



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
DOUTORADO EM BOTÂNICA

**FILOGENIA DE FISSIDENTACEAE SCHIMP.
(BRYOPHYTA)**

Orientadora: Profa. Dr.^a Micheline Carvalho-Silva

Orientanda: Tamara Poliana de Oliveira Teixeira

Brasília, DF

2022

TAMARA POLIANA DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**FILOGENIA DE FISSIDENTACEAE SCHIMP.
(BRYOPHYTA)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Botânica

Orientadora: Profa. Dr.^a Micheline Carvalho-Silva

Brasília, DF

2022

TAMARA POLIANA DE OLIVEIRA TEIXEIRA

Filogenia de Fissidentaceae Schimp. (Bryophyta)

Tese de doutorado apresentada em 8 de agosto de 2022.

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Micheline Carvalho Silva (orientadora)

Universidade de Brasília

Presidente da banca

Prof.^a Dr.^a Daniela Cristina Zappi

Universidade de Brasília

Membro titular

Dr. Diego Knop Henrique

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Membro titular

Dr. Denilson Fernandes Peralta

Instituto de Botânica

Membro titular

Dr.^a Christina Cleo Vinson Williams

Universidade de Brasília

Membro suplente

**Aos que me apoiaram e incentivaram nessa caminhada,
em especial aos meus pais, irmãos, esposo e meu filho Davi
que nasceu durante o desenvolvimento desse trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar os agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

À Deus, por me conduzir sempre aos melhores caminhos e decisões, por me sustentar e me fortalecer nos momentos difíceis e colocar as melhores pessoas ao meu lado.

À minha orientadora maravilhosa Profa. Dra. Micheline Carvalho-Silva por me permitir fazer parte do seu grupo de trabalho e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda por sempre me acolher com amor, por sentar por diversas vezes presencialmente e virtualmente para me guiar e tomar decisões relevantes no decorrer desse trabalho. Agradeço-lhe ainda o tema do trabalho, que sempre me aliciou, o que fez eu conseguir ultrapassar dificuldades surgidas, a confiar no meu potencial e me desafiar todos os dias. Você é incrível e uma das melhores orientadoras que eu tive oportunidade de conhecer, meu muito obrigada.

Ao Programa de pós-graduação em Botânica (PPGBot-UnB) pela oportunidade de cursar o curso de doutorado em Botânica, área que desde a graduação ganhou meu coração.

À coordenação de Apoio de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos meus professores da graduação Dra. Cristiana Costa (que me apresentou o maravilhoso mundo da botânica e me orientou em diversos projetos de iniciação científica e parte da monografia), Dr. Jorge Costa que com sua inteligência magnífica me incentivou a aprofundar ainda mais nessa área e a excelentíssima e admirável profa. Dra. Ana Maria Mappeli que com o seu jeitinho doce e único me “adotou” e orientou na reta final, uma profissional incrível da qual me inspiro todos os dias. Vocês plantaram a sementinha e ela está vingando lindamente, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Paulo Câmara pelas aulas divertidas e cheia de conhecimentos, por dividir seu laboratório e me acompanhar desde o início deste trabalho, contribuindo sempre com dicas precisas, sugestões e críticas.

A Profa. Dra. Juçara Bordin, que me acompanhou e trilhou juntamente o desenrolar desse trabalho, sempre contribuindo com sugestões, discussões e esclarecendo dúvidas sobre a família Fissidentaceae. Sou grata por tudo, pela recepção em São Paulo, por sempre me

responder independente do horário e por tantas outras atividades que fizemos juntas. Você é um ser de luz.

Aos meus colegas de laboratório “Brioco”, Júlia, Cris, Tamara, Carla, Amanda e todos os alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica que eu tive a oportunidade de conviver, muito obrigada pelo carinho e companhia de todos os dias.

Ao Allan por desde o início disponibilizar do seu tempo para me ensinar e compartilhar suas experiências e conhecimentos sobre morfologia de briófitas, além de sempre lembrar de mim nas suas coletas. Ao Diego, carinhosamente chamado de Picachu, que com sua mente brilhante me instruiu e contribuiu por diversas vezes neste trabalho, muito obrigada a vocês dois, minha eterna gratidão.

As amigas que fiz na UnB, Crislielle Souza e Thais Aparecida, sou muito grata pela amizade e por compartilhar momentos de refeição, tensão e alegrias com vocês.

Aos amigos que me acompanham por uma vida, Dyla, Laudirene, Italo, Icaro, Fran, Adeilson, Alessandro, Thais Pagotto, Renata Teixeira, Val Lacerda, Zarra Fernandes, Simone, Ingrid Santana, João e Indiara, muito obrigada por existirem na minha vida, cada um de vocês tem um significado para mim.

Ao Dr. Denilson Peralta, por me receber tão bem no Instituto de Botânica e contribuir por diversas vezes no desenvolvimento desse trabalho, inclusive, na qualificação, minha eterna gratidão.

Aos Herbários de SP, UB, ALCB, QCNE, QCA e suas equipes, que sempre estiveram prontas para me atender e auxiliar em tudo neste trabalho, gratidão.

Ao prof. Dr. Cid Bastos e a sua esposa Dra. Silvana por me receberem tão bem na visita ao herbário ALCB, além de disponibilizar várias bibliografias que foram uteis neste trabalho.

Ao Mayco, por suas contribuições na confecção de pranchas para o capítulo 3.

À banca de defesa de tese, Profa. Dra. Daniela Zappi, Dra. Christina Vinson, Dr. Diego Knop e Dr. Denilson Peralta, por prontamente aceitar constituir esta banca, pelo tempo, dedicação e interesse em contribuir com a tese. Gratidão.

E, finalmente agradeço, à minha família:

Aos meus pais, Paulo e Flora que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e sendo o meu Norte.

Aos meus irmãos Victor e Samarone, por ser colo, abraço e meu incentivo diário.

E em especial, a família linda que estou construindo:

Ao meu companheiro, Werique Rafael por me compreender e suportar os meus estresses, sendo sempre meu ponto de paz e equilíbrio e ao meu filho Davi Rafael que foi gerado e nasceu durante o desenvolvimento deste trabalho, filho você é a minha maior motivação, obrigada por existir!

Meu sincero e respeitoso, muito obrigada!

SUMÁRIO

Organização da Tese.....	14
RESUMO.....	12
Introdução Geral.....	14
Justificativa.....	15
Referências.....	16

Capítulo 1 - Filogenia de Fissidentaceae Schimp. (Bryophyta)

Introdução.....	17
1. Material e Métodos	
1.1.Amostragem Geral.....	21
1.2.Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	21
1.3.Análises Morfológicas.....	21
1.4.Análises Filogenéticas.....	21
2. Resultados	
2.1.Análises Morfológicas.....	23
2.2.Análises Filogenéticas.....	25
3. Discussão.....	29
4. Conclusões.....	33
5. Referências.....	34
6. ANEXOS	
6.1.Amostras analisadas.....	37

Capítulo 2 - Phylogeny and morphology of Fissidentaceae Schimper. in the South Atlantic islands and description of a new species

Abstract.....	43
Resumé.....	43
1. Introduction.....	44
2. Materials and Methods.....	46
3. Results.....	47
4. Discussion.....	50
5. Acknowledgments.....	53
6. Reference.....	53

Capítulo 3 – Taxonomic notes on South American *Fissidens* (Fissidentaceae)

Abstract.....	62
1. Introduction.....	62
2. Material and methods.....	63
3. Taxonomic treatment.....	64
4. Phylogenetic evidence.....	66
5. Acknowledgments.....	68
6. References.....	68
7. List of samples used in phylogenetic analysis.....	70

Lista de Figuras e Tabelas

Capítulo 1	17
Figura 1. Imagens de microscopia de varredura: <i>Fissidens noronhensis</i> A- filídio; B- células do filídio.....	25
Figura 2. Árvore filogenética baseada em análises com o marcador de cloroplasto <i>rps4</i> para espécies brasileiras e táxons japonesas retirados de Susuki et al. 2018)	27
Figura 3. Árvore filogenética baseada em análises com o marcador de cloroplasto <i>rps4</i> e <i>trnG</i> para as espécies brasileiras.....	28
Tabela 1. Amostras analisadas.....	37
Tabela 2. Táxon, números de acesso do GenBank para a região <i>rps4</i>	40
Capítulo 2	42
Figura 1. Phylogenetic tree based on analysys with the concatenated sequences of chloroplast <i>rps4</i> and <i>trnG</i> genes	59
Figura 2. <i>Fissidens noronhensis</i> sp. nov.....	60
Capítulo 3	61
Figura 1. <i>Fissidens trinidadensis</i> sp. nov.....	65
Figura 2. Phylogenetic tree based on analyzes with the chloroplast marker <i>rps4</i> e <i>trnG</i>	67
Tabela 1. Genetic distance between <i>Fissidens acacioides</i>	68

Organização da Tese

Para a maior compreensão do leitor, a presente tese está organizada em uma introdução geral da Família Fissidentaceae Schimp., incluindo a justificativa da pesquisa, seguida pela divisão de três capítulos.

Capítulo 1. Filogenia de Fissidentaceae Schimp. (Bryophyta) – Compreende os estudos filogenéticos e morfológicos das espécies de Fissidentaceae com ocorrência registrada para o Brasil. Foi amplificado os marcadores *rps4* e *trnG* e realizadas as análises de Máxima Parcimônia, Verossimilhança e Inferência Bayesiana, para testar a monofilia do gênero *Fissidens*.

Capítulo 2. Phylogeny and morphology of Fissidentaceae Schimper. in the South Atlantic islands and description of a new species– Trata-se do estudo das espécies de Fissidentaceae com ocorrência registrada para as Ilhas da Trindade e Fernando de Noronha relacionando-as com as espécies continentais, compõe análises morfológicas e análises filogenéticas com o uso dos marcadores *rps4* e *trnG*. Os resultados proporcionam a descrição de duas novas espécies para a ciência, como também um novo registro de ocorrência para o arquipélago Fernando de Noronha. Artigo publicado na revista *Cryptogamie*, Qualis B1.

Capítulo 3. Taxonomic notes on South American *Fissidens* (Fissidentaceae) Estudo molecular das espécies complexo do subgênero *Fissidens* – Abarca estudos filogenéticos e morfológicos das espécies de difícil delimitação que são encontradas dentro do subgênero *Fissidens*, para este estudo foi utilizado os marcadores *rps4* e *trnG*, buscando esclarecer a melhor delimitação dessas espécies. Este estudo permitiu a sinonimização de *Fissidens acacioides* e a validação da espécie nova *F. trinidadensis* (Artigo em processo de submissão na Revista *Phytotaxa*).

