *Podocarpus* L'Hér. ex Pers. (IBGE 1992). É considerada uma das formações vegetais mais ameaçadas do Sul do Brasil, enquadrada em estado crítico e com alta prioridade para a conservação em escala regional.

A floresta estacional se divide em dois subgrupos: a Semidecídua, na qual a porcentagem das caducifólias, no conjunto florestal situa-se entre 20 e 50% e a Decídua, na qual mais de 50% dos indivíduos do conjunto florestal perdem suas folhas (IBGE 1992). O conceito ecológico deste tipo de vegetação está condicionado pela dupla estacionalidade climática, que nesta região está ligada com seca fisiológica provocada pelo intenso frio do inverno, com temperaturas médias inferiores a 15°C.

Os biomas Campestres também são divididos em dois subgrupos: Campo-Cerrado, que ocorre em pequenas porções no Paraná e Santa Catarina, caracterizado por uma fisionomia principalmente graminiforme com componentes específicos a qual está sujeita ao fogo anual (IBGE 1992) e a Estepe, ocorrente na maior parte do Rio Grande do Sul e em uma pequena porção de Santa Catarina. Neste último, as plantas são submetidas a uma dupla estacionalidade, uma fisiológica provocada pelo frio das frentes polares e outra seca mais curta, com déficit hídrico (IBGE 1992).

As coletas serão realizadas em 10 unidades de conservação distribuídas em toda a região Sul do Brasil e abrangendo os quatro principais biomas que compõem esta região (Figura 2).

- Floresta Ombrófila Densa (FOD):

Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange (25°30'00"S e 48°30'00"W): localiza-se na porção leste do estado do Paraná e possui uma área de aproximadamente 25.000 hectares abrangendo

toda a Serra da Prata, entre os municípios de Matinhos, Guaratuba, Morretes e Paranaguá (IBAMA, 2005).

Parque Nacional da Serra do Itajaí (27°01'38"S e 49°05'54"W): está localizado na porção nordeste do estado de Santa Catarina no município de Blumenau e possui uma área de 57.374 hectares.

- Floresta Ombrófila Mista (FOM):

Floresta Nacional de Irati (25°25'S e 50°36'W): localiza-se na região centro-sul do estado do Paraná e possui uma área de 3.495 hectares com seu território situado nos municípios de Teixeira Soares e Fernandes Pinheiro.

Parque Estadual das Araucárias (26°27'08"S e 52°33'56"W): está localizado na região sudoeste do estado de Santa Catarina e possui uma área de 625,1 hectares estando inserido no município de São Domingos. O Parque Estadual do Caracol localiza-se na porção leste do estado do Rio Grande do Sul e possui uma área de 100 hectares sendo apenas 25,1 devidamente legalizados.

- Floresta Estacional (FES):

Parque Nacional do Iguaçu (25°22'24"S e 54°2'33"W): está localizado na região oeste do estado do Paraná, possui uma área de 170 mil hectares. Os seus limites estão inseridos nos municípios de Foz do Iguaçu, Medianeira, Matelândia, Céu Azul e São Miguel do Iguaçu.

Parque Estadual Fritz Plaumann (27°16'18"S e 52°04'15"W): está localizado no município de Concórdia, na porção sudoeste do estado de Santa Catarina e possui 735 hectares. Foi criado como compensação dos impactos causados pela Usina Hidrelétrica de Itá no rio Uruguai a qual se situa nas adjacências do parque.

Parque Estadual Florestal do Turvo (27°8'44"S e 53°53'10"W): possui 17.500 hectares e está localizado no município de Derrubadas, na porção noroeste do estado do Rio Grande do Sul com suas adjacências nas margens do rio Uruguai que divide o Brasil com a Argentina.

- Campestre (CAM):

Parque Estadual de Vila Velha (25°14'17"S e 50°00'39"W): localizado na porção nordeste do estado do Paraná, possui uma área de 3803 hectares e se trata de uma região formada por arenitos que conferem uma tipologia geológica bastante peculiar.

Parque Nacional de Aparados da Serra (29°11'30"S e 50°5'051"W): possui 10.250 hectares e o Parque Nacional da Serra Geral com 17.300 hectares estão localizados na região nordeste do Rio Grande do Sul nos municípios de Cambará do Sul e São Francisco de Paula.