RESUMO

Fissidentaceae Schimp. É uma das maiores famílias de briófitas e possui apenas um gênero, *Fissidens* que abrange cerca de 440 espécies. O primeiro sistema de classificação que tratou da família foi publicado por Müller, em 1901, na obra “Genera Muscorum Frondosorum” e abrange três gêneros, *Fissidens* Hedw. *Conomitrium* Mont. e *Moenkemeyera* Müll. Hal. Posteriormente, outras classificações foram realizadas, mas todas elas baseadas apenas em dados morfológicos e somente em 2018 foi publicado uma nova circunscrição para o gênero utilizado dados moleculares, no entanto, apenas com espécies oriundas do Japão. Sendo assim, este estudo teve como objetivo propor uma hipótese filogenética para a família Fissidentaceae baseada em dados moleculares e testar o monofiletismo dos subgêneros de *Fissidens* propostos por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) e Suzuki et al. (2018) tratados para o Brasil. Foram coletadas 95 amostras frescas e selecionadas 351 amostras de herbários para extração, amplificação e sequenciamento, e também incluiu-se 10 amostras do GenBank. Foram sequenciados os marcadores de cloroplasto *rps4* e *trnG*, obtendo posteriormente resultados de análises de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e análise de Inferência Bayesiana. Obteve-se aproximadamente 150 novas sequências (de distintas regiões do DNA) para as espécies de Fissidentaceae ocorrentes no Brasil, incluindo as espécies do arquipélago Fernando de Noronha e Ilha da Trindade. Os estudos filogenéticos e a morfologia corroboram para a circunscrição de alguns dos subgêneros de *Fissidens*, evidenciando que os subgêneros propostos por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) não são todos monofiléticos, pois o subgênero *Octodicerias* (Brid.) Broth. mencionado pelos autores se mistura ao subgênero *Fissidens*. Contudo, para o Brasil são reconhecidos três clados bem suportados: *Pachyfissidens* (Müll Hal.) Kindb., *Fissidens* e *Aloma* Kindb. Também foram estudadas as espécies de Fissidentaceae do arquipélago Fernando de Noronha e Ilha da Trindade comparando-as com as do continente, mostrando que as espécies das ilhas são geneticamente e morfológicamente semelhante às amostras do continente, com exceção de duas espécies que anteriormente, estavam identificadas erroneamente como *F. crispus* Mont. (Fernando de Noronha) e *F. zollingeri* Mont. (Ilha da Trindade) permitindo dessa maneira a descrição de duas novas espécies *F. noronhensis* Teixeira, Bordin & M. Carv.-Silva e *F. trindadensis* respectivamente. Para o Arquipélago Fernando de Noronha também foi registrado uma nova ocorrência, *F. steerei* Grout. Esses estudos moleculares

com as espécies brasileiras também permitiram uma nova sinonimização para *F. acacioides* Schrad.

Palavras chave: *Fissidens*, *rps4*, *trnG*, ilhas, sinonimização, espécie nova

ABSTRACT

Fissidentaceae Schimp. It is one of the largest families of bryophytes and has only one genus, *Fissidens*, which encompasses about 440 species. The first classification system that dealt with the family was published by Müller, in 1901, in the work “*Genera Muscorum Frondosorum*” and covers three genera, *Fissidens* Hedw. *Conomitrium* Mt. and *Moenkemeyera* Müll. Hal. Subsequently, other classifications were carried out, but all of them based only on morphological data and only in 2018 a new circumscription was published for the genus using molecular data, however, only with species from Japan. Therefore, this study aimed to propose a phylogenetic hypothesis for the family Fissidentaceae based on molecular data and to test the monophyly of the *Fissidens* subgenera proposed by Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) and Suzuki et al. (2018) treaties for Brazil. 95 fresh samples were collected and 351 herbarium samples were selected for extraction, amplification and sequencing, and 10 samples from GenBank were also included. Chloroplast markers *rps4* and *trnG* were sequenced, obtaining later results of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference analysis. Approximately 150 new sequences were obtained (from different DNA regions) for species of Fissidentaceae occurring in Brazil, including species from the Fernando de Noronha archipelago and Trindade Island. Phylogenetic and morphological studies corroborate the circumscription of some of the subgenera of *Fissidens*, showing that the subgenera proposed by Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) are not all monophyletic, as the subgenus *Octodiceras* (Brid.) Broth. mentioned by the authors is mixed with the subgenus *Fissidens*. However, for Brazil, three well-supported clades are recognized: *Pachyfissidens* (Müll Hal.) Kindb., *Fissidens* and *Aloma* Kindb. The species of Fissidentaceae from the archipelago Fernando de Noronha and Ilha da Trindade were also studied, comparing them with those from the mainland, showing that the species from the islands are genetically and morphologically similar to the samples from the mainland, with the exception of two species that were previously identified. erroneously as *F. crispus* Mont. (Fernando de Noronha) and *F. zollingeri* Mont. (Ilha da Trindade) thus

allowing the description of two new species *F. noronhensis* Teixeira, Bordin & M. Carv.-Silva and *F. trinidadensis* respectively. A new occurrence was also recorded for the Fernando de Noronha Archipelago, *F. steerei* Grout. These molecular studies with the Brazilian species also allowed a new synonymization for *F. acacioides* Schrad.

Keywords: *Fissidens*, *rps4*, *trnG*, islands, synonymization, new species

Introdução Geral

As briófitas são o segundo maior grupo de plantas terrestres do Brasil, com aproximadamente 1.607 espécies (Flora e Funga do Brasil 2022). Este grupo compreende três linhagens evolutivas, as hepáticas (Marchantiophyta), os musgos (Bryophyta) e os antóceros (Anthocerotophyta). Dentre essas linhagens, reconhecidas taxonomicamente como divisões, Bryophyta se destaca em número de espécies e são altamente diversificadas e distribuídas em todos os ecossistemas terrestres, desde as regiões polares até os trópicos (Frey & Stech 2009). São estimadas para o Brasil cerca de 895 espécies de musgos (Bryophyta), distribuídas em 280 gêneros e 73 famílias (Flora e Funga do Brasil 2022).

As formas de vida dos musgos são influenciadas por condições microclimáticas e estão fortemente relacionadas às condições de umidade e luminosidade. Algumas espécies apresentam baixa tolerância à dessecação, predominando em ambientes úmidos e sombreados. Por outro lado, outras espécies, estão relacionadas a locais mais secos, por possuírem características que conferem tolerância à baixa umidade (Glime 2007).

Devido ao número limitado de caracteres morfológicos disponíveis, a identificação das espécies de briófitas por meio da morfologia é, frequentemente, difícil (Vanderpoorten & Goffinet 2009). As circunscrições de espécies e o significado da variabilidade morfológica são muitas vezes mal compreendidos, principalmente, em complexos de espécies afins (Lang & Stech 2014). Com esta problemática de identificação morfológica, os estudos ecológicos geralmente tratavam este grupo de plantas como única categoria sem distinção de espécies, ou distinguíam apenas gêneros ou poucas espécies facilmente reconhecíveis (Hudson & Henry 2010).

Dentre as famílias das Bryophyta que predominam nessa complexidade, vale ressaltar Fissidentaceae que é uma das mais bem representadas no grupo dos musgos, (Costa et al. 2015), formada por um único gênero *Fissidens* Hedw. com cerca de 440 espécies (Suzuki et al. 2018). Apesar da família estar bem delimitada, a distinção de espécies é, taxonomicamente, difícil (Iwatsuki & Suzuki 1982) pois possui morfologia muito variável (Pursell 2007, Bordin & Yano 2013) devido às diferenças de tamanho, morfologia dos filídios e ornamentação das células, entre outras características.

Diante desse pressuposto, é necessário estudos com enfoque molecular, com o intuito de resolver a problemática taxonômica do grupo, e melhor conhecer as espécies de Fissidentaceae, já que a filogenia das espécies que ocorrem no Brasil, permanece desconhecida.

Justificativa

Fissidentaceae é uma família bem delimitada morfologicamente, porém existe uma complexidade taxonômica no seu único gênero *Fissidens* (Iwatsuki & Suzuki 1982), que é muito variável (Pursell 2007), devido as espécies apresentarem diferenças morfológicas e celulares, conseqüentemente, consideradas difíceis para a identificação (Bordin & Yano 2013). A estrutura do filídio e o tipo de peristômio são caracteres utilizados para reconhecer *Fissidens*, no entanto, as relações entre os táxons infragênicos ainda permanecem incertas (Pursell & Bruggeman-Nannenga 2004).

Considerando essa grande complexidade taxonômica infragênica e que os estudos utilizados para a compreensão e classificação atual das espécies que ocorrem no Brasil estão direcionados apenas para a morfologia, outras propostas de estudos como o uso de dados moleculares, podem esclarecer essas relações filogenéticas e evolutivas, ou até mesmo fornecer subsídios para delimitar melhor os subgêneros e as espécies e propostas por Pursell (2007). Nessa perspectiva, este estudo permitirá uma melhor compreensão da família, a circunscrição dos subgêneros e os caracteres morfológicos que os delimitam. O trabalho também contribuirá para o entendimento sobre a evolução dos caracteres morfológicos, além das relações evolutivas entre as espécies.

Embora exista um trabalho com dados moleculares para o gênero (Suzuki et al. 2018) é importante que mais dados moleculares de outras espécies se tornem disponíveis para elucidar a classificação infragênica de Fissidentaceae, principalmente, voltados

para as espécies que ocorrem no Brasil, por exemplo, o complexo de espécies do gênero *Fissidens*, seção *Fissidens* citado por Bordin & Yano (2013) que possuem poucas características morfológicas estáveis, sendo difícil a distinção das mesmas.

Objetivo geral:

Este estudo teve como objetivo propor uma hipótese filogenética para a família Fissidentaceae baseada em dados moleculares e testar o monofiletismo dos subgêneros de *Fissidens* propostos por Pursell & Bruggeman- Nannenga (2004) e Suzuki et al. (2018) tratados para o Brasil.

Objetivos específicos:

Entender o valor evolucionário das variações morfológicas e genéticas encontradas entre as populações das espécies de *Fissidens* entre as ilhas Fernando de Noronha e Ilha da Trindade e do continente.

Verificar a circunscrição dos subgêneros de *Fissidens* e algumas espécies brasileiras do gênero.

Referências

- Bordin J, Yano O. 2013. Fissidentaceae (Bryophyta) do Brasil. Boletim do Instituto de Botânica 22: 1-72.
- Costa FB, Silva EO, Conceição GM. 2015. Hepáticas (Marchantiophyta) e musgos (Bryophyta) da Área de Proteção Ambiental do Buriti do Meio, município de Caxias, Maranhão, Brasil. Scientia Plena 11:1
- Briófitas in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB128472>>. Acesso em: 09 ago. 2022
- Frey W, Stech M. 2009. Bryophytes and seedless vascular plants. 3: I–IX,. In Syl. Pl. Fam. ed. 13. Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin, Stuttgart, Germany.

- Glime JM. 2007. Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Disponível em: <http://digitalcommons.mtu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=bryo-ecol-subchapters/>. Acesso em: 08 de maio de 2018
- Hudson JMG, Henry GHR. 2010. High Arctic plant community resists 15 years of experimental warming. *J. Ecol.* 98: 1035–1041.
- Iwatsuki Z, Suzuki T. 1982. A taxonomic revision of the Japanese species of *Fissidens* (Musci). *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 51: 329–508.
- Lang A, Stech M. 2014. What’s in a name? Disentangling the *Dicranum scoparium* species complex (Dicranaceae, Bryophyta). *Syst. Bot.* 39: 369–379.
- Pursell RA, Bruggeman-Nannenga MA. 2004. A revision of the infrageneric taxa of *Fissidens*. *The Bryologist* 107(1): 1–20.
- Pursell RA. 2007. Fissidentaceae. *Flora Neotropica, Monograph* 101: 1–278.
- Suzuki T, Inoue Y, Tsubota H. 2018. Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 190–202.
- Vanderpoorten A, Goffinet B. 2009. *Introduction to Bryology*. New York: Cambridge University Press.

CAPÍTULO 1

Filogenia de Fissidentaceae Schimp. (Bryophyta)

RESUMO

Fissidentaceae possui apenas um gênero, *Fissidens* e abrange cerca de 440 espécies, sendo registradas 66 para o Brasil em todas as fitofisionomias. Embora existam várias classificações propostas para o gênero, nenhuma tentativa de classificação combinando dados morfológicos e moleculares foram feitos contendo as espécies brasileiras. Aqui apresentamos pela primeira vez uma árvore filogenética com as espécies do Brasil resultante de dados concatenados de dois marcadores de cloroplasto, *rps4* e *trnG*. Foram

sequenciados 48 táxons de *Fissidens* e os dados morfológicos e moleculares confirmam o monofiletismo do gênero e evidencia três subgêneros, *Pachyfissidens* (Müll.Hal.) Kindb., *Fissidens* Hedw. e *Aloma* Kindb.

Palavras-chave: *Fissidens*, taxonomy, morfologia, marcador *rps4*, marcador *trnG*, subgêneros

1. Introdução

Fissidentaceae Schimp. pertence à classe Bryopsida e à ordem Dicranales (Goffinet et al. 2009). Com cerca de 440 espécies (Suzuki et al. 2018), para o Brasil são registrados 66 táxons, dos quais 7 são endêmicos (Bordin 2022, Teixeira et al. 2022). A família tem sido considerada a segunda maior família de musgos e as suas espécies estão distribuídas em todos os domínios geográficos, com maior número, na Mata Atlântica com cerca de 55 espécies (Bordin 2022).

A família é reconhecida pela lâmina vaginante, a estrutura do fílidio com limbídio e pelo peristômio com dentes divididos. O nome do gênero *Fissidens* é de origem latina (*Fissus* = Fenda + *dens* = dente) e refere-se à divisão dos dentes do peristômio que segue até grande parte do seu comprimento. Desde 1901 este gênero foi separado em outros gêneros, seções e subgêneros pelo uso da classificação da variação dessa estrutura (Pursell 2007).

O gênero *Fissidens* foi descrito por Hedwig (1801) sendo reconhecidas 14 espécies baseadas nos dentes dos peristômios simples e bífidos. No entanto, o primeiro sistema de classificação que tratou da família foi publicado na obra “Genera Muscorum Frondosorum” (Muller 1901) e abrange três gêneros, *Fissidens* Hedw. *Conomitrium* Mont. e *Moenkemeyera* Mull. Hal.

Baseado nesta última classificação Brotherus (1909,1924) constituiu uma nova divisão para a família, o mais amplamente aceito e adotado na época, no qual considerava-se quatro gêneros: *Fissidens* Hedw., *Fissidentella* Cardot., *Moenkemeyera* Müll. Hal. e *Simplicidens* Herzog.

Posteriormente, outras classificações surgiram (Cardot 1909, Herzog 1909, Grout 1941,1943, Iwatsuki 1985) e outros gêneros foram descritos para a família (*Fissidentella* Cardot., *Simplicidens* Herzog., *Bryoxiphium* Mitt., *Sarawakia* (Müll. Hal.) Z. Iwats. e

Serridium (Müll. Hal.). Entretanto, a classificação baseada em caracteres morfológicos e amplamente utilizada atualmente, foi proposta por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004), na qual classificaram a família com apenas um gênero, *Fissidens*.

Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) revisaram os táxons infragênicos de *Fissidens*, dividindo o gênero em quatro subgêneros, *Aloma* Kindb., *Fissidens* Hedw., *Octodiceras* (Brid.) Mitt. e *Pachyfissidens* Müll. Hal., com base nos caracteres morfológicos utilizados por Brotherus (1924), como distribuição e extensão do limbídio, ornamentação da parede das células, e adicionaram outros caracteres, como tipo de peristômio, tipo de costa e número de fileiras de células do exotécio. Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) também subdividiram o subgênero *Fissidens* em duas seções: *Fissidens* e *Sarawakia* (Müll. Hal.) Pursell & Brugg-Nann. O subgênero *Pachyfissidens* em três seções: *Amblyothalia* Müll. Hal. (este engloba as espécies consideradas as mais basais do gênero), *Crispidium* Müll. Hal., e *Pachyfissidens* Müll. Hal., entretanto, os subgêneros *Aloma* e *Octodiceras* não foram subdivididos, sendo ambos os subgêneros considerados os mais derivados dentro do grupo pelos autores.

No Brasil são citadas a ocorrência de representantes de todos os subgêneros e seções, com exceção de *Sarawakia* e *Crispidium* (Pursell & Bruggeman-Nannenga 2004)

O último estudo que tratou da família (Suzuki et al. 2018) considerou apenas o gênero *Fissidens* dividido em três subgêneros (*Fissidens*, *Pachyfissidens* e *Neoamblyothallia* Tad.Suzuki & Z. Iwats). As espécies que compreendiam o subgênero *Octodiceras* e *Aloma* da classificação de Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) passaram a pertencer ao subgênero *Fissidens*.

Para esta classificação, Suzuki et al. (2018) analisaram 50 representantes do gênero *Fissidens* e dividiram os três subgêneros em sete seções: *Fissidens* compreende as seções *Fissidens*, *Polypodiopsis* Müll.Hal., *Aloma* Kindb., *Areofissidens* Müll.Hal. e *Semilimbidium* Müll.Hal., vale ressaltar que essas quatro seções são equivalentes ao subgênero *Aloma* proposto por Pursell e Bruggeman-Nannenga (2004), o subgênero *Neoamblyothallia* dividido em duas seções *Neoamblyothallia* Tad. Suzuki & Z. Iwats. e *Crispidium* (Müll.Hal.) Broth; e o subgênero *Pachyfissidens* sem nenhuma seção, sendo este último, considerado o grupo mais basal de Fissidentaceae. A seção *Semilimbidium* é a mais derivada, e sua elevada diversidade nos trópicos, pressupõe que a história evolutiva

do gênero aconteceu por meio da adaptação e diversificação em regiões tropicais (Suzuki et al. 2018).

No Brasil, os primeiros trabalhos que listaram espécies de Fissidentaceae foram os da *Flora Brasiliensis de Hornschuch* (1840) com duas espécies, de Angstrom (1876) com nove espécies para Caldas (Minas Gerais), Hampe (1879), com nove espécies para São Paulo e Rio de Janeiro e Brotherus (1895) com 13 espécies coletadas no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Sehnem (1972) realizou um trabalho com a família, tratando 35 espécies em sua obra “Musgos Sul-Brasileiros, descrevendo *Fissidens flaveolus* (hoje sinônimo de *F. brevipes* Besch.).

Desde então, outros estudos foram realizados para as espécies da família (Yano & Oliveira-e-Silva, 1997; Pursell, 2007; Oliveira & Bastos, 2010). Dentre esses, vale ressaltar o da Flora Neotrópica (Pursell 2007), onde são apresentadas chaves de identificação para os subgêneros, seções e espécies, descrições, distribuição geográfica e ilustrações para cada táxon.

Buscando compreender melhor as espécies com ocorrência no Brasil, Bordin & Yano (2013) desenvolveram um trabalho com análises morfológicas e morfométricas, e estudaram detalhadamente por meio de microscópio eletrônico de varredura as papilas foliares. Foram encontrados 72 táxons de *Fissidens* para o Brasil, sendo uma nova espécie descrita: *Fissidens pseudoplurisetus* Bordin, Pursell & O. Yano e foram registradas três novas ocorrências para o país: *F. ecuadorensis* Pursell & Brugg. -Nann., *F. steerei* Grout e *F. yucatanensis* Steere. Bordin & Yano (2013) identificaram um complexo de espécies do subgênero *Fissidens*, seção *Fissidens*, contendo 13 táxons, através do estudo morfométrico o qual confirmou a grande variabilidade dos caracteres dentro entre os táxons mostrando a presença de poucas características morfológicas estáveis. Neste tratamento taxonômico foi apresentada uma chave para a identificação dos táxons de Fissidentaceae que ocorrem no Brasil, seguido de descrição, ilustração, distribuição geográfica e comentários, porém, para a elaboração da chave, não foram utilizadas categorias, como subgêneros e seções.

Em Fissidentaceae, algumas espécies são muito semelhantes, e os caracteres utilizados para identificação são muito variáveis, tornando difícil a delimitação taxonômica das mesmas (Pursell 2007, Bordin & Yano 2013). Assim, trabalhos com enfoque molecular em musgos, têm sido alvo de pesquisadores, a fim de esclarecer a

filogenia dos grupos e solucionar problemas taxonômicos (Carvalho-Silva et al. 2017). Essa ferramenta tem sido de extrema importância, por fornecer provas suficientes para a sinonimização, recircunscrição e delimitação de diversos táxons (Vanderpoorten & Shaw 2010).

As descobertas advindas das análises moleculares têm demonstrado equívocos nos padrões filogenéticos quando se baseiam apenas em caracteres morfológicos para a classificação. Entretanto, quando são inseridos dados moleculares para tais análises, temos a representação mais histórica e evolutiva desses padrões, que sugerem em alguns casos, novas circunscrições, e até mesmo servem como modelo para reavaliações morfológicas. Concomitantemente, pode ocorrer a descoberta de novas características morfológicas e a descrição de novos táxons (Holyoak & Pedersen 2007).

Em razão da problemática morfológica e taxonômica, bem como a ausência de estudos moleculares com as espécies de Fissidentaceae ocorrentes no Brasil, o objetivo desse trabalho foi propor uma hipótese filogenética para a família Fissidentaceae baseada em dados moleculares e testar o monofiletismo dos subgêneros de *Fissidens* propostos por Pursell & Bruggeman- Nannenga (2004) e Suzuki et al. (2018) tratados para o Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem geral

Foram realizadas coletas de material para obtenção de amostras frescas no período de 2018 e 2019, nos estados da Bahia, Goiás e Distrito Federal, e também foram analisados materiais de herbários como UB, SP, ALCB, QCNE, QCA (acronímias segundo Thiers, atualizado continuamente). As amostras coletadas foram herborizadas conforme as orientações de Yano (1984) e posteriormente depositadas no herbário da Universidade de Brasília (UB). Para as análises moleculares foram utilizadas amostras oriundas de coletas, material de herbário bem como 10 sequências extraídas do banco de dados GenBank.

2.2. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

As amostras foram lavadas com água destilada para retirada total do substrato e impurezas presentes. Em seguida foram acondicionadas em envelopes de papel filtro e armazenados em sílica para a sua secagem por aproximadamente três dias. O DNA foi

extraído pelo método mini-CTAB (Doyle & Doyle 1987), com adaptações (Câmara 2010). Utilizou-se os marcadores de cloroplasto, *rps4* e *trnG*, para a amplificação foi utilizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com as condições sugeridas por Werner et al. (2009) e temperatura de anelamento modificada para 51/52°C, já para o *trnG*, a temperatura ideal foi de 56/57°C.

Todos os processos de extração e amplificação foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília e a purificação e o sequenciamento realizados pela empresa MACROGEN INC (Coreia do Sul) e BPI Biotecnologia, Pesquisa e Inovação Ltda (Brasil).