Amostragem

Os trabalhos de campo serão concentrados no período considerado mais favorável ao desenvolvimento destes organismos, que é o chuvoso (LEMES-DA-SILVA et al., 2010). Os crescimentos de Trentepohliales serão procurados visualmente ao longo da maior área possível no interior de cada bioma, considerando-se a viabilidade de execução do trabalho, e coletados qualitativamente em troncos, folhas e rochas.

As massas encontradas serão recolhidas com o auxílio de espátulas e canivetes e armazenadas em sacos de papel rotulados com o nome da área, o tipo de substrato em que foi coletado e a data da coleta. Para cada localidade amostrada serão também registrados dados de posicionamento global e altitude (GPS Garmin E-trex Vista).

Caracterização física e química do substrato

Para cada substrato amostrado, serão analisadas características físicas e químicas selecionadas. O pH será avaliado através da dissolução de parte do substrato em água destilada e posterior leitura com papel indicador de pH Merck. A irradiância será medida em diferentes níveis de cobertura vegetal nas áreas coletadas (fora da vegetação e entre as árvores) e junto ao crescimento das algas, utilizando-se quantômetro Li-Cor com sensor esférico. A umidade do ar e temperatura do ambiente e, mais especificamente, próximas à amostra serão avaliadas utilizando-se termo-higrômetro PeakTech 5090.

Os dados obtidos resultarão na caracterização do habitat dos organismos encontrados.

Preservação

O material coletado será dividido em três partes: uma será mantida a temperatura ambiente, em sacos de papel, a qual será destinada aos estudos morfológicos; outra parte será fixada em formaldeído 4%, que será incorporada ao Herbário SJRP (IBILCE/UNESP – campus de São José do Rio Preto – HOLMGREN & HOLMGREN, 1998) para testemunho; e por fim, outra porção será mantida em sílica gel, para a realização dos estudos moleculares.

Estudo morfológico

Os espécimes serão observados primeiramente em microscópio estereoscópico (Olympus SZX7), com sistema de captura de imagem acoplado, para estudo e registro das características da massa. Posteriormente, os organismos serão analisados sob microscópio de luz (Olympus BX50), com sistema de captura e análise de imagem acoplado, para estudo e registro das características taxonômicas. Os critérios morfológicos importantes para a taxonomia compreendem a forma do talo (filamentosos, pseudoparenquimatosos ou reduzidos), características vegetativas da célula (forma e tamanho) e características da estrutura de reprodução (forma, tamanho, disposição e localização do esporângio ou gametângio).

Análises moleculares

Deverão ser realizados estudos moleculares em exemplares de interesse, sendo esses com taxonomia não resolvida e/ou importantes para a melhor resolução filogenética do grupo.

As amostras de campo destinadas aos estudos moleculares serão mantidas em mantidos em sílica gel e a extração de DNA deverá seguir o protocolo descrito por López-Bautista & Chapman (2003), utilizando os kits *Nucleo Spin plant II mini kit* (Macherey-Nagel) ou *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) (previamente utilizados).

Serão feitas tentativas de ampliações dos marcadores moleculares 18S rDNA, *rbcL* e ITS, sendo que os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e os programas de temperatura para os ciclos da reação de PCR seguirão Rindi et al. (2009b), para 18S rDNA, Nelsen et al. (2011), para *rbcL* e WHITE et al. (1990, modificado por HALL et al. 2010), para ITS. A reação de

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) será realizada utilizando-se os *kits* de PCR *TopTaq Master Mix* (Qiagen) e *Platinum Taq DNA Polimerase* (Life Technologies).

Os produtos de PCR serão sequenciados usando *Big Dye Terminator* versão 3.0 (Applied Biosystems) e as sequências obtidas, no sequenciador ABI3100 automated sequencer (Applied Biosystems). A qualidade das sequências será verificada usando o pacote de programas *Phred* EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998), alinhadas no programa computacional BioEdit (HALL, 1999, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html) e comparadas com aquelas disponíveis no “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

Análises filogenéticas

As análises filogenéticas serão realizadas baseando-se em métodos da distância (*Neighbor-Joining* – NJ) e em análises de estado de caráter (máxima verossimilhança, *Maximum Likelihood* – MV, e inferência Bayesiana, – IB). A escolha do modelo evolutivo será realizada utilizando o programa *Modeltest* (POSADA & CRANDALL, 1998), usando o critério de informação Akaike (AKAIKE, 1974). As topologias das árvores NJ e MV serão estimadas usando o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011), com pseudo-réplicas de 1000 amostragens para acessar a confiabilidade dos nós e a análise Bayesiana foi realizada pelo programa *MrBayes* 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001).