2.3. Análise morfológica

Para a identificação do material, as amostras foram observadas em microscópio estereoscópico LEICA EZ4D e microscópio óptico DM 750. Foram montadas lâminas semipermanentes fixadas com Hoyer (Anderson 1954) para preservar o material testemunho e a identificação das espécies foi feita consultando Pursell (2007), e Bordin & Yano (2013). A partir desses dados foi feita uma tabela. Foram utilizados os caracteres considerados mais importantes para separação de espécies como a presença e/ou ausência do limbídio, papilas, tipo de costa, peristômio, e nódulo hialino (Pursell 2007).

O limbídio é constituído por células diferenciadas, prosenquimatosa, hialinas ou amareladas e pode ser uniestratoso ou pluriestratoso. Essa estrutura pode estar presente ou ausente e varia na largura e ocorrência (Pursell 2007). Para este caracter considerou-se os seguintes estados: limbídio ausente (A), limbídio em toda a lâmina do filídio (TF), limbídio restrito a lâmina vaginante de todos os filídios (LV) e limbídio apenas na lâmina vaginante dos filídios periqueciais (FP).

As células do filídio podem ser lisas ou ornamentadas (unipapilosa, pluripapilosa ou prorada) (Pursell 2007), para essa estrutura utilizou-se os seguintes estados: células lisas (L), células unipapilosa (UP) e células pluripapilosa (PL).

A costa em Fissidentaceae é simples, normalmente ocupando o meio do filídio, entre a lâmina dorsal e lâmina vaginante e apical, Bruggeman-Nannenga (1990) reconhece três tipos: o tipo *bryoides*, com duas células guias e duas bandas laterais estéreis separadas por uma (ou mais) célula central grande. O tipo *taxifolius* com quatro ou mais células guias e duas bandas laterais estéreis separados geralmente por 1-5 grandes células centrais e o tipo *oblongifolius* com três bandas de células esteroides (duas laterais

e uma ventral) e com até 16 células guia, dispostas na forma de u e V, e até 5 grandes células centrais. Para este critério, considerou-se a costa do tipo: *bryoides* (B) *taxifolius* (T) e *oblongifolius* (O).

O peristômio de Fissidentaceae é um endóstomo de 16 dentes geralmente divididos e possui algumas variações, das quais as mais importantes são as *bryoides*, *scariosus*, *similiretis* e *taxifolius* (Bruggeman- Nannenga & Berendsen 1990). Algumas espécies apresentam dentes não divididos ou parcialmente divididos, denominados de peristômio anômalo, em outras, essa estrutura pode estar ausente (Pursell 2007). Para esse caracter consideramos os seguintes estados, peristômio anômalo (AN), peristômio do tipo *scariosus* (SC), *bryoides* (BR) e *similiretis* (SI).

O nódulo axilar hialino é definido por Iwatsuki & Pursell (1980) como um grupo de células infladas e hialinas presente no caulídio, na axila dos filídios e morfologicamente, constituem-se em brotos primordiais que na maioria das vezes, permanecem indiferenciados. Para essa estrutura usou-se o critério presença e ausência.

2.4. Análises filogenéticas

As sequências de DNA obtidas foram editadas e montadas no Geneious v5.3.6 (Kearse et al. 2012), e alinhadas utilizando o programa ClustalX 2.1 (Thompson et al. 1997). Quando necessário foram ajustados manualmente, com PhyDe v0.9971 (Müller et al. 2005). O *outgroup* escolhido foi a espécie *Dicranum scoparium* baseados nos trabalhos de Cox et al. (2010).

As análises foram feitas por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana com o uso dos seguintes softwares respectivamente: PAUP* v. 4.0b10 para Macintosh (Swofford, 2002), RAXML v.8.2.X e MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). Os suportes para os nós foram obtidos por bootstrap não paramétrico para parcimônia e verossimilhança (Felsenstein 1985) e probabilidades posteriores para análise bayesiana.

Para as análises de verossimilhança e bayesiana, os modelos de evolução foram obtidos por meio do software JModeltest 2.1.1 (Guindon & Gascuel 2003). Além de substituições, *indels* foram codificados baseado em “Simple Indel Coding” (SIC; Simmons & Ochoterena 2000) usando o software Seqstate 1.4.1 (Müller 2005).

3. Resultados

Além das 95 amostras frescas (coletadas entre os anos de 2018 e 2019), foram analisadas 351 exsiccatas, 32 (QCNE), 54 (QCA) 40 (SP), 25 (ALCB) e 200 (UB) Contudo, só foi possível obter sequência dos materiais fresco e de herbário com coletas recentes entre 2009 – 2019, totalizando 48 espécies com ocorrência registrada no Brasil.

Foram testados quatro marcadores moleculares, três de cloroplastos (*rps4*, *trnL-F*, *trnG*) e um nuclear (*ITS*), contudo, o que obtivemos melhor resultado tanto para amplificação e para as análises, foram os marcadores *rps4* e *trnG*, ambos separam bem as categorias taxonomicas dentro de Fissidentaceae.

Para o *trnL-F* não possui variação suficiente para separar a categoria “espécie”, assim foi excluído do estudo. Entretanto as amostras amplificadas para o marcador *ITS*, foram muito variáveis, não permitindo um alinhamento confiável devido à alta variação no marcador, assim este também não foram utilizados.

3.1. Análise morfológica

As amostras foram observadas quanto às características morfológicas, considerando principalmente os caracteres considerados mais informativos para a identificação, como a presença e/ou ausência do limbidio, as células do filídio, tipo de costa, peristômio, e nódulo hialino.

O limbidio ausente predomina dentro do clado *Pachyfissidens*, incluindo todas os representantes do subgênero, mas em algumas espécies do subg. *Aloma* também está ausente, no entanto nenhuma espécie do subgênero *Fissidens* possui esse estado de caráter. O limbidio presente em toda a lâmina tem representantes dentro do subgênero *Fissidens* e *Aloma*. Para o limbidio restrito a lâmina vaginante de todos os filídios e o limbidio apenas na lâmina vaginante dos filídios periqueciais, o maior número de espécies foi encontrado no subgênero *Aloma*, embora também exista algumas espécies dentro de *Fissidens*.

As células lisas e as unipapilosas foram encontradas em todos os subgêneros. Embora o subgênero *Aloma* é o único que possui representantes com células pluripapilosas, neste também são encontradas espécies com células lisas e as unipapilosas.

A costa do tipo *bryoides* foi encontrada em todos os representantes do subgênero *Fissidens* e *Aloma*. A costa do tipo *oblongifolius* e *taxifolius* foram registradas apenas para o subg. *Pachyfissidens*.

O peristômio do tipo *bryoides* foi encontrado dentro do subg. *Fissidens*. O tipo *scariosus* predominou dentro do subg. *Aloma*, o peristômio anômalo foi observado no subgênero *Fissidens* e *Aloma* e o tipo *taxifolius* e *similiretis* apenas em *Pachyfissidens*. O nódulo axilar está presente e ausente em todos os grupos, não apresentando nenhum padrão.

Durante os estudos moleculares e morfológicos algumas amostras foram denominadas como espécies complexas, pois o resultado após percorrer a chave de identificação não condizia com os caracteres da descrição, um outro problema, é que alguns espécimes não estavam em fase reprodutiva, sendo impossível observar a presença ou ausência de limbidio nos filídios periqueciais, caracter útil para determinar algumas espécies.

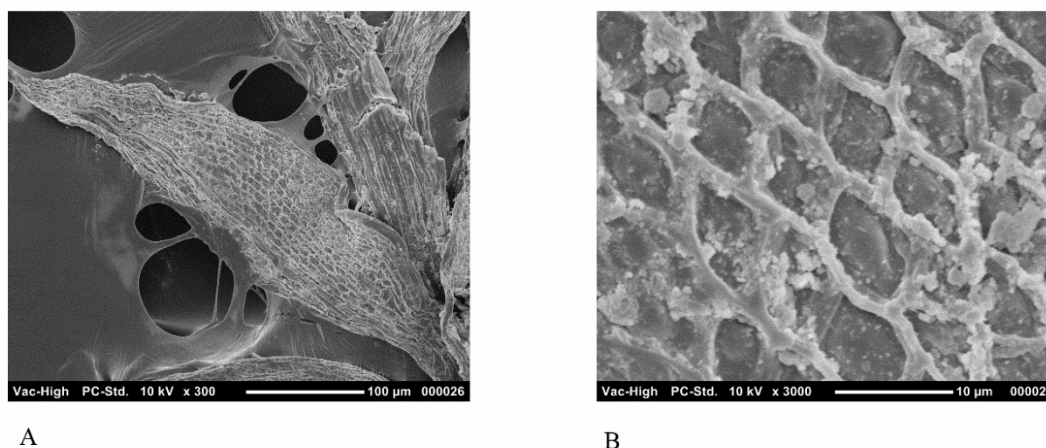


Fig. 1. Imagens de microscopia de varredura: *Fissidens noronhensis* A- filídio; B- células do filídio

3.2. Análises filogenéticas

A matriz de dados para as espécies que ocorrem no Brasil como as extraídas do GenBank que ocorrem no Japão foi obtida utilizando apenas o marcador *rps4*, no qual o comprimento final ficou de 633 pb (Fig 2).

Considerando os dados concatenados com os marcadores *rps4* e *trnG* para as espécies do Brasil, a matriz inclui 72 amostras representadas e o comprimento total de 1159 pb, sendo 633 pb para *rps4* e 526 pb para *trnG*. O modelo de substituição nucleotídica utilizado foi o GTR (General Time Reversible) para todas as árvores. As árvores resultantes (Fig. 2 e 3) confirmam o monofiletismo de *Fissidens* (Fissidentaceae) com três clados dentro do gênero, correspondendo aos subgêneros *Pachyfissidens*, *Fissidens* e *Aloma*.

A amostragem que inclui as espécies tratadas por Suzuki et al. (2018) e as espécies do Brasil (Fig. 2), o subg. *Neoamblyothalia* proposto por Suzuki et al. (2018) está posicionada dentro de *Pachyfissidens*. O subgênero *Pachyfissidens* (Fig 2), manteve como um grupo monofilético, em um clado com suporte (94/98/1).

Fissidens subgênero *Fissidens* também apresentou um alto suporte (98/80/0.9), entretanto os representantes de *Octodiceras* anteriormente designado por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) estão inseridos neste mesmo clado, evidenciando para o Brasil um único clado, nomeado *Fissidens* subgênero *Fissidens*.

Vale ressaltar que para essa análise incluindo as espécies com ocorrência para o Japão e as do Brasil, utilizou-se apenas o marcador *rps4* e os subgêneros *Pachyfissidens* e *Fissidens* permanecem bem resolvidos, entretanto, algumas espécies não tiveram resolução definidas como: *F. goyazensis*, *F. bogoriensis*, *F. asplenioides* e *F. scalaris*, não ficando claro a qual subgênero estas espécies pertencem. Ao analisar somente as espécies brasileiras e acrescentando o marcador *trnG*, os subgêneros tiveram um maior suporte e assim foram melhor resolvidos.

Sendo assim, após a inferência filogenética são reconhecidos 3 subgêneros com ocorrência no Brasil: *Pachyfissidens*, *Fissidens* e *Aloma*.

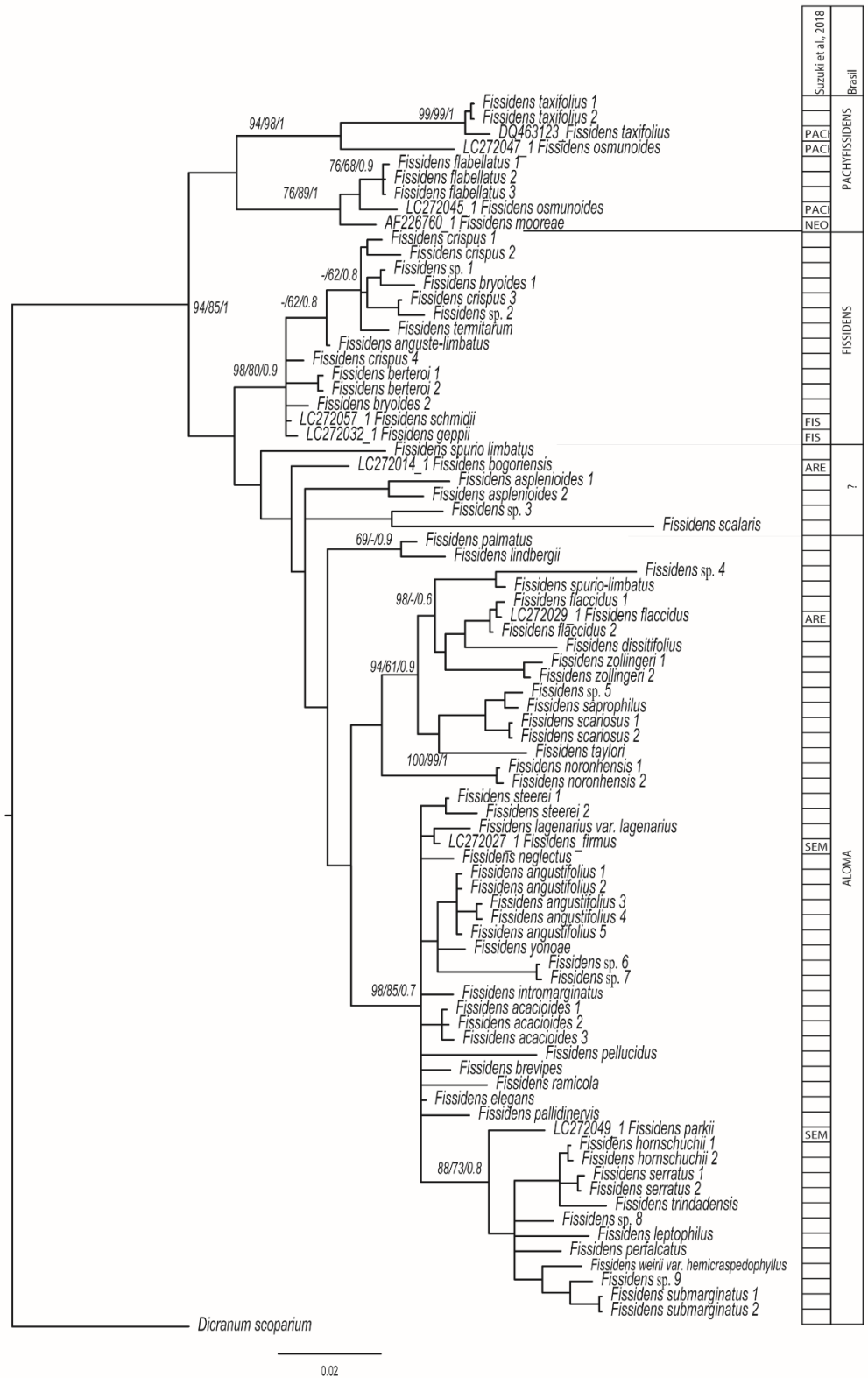


Fig. 2. Árvore filogenética baseada em análises com o marcador de cloroplasto *rps4* para espécies brasileiras e táxons japoneses retirados de Suzuki et al. (2018), os valores próximos aos ramos correspondem os valores obtidos por Parcimônia, Máxima verossimilhança e Inferência bayesiana

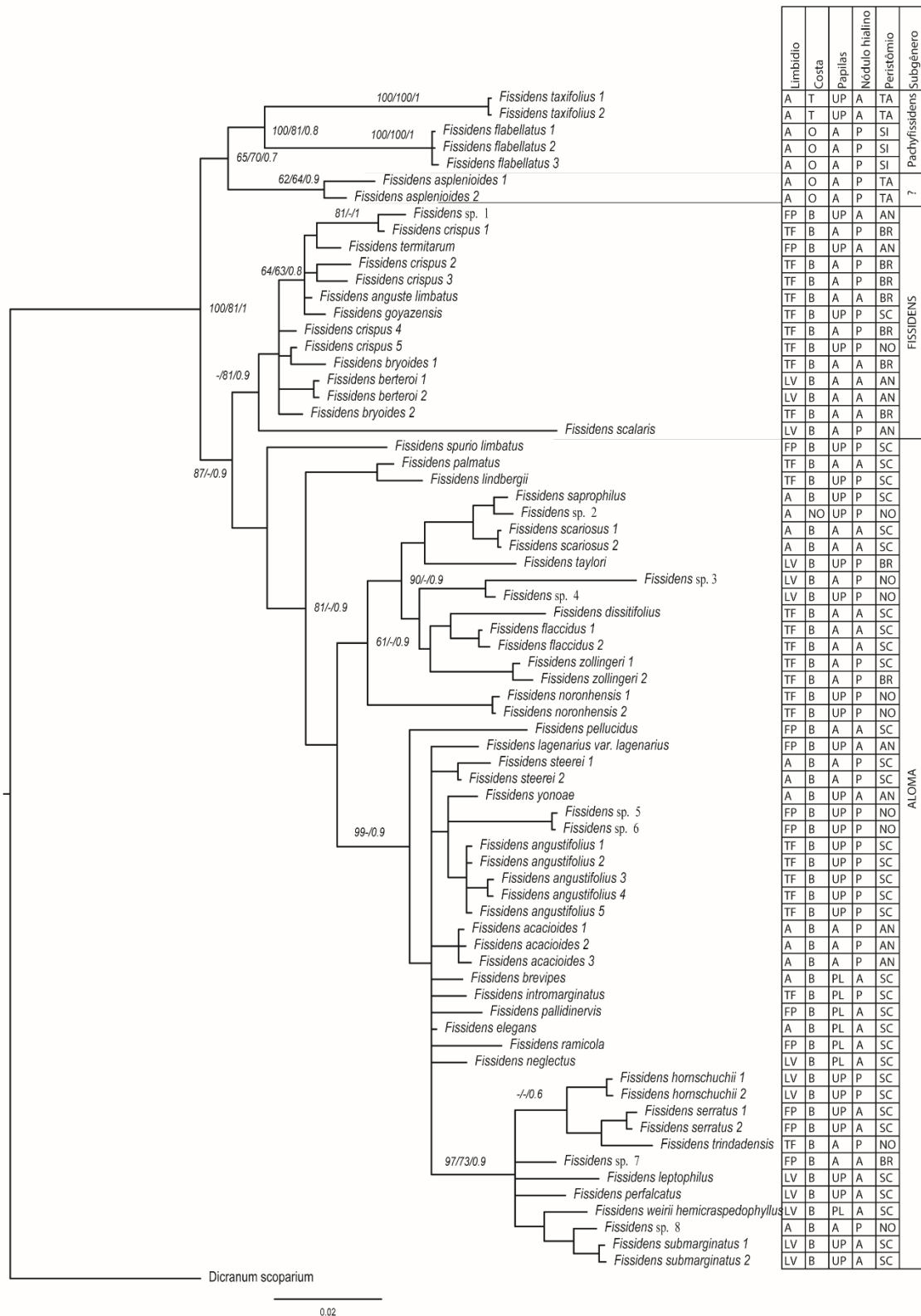


Fig. 3. Árvore filogenética baseada em análises com o marcador de cloroplasto *rps4* e *trnG* para as espécies brasileiras, os valores próximos aos ramos correspondem os valores obtidos por Parcimônia, Máxima verossimilhança e Inferência bayesiana, respectivamente. A tabela a direita indica os caracteres morfológicos (Limbídio: A- ausente, TF- limbídio em todo filídio, LV- limbídio restrito a lâmina vaginante, FP- limbídio nos filídios periqueciais, NO- não observado; Costa: B- tipo bryoides, O- tipo oblongifolius, T- tipo taxifolius, NO- não observado; Papilas: L- células lisas, UP- células unipapilosas, PL- células pluripapilosas; Nódulo hialino: P- presente, A- ausente; Peristômio: A- anômalo, S- tipo scariosus, BR- tipo bryoides, SI- tipo similiretis.. TA- tipo taxifolius;

4. Discussão

O marcador *rps4* foi o mais satisfatório para as análises obtidas, pelo fato de ter fácil amplificação e possuir alta variação entre as espécies de Fissidentaceae, separando bem as categorias taxonômicas de subgênero e espécie. Esse mesmo marcador foi utilizado para análise filogenética de 655 gêneros de musgos, incluindo *Fissidens* (Cox et al. 2010) e também para o estudo molecular das espécies de Fissidentaceae do Japão (Suzuki et al. 2018) evidenciando excelentes resultados.

O marcador *trnG* mostrou um nível relativamente alto de variabilidade, o que também foi verificado em outros trabalhos (por exemplo, Werner et al. 2009), e em alguns casos, aparentemente maior, em comparação com a região *trnL-F* (Pacak & Szweykowska-Kulińska 2000, Pedersen & Hedenäs 2003).

O uso do marcador propiciou uma maior resolução dos clados e os dados corroboram com os dados já obtidos usando o marcador *rps4*, entretanto, como não há amostras para a família no GenBank, este foi utilizado somente para as análises das espécies brasileiras.

A partir dos dados obtidos, o monofiletismo do gênero *Fissidens* foi confirmado e os dados aqui apresentados corroboram com a classificação sugerida por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004), com excessão do subg. *Octodiceras*, que baseados em dados moleculares estão junto com as espécies do subg. *Fissidens*. Desde a classificação proposta por Brotherus (1909,1924) *Octodiceras* sempre foi estreitamente relacionado a *Fissidens*, Brotherus ressaltava que não existiam características diagnósticas para reconhecer o subgênero *Octodiceras*.

Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) considera *Octodiceras* como um dos subgêneros mais avançados que reúne espécies que apresentam adaptações para o ambiente aquático, como plantas frágeis, flutuantes e com filídio longo e estreito. Contudo, este subgênero compartilha caracteres com os subg. *Fissidens* e *Aloma*, como costa do tipo *bryoides* e o peristômio anômalo. Suzuki et al. (2018) considerou o peristômio de *Octodiceras* como uma forma reduzida do proposto, *Fissidens-type*, e usou isso junto com os dados obtidos para não reconhecer a categoria.

Os dados moleculares aqui apresentados evidenciam que *Octodiceras* forma um único grupo com as espécies de *Fissidens* e as características morfológicas como a costa do tipo *bryoides* e o peristômio anômalo sustentam essa classificação.