10. Exequibilidade

Grande parte do estudo será realizado no Laboratório de Ficologia do Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP), o qual dispõe de toda a infra-estrutura para o desenvolvimento da pesquisa, sendo composto por:

- BETAcult, que é o ambiente onde os cultivos são realizados e conta com câmara de fluxo laminar, incubadoras com controle de temperatura e fotoperíodo e os demais equipamentos requeridos para o estabelecimento das culturas.
- BETAtax, onde serão realizadas as atividades de identificação morfológica, principalmente com uso de microscópio estereoscópio e microscópio ótico de luz.
- BETAmol é a unidade destinada aos estudos moleculares e permite a realização de todas as etapas propostas na metodologia, exceto o sequenciamento, que deverá ser feito em laboratório comercial.

Parte dos estudos deverá ser realizada no *Phycolab* da Universidade do Alabama, sob a supervisão do Dr. Juan López-Bautista, um dos maiores especialistas do grupo (carta anexa).

11. Referências bibliográficas

- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716-723, 1974.
- AKINSOJI, A. Studies on epiphytic flora of tropical rainforest in southwestern Nigeria. 2. bark microflora. **Vegetatio**, v. 92, p. 181-185, 1991.
- AKIYAMA, M. On some Brazilian species of Trentepohliaceae. **Memoirs of the Faculty of Education Shimane University. Natural Sciences**, v. 5, p. 81-95, 1971.
- ALTSCHUL, S.F.; WARREN, G.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BICUDO, C.E.M.; SANTOS, C.I. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 15: Chlorophyceae (Trentepohliales). **Hoehnea**, v. 28, p. 183-190, 2001.
- BREMER, K. Summary of green plant phylogeny and classification. **Cladistics**, v. 1, p. 369-385, 2008.
- BROOKS, F.E. Plant-parasitic algae (Chlorophyta: Trentepohliales) in American Samoa. **Pacific Science**, v. 58, p. 419-428, 2004.

- BÜDEL, B.; BECKER, U.; POREMBSKI S.; BARTHLOTT W. Cyanobacteria and cyanobacterial lichens from inselbergs of the Ivory Coast. **Botanica Acta**, v. 110, p. 448-456, 1997.
- CARDON, Z.G.; GRAY, D.W.; LEWIS, L.A. The green algal underground: evolutionary secrets of desert cells. **BioScience**, v. 58, p. 114-122, 2008.
- CHAPMAN, R.L. An assessment of the current state of our knowledge of the Trentepohliaceae. In: IRVINE, D.E.G.; JOHN, D.M. **Systematics of the Green Algae**. London: Academic Press, v. 27, p. 233-250, 1984.
- CRIBB, A.B. A revision of some species of *Trentepohlia* especially from Queensland. **Proceedings of the Royal Society of Queensland**, v. 82, 17-34, 1970.
- CRIBB, A.B. Further records of *Trentepohlia* from southeastern Queensland. **University of Queensland Papers, Department of Botany**, v. 4, p. 75-81, 1963.
- CRIBB, A.B. *Phycopeltis kosteriana* sp. n., an epiphyllous alga of the family Chroolepidaceae from Australia. **Blumea**, v. 15, p. 3-4, 1967.
- CRIBB, A.B. Records of Trentepohliceae from Papua I. **University of Queensland Papers, Department of Botany**, v. 3, p. 202-205, 1958b.
- CRIBB, A.B. Some species of *Trentepohlia* from Java and Bali. **Queensland Naturalist**, v. 27, p. 31-33, 1987.
- CRIBB, A.B. Some Trentepohliaceous algae from the Carnarvon Gorge. **Queensland Naturalist**, v. 20, p. 90-91, 1972.
- CRIBB, A.B. Some Trentepohlias new to Australia. **Phykos**, v. 7, p. 3-8, 1968.
- CRIBB, A.B. The alga *Trentepohlia ellipsiocarpa* var. *africana* new to Australia. **Queensland Naturalist**, v. 32, p. 14-15, 1993.
- CRIBB, A.B. The algal genus *Trentepohlia*. **Queensland Naturalist**, v. 29, p. 107-113, 1989.
- CRIBB, A.B. The genus *Trentepohlia* in south-eastern Queensland. **University of Queensland Papers, Department of Botany**, v. 3, p. 193-201, 1958a.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling automated sequencer traces using Phred. II Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998
- FEIGE, G.B.; KREMER, B.P. Unusual carbohydrate pattern in *Trentepohlia* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1844-1845, 1980.
- GOOD, B.H.; CHAPMAN, R.L. The ultrastructure of *Phycopeltis* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). I. Sporopollenin in the cell walls. **American Journal of Botany**, v. 65, p. 27-33, 1978.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. USA: Prentice-Hall, 2000. 640p.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HALL, J.D.; FUCIKOVA, K.; LO, C.; LEWIS, L.A.; KAROL, K.G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, p. 529-555, 2010.
- HOFFMANN, L. Algae of terrestrial habitats. **The Botanical Review**, v. 55, p. 77-105, 1989.
- HOLMGREN, P.K.; HOLMEGREN, N.H. **Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff**. New York: New York Botanical Garden's Virtual Herbarium, 1998.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro: Série Manuais Técnicos em Geociências, n. 07, 1992. 92 p.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Vegetação do Brasil**. (Encarte 1:5.000.000) 3 ed, 2004.
- ISLAM, N. Some Subaerial Green Algae from East Pakistan. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 79, p. 471-479, 1960.

- JOSE, G.; CHOWDARY, Y.B.K. New records of *Trentepohlia* from India. **Nova Hedwigia**, v. 32, p. 725-731, 1980.
- KENRICK, P.; CRANE, P.R. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**, v. 389, p. 33-39, 1997.
- KREFT, H.; JETZ, W. Global patterns and determinants of vascular plant diversity. **PNAS**, v. 104, p. 5925-5930, 2007.
- LEMES-DA-SILVA, N.M. Trentepohliales de biomas brasileiros: flora, taxonomia e filogenia. Tese em preparação.
- LEMES-DA-SILVA, N.M.; BRANCO, L.H.Z.; NECCHI-JUNIOR, O. Corticolous green algae from tropical forest remnants in the northwest region of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, p. 215-226, 2010.
- LEWIS, L.A. Chlorophyta on land: independent lineages of green eukaryotes from arid lands. In: SECHBACH, J. **Cell origin, Life in Extreme habitats and Asrobiology. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Netherlands: Springer, v. 11, p. 571-582, 2007.
- LEWIS, L.A.; McCOURT, R.M.. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1535-1556, 2004.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; CHAPMAN, R.L. Phylogenetic affinities of the Trentepohliales inferred from small-subunit rDNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2099-2106, 2003.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; RINDI, F.; CASAMATA, A.D. The systematics of subaerial algae. In: SECHBACH, J. **Cell origin, Life in Extreme habitats and Asrobiology. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Netherlands: Springer, v. 11, p. 601-617, 2007.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; RINDI, F.; GUIRY, M.D. Molecular systematics of the green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1709-1715, 2006.

LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; WATERS, D.A.; CHAPMAN, R.L. The Trentepohliales revisited.

Constancea 83 http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/lopez_etal/trentepohliales.html.

2002. Acessado em 02/02/2013.

MATTOX, K.R.; STEWART, K.D. Classification of the green algae: A concept based on comparative cytology. In: IRVINE, D.E.G.; JOHN, D.M. **Systematics of the Green Algae**. London & Orlando: Academic Press, p. 29-72, 1984.

NAKANO, T.; HANDA, S.; TAKESHITA, S. Some corticolous algae from the Taishaku-Kyo Gorge, Western Japan. **Nova Hedwigia**, 52, p. 427-451, 1991.

NELSEN, M.P.; PLATA, E.R.; ANDREW, C.J.LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T. Phylogenetic diversity of Trentepohliacean algae associated with lichen-forming fungi. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 282-290, 2011.

NEUSTUPA, J. Investigations on the genus *Phycopeltis* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from South-East Asia, including the description of two new species. **Cryptogamie, Algologie**, v. 26, p. 229-242, 2005.

NEUSTUPA, J.; SEJNOHOVÁ, L. *Marvania aerophytica* sp. nov., a new subaerial tropical green alga. **Biologia Bratislava**, v. 58, p. 503-507, 2003.

NICHOLS, H.W. Growth media – freshwater. In: STEIN J.R. **Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 7-24, 1973.