Para o subgênero *Pachyfissidens* são amostrados dois táxons brasileiros, *F. taxifolius* e *F. flabellatus*. Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) sugeriram a divisão de *Pachyfissidens* em três seções: *Pachyfissidens*, *Amblyothalia* e *Crispidium*. Nossos dados (Fig. 2 e Fig. 3) corroboram com Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) no qual a espécie *F. taxifolius* possui características como costa e peristômio do tipo *taxifolius* (sec. *Pachyfissidens*) e *F. flabellatus* com costa do tipo *oblongifolius* e peristômio do tipo *similiretis* (sec. *Amblyothalia*).

Fissidens asplenioides Hedw. apesar do posicionamento inconclusivo na comparação com espécies com ocorrência no Japão, quando inserido somente com as espécies brasileiras, ela é colocada dentro do clado *Pachyfissidens*, (Fig. 3) mesmo com baixo suporte (65/70/0.7) consideramos a mesma como pertencente a este subgênero, já que compartilham das mesmas características morfológicas das espécies desse grupo, como limbidio ausente, costa *oblongifolius* e peristômio do tipo *taxifolius*

Todas as espécies brasileiras listadas para o subg. *Fissidens* baseado em dados moleculares corroboram com a classificação de Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004), com exceção de duas espécies, *F. termitarum* e *Fissidens* cf. *goyazensis*, as quais deveriam pertencer a *Aloma*, morfológicamente, *F. termitarum* compartilha características que permite sua inclusão dentro do subg. *Fissidens*, como o peristômio do tipo anômalo, entretanto, *F. cf. goyazensis* apresenta o peristômio do tipo *scariosus*, sendo assim, como não foi observado o esporófito desse material utilizado nas análises moleculares, sugerimos que outras espécies de *Fissidens* cf. *goyazensis* sejam incluídas para que tenhamos certeza que esse táxon pertence a este grupo ou se trata de um equívoco de identificação.

O subgênero *Aloma* proposto por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) e/ou seção *Aloma* (Suzuki & Iwatsuki 2007) inclui espécies com muita variabilidade morfológica e, segundo Suzuki et al. (2018), este é polifilético. Entretanto, os dados moleculares aqui apresentados sustenta o monofiletismo do subgênero *Aloma*.

Fissidens subg. *Aloma* é o maior grupo representado e as espécies do clado também confirma a classificação de Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004), exceto as

espécies *F. taylori* e *F. acacioides*, porém, Bruggeman-Nannenga (2021) relata que *F. acacioides* possui algumas exceções em relação ao próprio peristômio, este é anômalo e é sugerido como uma adaptação para o ambiente aquático. Sendo assim, apesar de anteriormente ser classificado como subgênero *Fissidens*, os dados moleculares o incluem dentro de subgênero *Aloma*, vale ressaltar que esse subgênero também apresenta espécies com o peristômio do tipo anômalo. Para compreender melhor a classificação da espécie *F. taylori* é necessário a inserção de mais amostras para validar qual subgênero essa espécie realmente pertence, no entanto, aqui consideramos como pertencente ao subgênero *Aloma*.

Suzuki et al. (2018) afirma que o "grupo" *Aloma* é estreitamente relacionado com *Fissidens* (subgênero e/ou seção) com evidências moleculares e morfológicas, como a costa do tipo *bryoides* e ainda reduziram os tipos de peristômios *bryoides* e *scariosus* em um, o tipo *fissidens*. Logo, eles não reconheceram o subgênero *Aloma* que se baseia principalmente no peristomo tipo *scariosus* e a presença de apenas 32 células exoteciais ao redor da cápsula. Ao invés disso, eles consideram um clado subg. *Fissidens* seção *Poliodiopsis* + sec. *Areofissidens* + sec. *Aloma* + sec. *Semilimbidium*.

No entanto, Bruggeman-Nannenga (2021), afirma que o clado com 4 das 5 seções do subg *Fissidens* de Suzuki et al. (2018) equivalem ao subgênero *Aloma* de Pursell & Bruggeman Nannenga (2004) agora com evidências esporofítica e molecular. Nossos dados corroboram com essa informação.

Considerando as análises morfológicas e moleculares aqui retratadas, *Pachyfissidens* é um dos subgêneros mais estável em relação a sua morfologia, os seus representantes apresentam peristômio do tipo *taxifolius* e *similiretis* e o limbidio ausente.

Após esse estudo fica evidente que o tipo de peristômio é um caráter importante para delimitar melhor os subgêneros, contudo, é necessário estudar detalhadamente as amostras brasileiras, principalmente, a ornamentação superior dos filamentos como foi feito para as espécies do Japão (Suzuki & Iwatsuki 2007). A importância desse carácter para classificação infragenerica também foi mencionada por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) e Bruggeman-Nannenga (2021). Aqui essa análise não foi minuciosa, devido a ausência de peristômio em parte das amostras.

Bruggeman-Nannenga e Berendsen (1990) consideraram que espécies que apresentavam o peristômio do tipo *taxifolius*, são primitivas, pois em alguns táxons da

família Dicranaceae também são encontrados uma estrutura peristômica semelhante. Esse caráter também foi mencionado por Suzuki et al. (2018) como uma estrutura filogeneticamente informativa e o mais útil para circunscrever cada subgênero.

De acordo com Suzuki et al. (2018), existem três apomorfias claras dentro dos subgêneros de Fissidentaceae, os dentes do peristômio, limbidio e o número de cromossomos, o peristômio do tipo *Pachyfissidens* (também conhecido como *taxifolius*) foi inferido como ancestral e o peristômio do tipo *Fissidens* evoluiu no subg. *Fissidens*.

Os demais caracteres são bastante heterogêneo e podem ser encontrados em todos os clados de Fissidentaceae, vale ressaltar, a necessidade de estudar de forma mais minuciosa as células papilosas, inclusive, as que sob o microscópio eletrônico são reconhecidas como lisas, pois nesse estudo verificou-se em microscópio eletrônico de varredura a presença de papilas em algumas células na base inferior de células consideradas lisas (Fig. 1).

Assim, propõe-se a classificação para as espécies de *Fissidens*:

Fissidens Hedw., Sp. Musc. Frond. 152. 1801. Tipo: *Fissidens bryoides* Hedw. (Lectótipo designado por E. Britton *in* Britton, Fl. Bermuda:435.1918).

Gametófito acrocárpico, caulídios eretos a decumbentes, simples ou ramificados. Nódulos axilares hialinos presentes ou ausentes, filídios dísticos, equitativos, complanado, limbidio presente em todo filídio ou ausente ou apenas em filídios periqueciais, costa única, geralmente bem desenvolvida, as vezes reduzida ou ausente, tipo bryoides, taxifolius ou oblongifolius, lâmina vaginante presente, células lisas, papilosas, gutuladas ou egutaladas, raramente prorada, esporófitos terminais, laterais ou basais, peristômio único, haplolepido, endostomado, raramente ausente, constituindo de 16 dentes, geralmente divididos $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ comprimento, raramente indiviso ou irregularmente dividido.

Fissidens Hedw. Subg. ***Pachyfissidens*** (Müll. Hal.) Kindb., Eur. N. Am. Bryin 2:166.1897. Tipo: *Fissidens grandifrons* Brid.

Limbídio ausente, costa do tipo taxifolius ou oblongifolius, peristômio do tipo taxifolius (*Pachyfissidens*) ou similiretis, nódulo axilar presente ou ausente.

Espécies representadas: *F. taxifolius* Hedw., *F. flabellatus* Hornsch.

Todas essas espécies representadas também pertenciam ao subg. *Pachyfissidens* na classificação anterior, proposta por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004).

Fissidens Hedw. Subg. **Fissidens**

Costa do tipo bryoides, limbidio em todo filídio ou restrito a lâmina vaginante, células laminais lisas ou unipapilosas, peristômio do tipo *bryoides* ou anômalo, nódulo presente ou ausente.

Espécies representadas: *F. crispus*, *F. termitarum*, *F. anguste-limbatus*, *F. cf. goyazensis*, *F. bryoides*, *F. berteroi*, *F. scalaris*.

Fissidens Hedw. Subg. **Aloma** Kindb., Eur. N. Am. Bryin. 2: 165. 1897. Tipo: *Fissidens pauperculus* M. Howe.

Costa do tipo *bryoides*, limbidio ausente, em todo filídio, ou restrito a lâmina vaginante, células lisas, unipapilosas ou pluripapilosas, peristômio do tipo *scariosus* ou anômalo, nódulo hialino presente ou ausente.

Espécies representadas: *F. spurio-limbatus*, *F. palmatus*, *F. lindbergii*, *F. saprophilus*, *F. scariosus*, *F. taylori*, *F. dissitifolius*, *F. flaccidus*, *F. zollingeri*, *F. noronhensis*, *F. pellucidus*, *F. lagenarius*, *F. steerei*, *F. yonoeae*, *F. angustifolius*, *F. acacioides*, *F. brevipes*, *F. intromarginatus*, *F. pallidinervis*, *F. elegans*, *F. ramicola*, *F. neglectus*, *F. hornschurchii*, *F. serratus*, *F. trinidadensis*, *F. leptophilus*, *F. perfalcatius*, *F. weirii*, *F. hemicraspedophylus*, *F. submarginatus*.

5. Conclusões

Considerando as análises moleculares e morfológicas das espécies com ocorrência registrada para o Brasil investigadas nesse estudo, é confirmado a classificação proposta por Pursell & Bruggeman-Nannenga (2004) para a família Fissidentaceae considerando a presença de três subgêneros no Brasil, *Pachyfissidens*, *Fissidens* e *Aloma*. Acreditamos que é necessário um estudo mais detalhado das estruturas morfológicas, como peristômio e papilas, principalmente utilizando o microscópio de varredura, e encontrar mais

caracteres sinapomorficos para melhor determinação dos subgêneros. Os dados moleculares e morfológicos desse estudo evidenciam que as características do limbidio, costa e principalmente do peristômio são úteis para delimitar os subgêneros.

6. Referencias

- Anderson LE. 1954. Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryologists. *The Bryologist* 57: 242-244.
- Ångström J. 1876. Primae lineae muscorum cognoscendorum, qui ad Caldas Brasiliae sunt collecti. *Öfversigt at Kongliga Vetenskaps-Akademiens, Forhandlingar* 33(4): 3-55.
- Bordin J. Yano O. 2013. Fissidentaceae (Bryophyta) do Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica* 22: 1-72.
- Bordin J. 2022. Fissidentaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB96294>>. Acesso em: 19 jun. 2022
- Brotherus, VF. 1895. Nouvelles contributions a la flore bryologique du Brésil. *Bihang til Kongliga Svenska Vetenskaps-akademiens Handlingar, Stockholm* 21(3): 3–76.
- Brotherus VF. 1909. [1901]. Fissidentaceae. *In: A. Engler & K. Prantl (eds.). Die natürlichen Pflanzenfamilien* 1(3): 351–363.
- Brotherus VF. 1924. Fissidentaceae. *In: A. Engler (ed.). Die natürlichen flanzenfamilien* 2. Leipzig. pp. 143–155.
- Bruggeman-Nannenga MA, Berendsen W. 1990. On the peristome types found in the Fissidentaceae and their importance for the classification. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 68: 193-234.
- Bruggeman-Nannenga MA. 2021. *Fissidens* subg. *Aloma*, the *scariosus*-and *bryoides*- type of peristome int the light of the phylogenetic tree by Suzuki et al. *lindbergia* 44:lindbg.01137.
- Câmara PEAS. 2010. Métodos de extração de DNA de Bryophyta para análises filogenéticas. *Boletim do Instituto de Botânica* 18:159-162.
- Cardot J. 1909. Diagnoses préliminaires de Mousses du Congo Belge et de la Casamance (2 article). *Revue Bryologique* 36: 16-20.
- Carvalho-Silva M, Stech M, Soares-Silva LH, Buck WR, Wickett NJ, Liu Y, Câmara PEAS. 2017. A molecular phylogeny of the Sematophyllaceae s.l. (Hypnales) based on plastid, mitochondrial and nuclear markers, and its taxonomic implications. *Taxon* 66 (4) :811-831.