PANIKKAR, M.V.N.; SINDHU, P. Species of *Trentepohlia* from Kerala. **Journal of Economic Taxonomic Botany**, v. 17, 199–204, 1993.

PATTANAIK, B.; SCHUMANN, R.; KARSTEN, U. Effects of ultraviolet on cyanobacteria and their protective mechanisms. In: SECHBACH, J. **Cell origin, Life in Extreme habitats and Astrobiology. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Netherlands: Springer, v. 11, p. 29-45, 2007.

PATTERSON, G.W.; VALKENBURG, S.V. Sterols of *Cephaleuros* (Trentepohliaceae), a parasitic green alga. **Journal of Phycology**, v. 27, p. 549-551, 1991.

- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.
- PRINGSHEIM, E.G. The biphasic or soil water culture method of growing algae or flagellate. **Journal of ecology**, v. 33, p. 193-204, 1946.
- PRÖSCHOLD, T.; LELIAERT, F. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: BRODIE, J. & LEWIS, J. **Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics**. London and New York: CRC Press, v. 75, p. 123-153, 2007.
- REISSER, W. Algae living on trees. In: SECHBACH, J. **Cell origin, Life in Extreme habitats and Astrobiology. Symbiosis: Mechanisms and Model Systems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 4, p. 389-395, 2002.
- RIND, F.; GUIRY, M.D. Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway City, western Ireland. **Cryptogamie, Algologie**, v. 24, p. 245-267, 2003.
- RINDI, F.; ALLALI, H.A.; LAM, D.W.; LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae. In: RESCIGNO, V.; MALETTA, S. **Biodiversity Hotspots**. New York: Nova Science Publishers, p 105-22, 2009a.
- RINDI, F.; GUIRY, M.D.; CRITCHLEY, A.; AR GALL, E. The distribution of some species of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in France. **Cryptogamie, Algologie**, v. 24, p. 133-144, 2003.
- RINDI, F.; GUIRY, M.D.; LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. New records of Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Africa. **Nova Hedwigia**, v. 83, p. 431-449, 2006.
- RINDI, F.; LAM, D.W.; López-Bautista, J.M. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 52, p. 329-339, 2009b.
- RINDI, F.; LAM, D.W.; LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Panama. **Nova Hedwigia**, v. 87, p.421-444, 2008.

- RINDI, F.; LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. Diversity and ecology of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in French Guiana. **Cryptogamie, Algologie**, v. 29, p. 13-43, 2008.
- RINDI, F.; LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. New and interesting records of *Trentepohlia* (Trentepohliales, Chlorophyta) from French Guiana, including the description of two new species. **Phycologia**, v. 46, p. 698-708, 2007.
- RINDI, F.; SHERWOOD, A.R.; GUIRY, M.D. Taxonomy and distribution of *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) in the Hawaiian Islands. **Phycologia**, v. 44, p. 270-284, 2005.
- RODERJAN, C.V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; HATSCHBACH, G.G. As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. **Ciência & Ambiente**, v. 24, p. 75-92, 2002.
- 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, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- THOMPSON, R.H.; WUJEK, D. **Trentepohliales: *Cephaleuros*, *Phycopeltis*, and *Stomatochroom*. Morphology, Taxonomy, and Ecology**. India: Science Publishers, 1997. 149 p.
- TRACANNA, B.C. Trentepohliales (Chlorophyta): el género *Trentepohlia* Martius para las provincias de Salta y Tucumán (Argentina). **Lilloa**, v. 37, p. 47-59, 1989.
- WHITE, T.J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, p. 315-322. 1990.

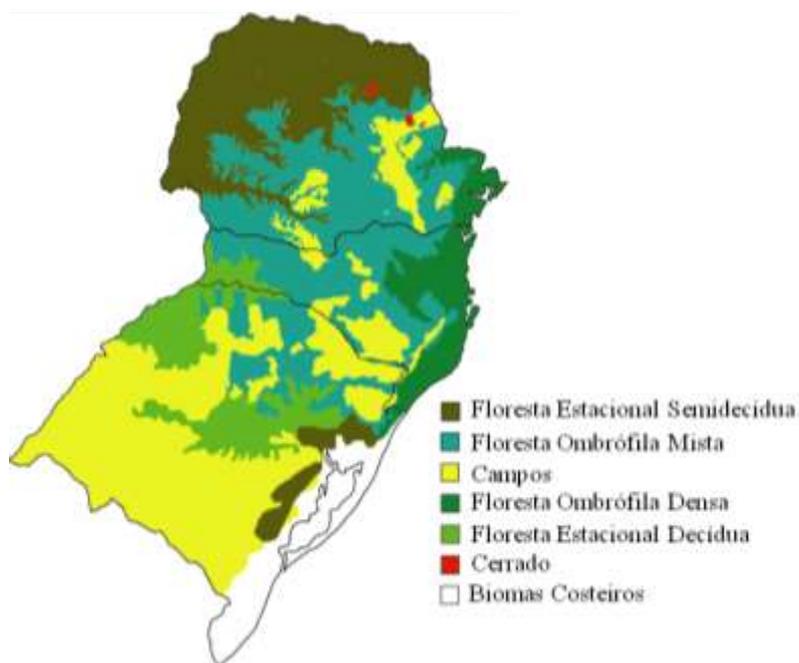


Figura 1. Área natural dos principais biomas da região Sul. Adaptado de Roderjan et al. (2002) e IBGE (2004).

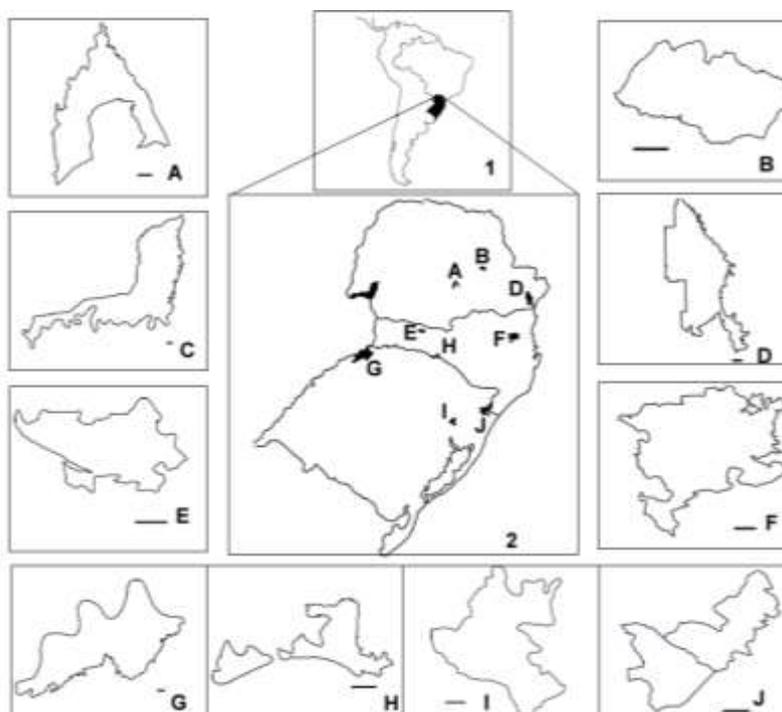


Figura 2. 1. América do Sul, com destaque para a região sul do Brasil. 2. Região sul, com destaque para as unidades de conservação a serem amostradas. **A.** Floresta Nacional de Irati, **B.** Parque Estadual de Vila Velha, **C.** Parque Nacional do Uguçu, **D.** Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange, **E.** Parque Estadual das Araucárias, **F.** Parque Nacional Serra do Itajaí, **G.** Parque Florestal Estadual do Turvo, **H.** Parque Estadual Fritz Plaumann, **I.** Parque Estadual do Caracol, **J.** Parque Nacional de Aparados da Serra/Parque Nacional da Serra Geral. (Barras de escalas: 0,5 Km – A; 1 Km – B, E, G, H e I; 5 Km – C, D e J).

Cronograma

	2013	2014												2015						
	A S O N D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
1	X X X X X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2		X	X	X																
3				X	X	X	X	X	X											
4				X	X	X	X	X	X	X	X	X								
5								X	X	X	X	X	X							
6								X	X	X	X	X	X	X	X					
7													X	X	X	X				
																	X	X	X	X

1. Levantamento e atualização bibliográfica.
2. Trabalho de campo.
3. Análise morfológica de material obtido em coletas.
4. Estabelecimento de cultivos.
5. Estágio no exterior.
6. Análises moleculares.
7. Análises dos dados morfológicos e moleculares obtidos e confecção de gráficos, tabelas e árvores filogenéticas.
8. Redação de relatório e trabalhos científicos.