- Cox CJ, Goffinet B, Wickett NJ, Boles SB, Shaw AJ. 2010. Moss diversity: a molecular phylogenetic analysis of genera. *Phytotaxa* 9: 175–195. <http://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.10>.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:779–783. doi: [10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x)
- Goffinet B, Buck WR, Shaw AJ. 2009. Morphology, anatomy and classification of the Bryophyte. In: B. Goffinet & A.J. Shaw (eds.). *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 55–138.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Grout AJ. 1941. A key to the Fissidentaceae of North America. *The Bryologist* 44(6): 129–136.
- Grout AJ. 1943. Bryales. Fissidentaceae. *Flora of North America* 15: 167–202.
- Hampe E. 1879. Enumeratio Muscorum: hactenus in provinciis Brasiliensibus Rio de Janeiro et São Paulo detectorum. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kjobenhavn* 26: 73–164.
- Hedwig, J. 1801. *Species Muscorum Frondosorum*. 152.
- Herzog T. 1909. [1910] Beiträge zur Laubmoosflora von Bolivia. *Beiheft Botanical Centralblatt* 26: 45-102.
- Holyoak DT, Pedersen N. 2007. Conflicting molecular and morphological evidence of evolution within the Bryaceae (Bryopsida) and its implications for generic taxonomy. *Journal of Bryology*, 29(2): 111-124.
- Iwatsuki Z. 1985. A new approach to the classification of the Fissidentaceae (Musci), In: H. Hara (ed.). *Origin and Evolution of Diversity in Plants and Plant Communities*.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649
- Martius, C.F.P. von, S. Endlicher, A.G. Eichler & J. Urban (eds.). 1840-1906. *Flora Brasiliensis*. München, Wien, Leipzig, Alemanha. Müller C. 1901. [1900]. *Genera Muscorum Frondosorum*. Leipzig.

- Müller KF. 2005. SeqState-primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4: 65–69
- Müller K, Quandt D, Müller J, Neinhuis C. 2005. Phylogenetic Data Editor, version 0.995. www.phyde.de.
- Oliveira HC, Bastos CJP. 2010. Fissidentaceae (Bryophyta) da Chapada da Ibiapaba, Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33(3): 393-405.
- Pacak A, Szweykowska-Kulińska Z. 2000. Molecular data concerning the allopolyploid character and the origin of chloroplast and mitochondrial genomes in the liverwort species *Pellia borealis*. *Journal of Plant Biotechnology* 2: 101–108.
- Pedersen N, Hedenäs L. 2003. Phylogenetic investigations of a well supported clade within the acrocarpous moss family Bryaceae: evidence from seven chloroplast DNA sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution* 240: 115–132.
- Pursell RA, Allen B. 1996. A comparison of *Fissidens appalachensis* and *F. bryoides* var. *pusillus*. *The Bryologist* 99: 75-80.
- Pursell RA, 1997. A comparison of *Fissidens obtusifolius* and *F. sublimbatus*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 82: 203-212.
- Pursell RA, Bruggeman-Nannenga MA. 2004. A revision of the infrageneric taxa of *Fissidens*. *The Bryologist* 107(1): 1–20.
- Pursell RA. 2007. Fissidentaceae. *Flora Neotropica, Monograph* 101: 1–278.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sehnem A. 1972. Musgos Sul-Brasileiros III. *Pesquisas, Botânica* 29: 1-70.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49:349–381.
- Suzuki T, Iwatsuki Z. 2007. A new approach to the infrageneric classification of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryopsida). *Hikobia* 15, 67–85.
- Suzuki T, Inoue Y, Tsubota H. 2018. Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 190–202.
- Swofford DL. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Teixeira, T.P.O, Faria, A.L.A, Bordin, J. & Carvalho-Silva, M. (2022). Phylogeny and

morphology of Fissidentaceae Schimp. in the South Atlantic Islands and description of a new species. *Cryptogamie, Bryologie* 43 (1): 1-8. <https://doi.org/10.5252/cryptogamie-bryologie2022v43a1>. <http://cryptogamie.com/bryologie/43/1>

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin, Higgins DG.1997. The Clustax windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.

Werner O, Patiño J, González-Mancebo JM, Gabriel RMA, Ros RM .2009. The taxonomic status and the geographical relationships of the Macaronesian endemic moss *Fissidens luisieri* (Fissidentaceae) based on DNA sequence data. *Bryologist* 112, 315–324.

Yano O. 1984. Briófitas. In: Fidalgo O, Bononi V (ed.), *Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material botânico. Série Documentos, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.* pp 27-30

Yano O, Oliveira-e-Silva MIMN. 1997. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Briófitas, 2: Fissidentaceae (Bryales). *Hoehnea* 24(2):107-114.

7. Anexos

Tabela 1. Amostras analisadas. Amostras, estado, voucher, herbário e marcadores amplificados.

AMOSTRAS	ESTADO	VOUCHER	HERBÁRIO	<i>rps4</i>	<i>trnG</i>
<i>F. acacioides</i>	RS	Bordin,3946	UB	x	x
<i>F. acacioides</i>	RS	Bordin, 3949	UB	x	x
<i>F. anguste-limbatus</i>	RS	Bordin, 3836	UB	x	x
<i>F. angustifolius</i>	GO	Bijos, 136	UB	x	
<i>F. angustifolius</i>	*	Ferreira, 369	UB	x	x
<i>F. angustifolius</i>	GO	Faria, 710	UB	x	
<i>F. angustifolius</i>	MG	Câmara,864a	UB	x	
<i>F. angustifolius</i>	RJ	Faria, 1267	UB	x	x

<i>F. asplenioides</i>	RJ	Faria, 1170b	UB	x	x
<i>F. berteroi</i>	RS	Bordin, 1940	SP	x	x
<i>F. berteroi</i>	RS	Gonzatti,3614	HUCS	x	x
<i>F. brevipes</i>	DF	Teixeira, 96	UB	x	x
<i>F. bryoides</i>	SP	Peralta,12470	SP	x	
<i>F. bryoides</i>	USA	Shevock,32994	UB	x	x
<i>F. crispus</i>	USA	Shevock,29721	UB	x	x
<i>F. crispus</i>	RS	Bordin, 3779	UB	x	x
<i>F. crispus</i>	DF	Gama, 563	UB	x	
<i>F. crispus</i>	DF	Gama, 560	UB	x	x
<i>F. crispus</i>	RS	Bordin, 3887	UB	x	x
<i>F. curvatus</i>	RS	Bordin, 3776	UB	x	x
<i>F. dissitifolius</i>	BA	Teixeira, 43	UB	x	x
<i>F. elegans</i>	DF	Soares, 128	UB	x	
<i>F. flabellatus</i>		Bordin, 2054	SP	x	
<i>F. flabellatus</i>	SP	Bordin, 3766	UB	x	x
<i>F. flaccidus</i>	DF	Teixeira, 85	UB	x	x
<i>F. flaccidus</i>	PE	Pereira, 226	UB	x	x
<i>TP76</i>	RS	Bordin, 3967	UB	x	x
<i>F. goyazensis</i>	BA	Bordin, 2171	SP	x	
<i>F. hornschurchii</i>	PE	Faria, 111	UB	x	x
<i>F. hornschurchii</i>	PE	Faria, 278	UB	x	
<i>F. hornschurchii</i> T	PE	Faria, 592	UB	x	
<i>TP259</i>	GO	Teixeira, 94	UB	x	x

<i>F. intromarginatus</i>	RJ	Faria, 1250	UB	x	
<i>F. lagenarius</i> var. <i>lagenarius</i>	SP	Bordin, 2134	SP	x	x
<i>TP20</i>	DF	Coelho,2990189	UB	x	
<i>TP206</i>	DF	Carvalho, 28	UB	x	
<i>F. lindbergii</i>	BA	Teixeira, 17	UB	x	x
<i>TP260</i>	RJ	Faria, 1276	UB	x	
<i>F. neglectus</i>	MA	Bordin, 2009	SP	x	
<i>F. noronhensis</i>	PE	Pereira, 497	UB	x	x
<i>F. noronhensis</i>	PE	Pereira, 126	UB	x	x
<i>F. leptophilus</i>	GO	Carv-Silva,1881	UB	x	x
<i>F. pallidinervis</i>	RS	Bordin, 3866	UB	x	x
<i>F. pallidinervis</i>	RS	Bordin, 3764		x	
<i>F. pallidinervis</i>	RS	Bordin, 3761	UB	x	x
<i>F. palmatus</i>	BA	Sousa, 598	UB	x	x
<i>F. perfalcatus</i>	MG	Cunha, 254	UB	x	x
<i>TP43</i>	RS	Bordin, 3864	UB	x	
<i>F. pellucidus</i>	DF	Teixeira, 83	UB	x	x
<i>F. ramicola</i>	BA	Vilas-Bôas 3243	ALCB	x	x
<i>TP147</i>	GO	Teixeira, 68	UB	x	
<i>F. scariosus</i>	RS	Bordin, 3868	UB	x	x
<i>F. scariosus</i>	RS	Bordin, 3827	UB	x	x
<i>F. spurio limabrus</i>	RS	Bordin, 3767	UB	x	x
<i>F. serratus</i>	DF	Soares, 846	UB	x	x
<i>TP 128</i>	MG	Cunha, 248	UB	x	

<i>F. steerei</i>	PE	Pereira, 70b	UB	x	x
<i>F. steerei</i>	PE	Pereira, 68	UB	x	x
<i>F. submarginatus</i>	RS	Bordin, 3871	UB	x	x
<i>F. submarginatus</i>	RS	Bordin, 3870	UB	x	x
<i>F. taxifolius</i>	PR	Bordin, 4004	SP	x	x
<i>F. taxifolius</i>	PR	Henz, s/n	SP	x	x
<i>F. taylori</i>	MG	Peralta, 11929	SP	x	x
<i>TP 184</i>	RS	Bordin, 3951	UB	x	x
<i>F. termitarum</i>	BA	Oliveira, 44	ALCB	x	
<i>F. trinidadensis</i>	PE	Faria, 420	UB	x	
<i>F. weirii</i> var. <i>hemicraspedophyllus</i>	RJ	Faria, 1274	UB	x	
<i>F. weirii</i> var. <i>weirii</i>	DF	Teixeira, 84	UB	x	x
<i>F. yonoae</i>	RS	Bordin, 3829	UB	x	x
<i>F. zollingeri</i>	PE	Pereira, 120	UB	x	x
<i>F164</i>	MG	Sousa, 191	UB	x	
<i>F165</i>	RJ	Faria, 1275	UB	x	x

Tabela 2. Táxon, números de acesso do GenBank para a região *rps4*. *espécie utilizada como outgroup nas análises moleculares.

Táxon	Acesso GenBank
<i>Fissidens taxifolius</i>	DQ463123
<i>Fissidens osmunoides</i>	LC272047_1
<i>Fissidens moorae</i>	AF226760_1
<i>Fissidens schmidii</i>	LC272057_1

<i>Fissidens geppii</i>	LC272032_1
<i>Fissidens bogoriensis</i>	LC272014_1
<i>Fissidens flaccidus</i>	LC272029_1
<i>Fissidens firmus</i>	LC272027_1
<i>Fissidens parkii</i>	LC272049_1
* <i>Dicranum scoparium</i>	GU068419_1

CAPÍTULO 2

Phylogeny and morphology of Fissidentaceae Schimp. in the South Atlantic Islands and description of a new specie

Artigo publicado na Revista Cryptogamie

Doi: <https://doi.org/10.5252/cryptogamie-bryologie2022v43a1>

Phylogénie et morphologie des Fissidentaceae Schimper. dans les îles de l'Atlantique Sud et description de la nouvelle espèce

Tamara Poliana de Oliveira Teixeira ^(1,3), Allan Laid Alkimin Faria ⁽¹⁾, Juçara Bordin ⁽²⁾, Micheline Carvalho-Silva ⁽¹⁾

¹ Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

² Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade Litoral Norte -Osório, Rua Machado de Assis, 95520-000, Osório, RS, Brazil

³ Author for correspondence (marahadassa@hotmail.com)

ABSTRACT

Phylogenetic and morphological analyzes were used to compare the samples collected in the Fernando de Noronha and Trindade Islands with the continental ones. A phylogenetic tree comprising 37 representatives of *Fissidens* was reconstructed using plastid gene data (trnG and rps4). Specimens of *F. flaccidus* Mitt. and *F. hornschurchii* Mont. on the islands are genetically and morphologically similar to samples from the continent. Together these studies showed that the *F. crispus* Mont. occurring on Fernando de Noronha is a species that differs both from those previously recorded on islands and from those on the continent, leading us to describe a new species. Furthermore *F. steerei* Grout is new recorded to Fernando de Noronha, Brazil.

RÉSUMÉ

Des analyses phylogénétiques et morphologiques ont été utilisées pour comparer les échantillons prélevés dans les îles Fernando de Noronha et Trindade avec les échantillons continentaux. Un arbre phylogénétique comprenant 37 représentants de *Fissidens* a été reconstruit en utilisant les données des gènes plastidiens (trnG et rps4). Des spécimens de *F. flaccidus* Mitt. et *F. hornschurchii* Mont. sur les îles sont génétiquement et morphologiquement similaires aux échantillons du continent. Ensemble, ces études ont montré que le *F. crispus* Mont. présente sur Fernando de Noronha est une espèce qui diffère à la fois de celles précédemment recensées sur les îles et de celles du continent, ce qui nous amène à décrire une nouvelle espèce. En outre *F. steerei* Grout est nouveau enregistré à Fernando de Noronha, Brésil.

Key words: Endemism, *Fissidens*, Fernando de Noronha Island, Trindade Islands, rps4 marker, trnG marker.

Mots clés : endémisme, *Fissidens*, Île Fernando de Noronha, Île Trindade, rps4, trnG.

Introduction

The South Atlantic Islands are widely dispersed and extends from the Tropic of Cancer to the Southern Ocean, they are largely volcanic, some rise close to the crest of the Atlantic while other mountain ranges are built on submarine banks closer to the continental margins (Baker 1973).

Among the islands of the South Atlantic, are the Trindade Island and the Archipelago of Fernando de Noronha. According to Soto (2009), from the XVI century onwards, the Trindade and Fernando de Noronha Islands offered conditions for human occupation, causing profound environmental changes through the introduction of exotic species; deforestation; mineral exploration and infection of water bodies. However, the biodiversity of these islands is still remarkable, the percentage of endemic species is high and the vulnerability of these species is high compared to those of the continent, due to the restricted and unique geographical space (Walter 2004).

Trindade Island was discovered in 1502 and between 1700 to 1926 it was occupied, abandoned and reoccupied many times (Alves 1998). It is located about 1,200km from the Brazilian coast, with a maximum altitude of 620m and its area totaling 9.28 km², the climate is tropical Atlantic, mitigated by east and southeast trade winds with an annual average temperature of 27 °C (Serafini *et al.* 2010). The island currently has a great diversity of vascular plants with approximately 130 taxa, including 11 endemic species (Alves 2006). The mosses are represented by 11 taxa, distributed in 8 families, the richest in number of species of which are Fissidentaceae, Leucobryaceae and Pottiaceae with two species each. For the Fissidentaceae these are *Fissidens zollingeri* Mont. and *F. hornschurchii* Mont. (Faria *et al.* 2012).

The Archipelago of Fernando de Noronha was discovered in 1503 (Teixeira *et al.* 2003) and is located 345 km from the Brazilian coast and comprises a total of 21 islands and islets. The climate is tropical, with two well-defined seasons, the dry (August to February) and the rainy (March to July), with an average precipitation of 1,400 mm and an average temperature of 25°C (Serafini *et al.* 2010). The phanerogam flora is represented by 450 species (Batistella 1993) and the bryoflora has 28 species, of which 23 are mosses distributed in eight families, the Fissidentaceae being best represented with 12 species (Pereira & Câmara 2015).

Fissidentaceae Schimp. is one of the largest and most wide spread families of mosses, with approximately 440 species (Crosby *et al.* 2000). In the Neotropics there are 93 species, of which 62% are endemic (Pursell 2007). In Brazil the family is represented by 72 taxa, occurring in all biomes (Bordin & Yano 2013).

The family is monogeneric and characterized by distichous, equitant leaves, the distinctive leaf is composed of two vaginant laminae, one ventral lamina and one dorsal lamina (Pursell 2007). Despite being well delimited, the genus *Fissidens* is taxonomically difficult and highly variable (Iwatsuki & Suzuki 1982; Pursell 2007) due to differences in size, cell ornamentation and other characteristics that overlap in many species (Bordin & Yano 2013).

Several molecular phylogenetic studies have been carried out to clarify the relationships within closely related species, such as *F. bryoides* Hedw., *F. dubius* P. Beauv. and *F. adianthoides* Hedw. (Hassel *et al.* 2013), and the geographical relationships of the endemic moss *Fissidens luisieri* P. Varde from Macronesia (Werner *et al.* 2009), as well as the species of Fissidentaceae from Japan (Suzuki *et al.* 2018). So far, no molecular study has been carried out for *Fissidens* on the South Atlantic islands

and phylogenetic relationships between species occurring on these islands and on the continent are unknown.

In this context, the present study aimed to understand the evolutionary value and the morphological and genetic variations found between island and continental populations of the species of *Fissidens*.

Materials and methods

Samples of 37 specimens of *Fissidens* from Archipelago of Fernando de Noronha, Trindade Island and Brazilian continent were selected, all deposited in the UB and SP Herbaria (Additional documents 1). To confirm the identity of the specimens semi-permanent slides were mounted with Hoyer (Anderson 1954) and observed with an optical microscope.

DNA was extracted using the mini-CTAB method (Doyle & Doyle 1987), with adaptations (Câmara 2009). Two phylogenetic markers were selected for the present analyses, chloroplast ribosomal protein S4 (*rps4*) and *trnG* intron. For the amplification, the polymerase chain reaction (PCR) technique was used, and the annealing temperature modified to 51/52°C for the *rps4* marker (Suzuki *et al.* 2018) and 58°C for *trnG* (Werner *et al.* 2009). The sequencing was done by MACROGEN INC. (South Korea).

Sequences of the two genes were aligned separately by using the ClustalX 2.1 (Thompson *et al.* 1997) and MAFFT 7.0 (Kato *et al.* 2002). When necessary, they were adjusted manually, with PhyDe v0.9971 (Müller *et al.* 2006). The analyzes were made by Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian analysis using the following software, respectively: PAUP * v. 4.0b10 for Macintosh (Swofford 2002), RAXML v.8.2.X and MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012).

Clade support was evaluated using the non-parametric bootstrap (Felsenstein 1985). The Bayesian Inference (BI) support was evaluated using posterior probabilities.

For the likelihood and Bayesian analyzes, the evolution models were obtained using the JModeltest 2.1.1 software (Guindon & Gascuel 2003). In addition to substitutions, indels were coded based on “Simple Indel Coding” (SIC; Simmons & Ochoterena 2000) using the Seqstate 1.4.1 software (Müller 2004). Maximum likelihood scores were calculated for topologies with and without restriction. The significance of the difference between the two hypotheses was given by the SH test (Shimodaira & Hasegawa 1999). *Dicranum scoparium* was chosen as an outgroup, based on the results of Cox *et al.* (2010).

Results

Based on the morphological and molecular analyses carried out in this study, we could confirm the presence of four species in the Fernando de Noronha Islands: viz. *F. flaccidus* Mitt., *F. zollingeri* Mont., *F. steerei* Grout and, *F. noronhensis* sp. nov. and two species in the Trindade islands: viz. *horschuchii* Mont., *Fissidens* sp.

The concatenated data matrix had a total length of 1,120bp, which one 668bp for the *trnG* and 452bp for the *rps4*. There was no incongruity between the trees when the markers were analyzed separately. The nucleotide substitution model used was GTR (General Time Reversible) for all trees. The resulting tree (Fig. 1) separates the species that occur on the Trindade Island, Fernando de Noronha and the continent.

Clades A and F present the specimens identified as *F. crispus* continental and insular, respectively. The insular specimens are genetically (Additional documents 2), and morphologically (Figs. 2A-G) different from the specimens of the continent forming two distinct, separate clades with high support: clade A (96/100/1), and clade F (100/93/1). The island specimens are described as *Fissidens noronhensis* sp. nov.

Clade B includes the species *F. horschuchii* from Trindade Island with high support (90/95/1). We didn't find morphological or genetic differences with the specimens of the continent, although a sampled specimen from Trindade Island (*F.*

hornschuchii T VI) is not within the clade. The monophilia test Shimodaira-Hasegawa (SH) was performed and showed that the tree without restriction is significantly better than the tree with restrictions, with values greater than 0.5, thus the null hypothesis of non-monophyly of the specimens separately is not rejected.

Clade C is well supported (100/88/1) and includes the species *F. steerei*. Clades D and E comprise the species *F. flaccidus* and *F. zollingeri*, respectively, and includes specimens from the Fernando de Noronha as well as continental ones. The clades are well resolved and with high support (99/99/1), (100/99/1), respectively.

The material identified on the Trindade Island as *F. zollingeri*, is paraphyletic and differs genetically and morphologically (Additional documents 3), from the specimens of *F. zollingeri* from Fernando de Noronha and the continent.

Taxonomy

Fissidens noronhensis Teixeira, Bordin & M.Carv.-Silva, *sp. nov.* **Fig. 2A-G.**

Diagnosis

The new species differs from *Fissidens crispus* by its small plants (\pm 2mm versus 4-35 mm alt.), thin-walled and papillose (papillae inconspicuous in optical microscope). The new species resembles *F. lindbergii*, but can easily be distinguished by its much smaller cells (7.5 x 5 μ m versus 27-67 μ m in *F. lindbergii*) and its hardly visible papillae (when observed with an optical microscope and even when observed with SEM visible only in a few cells only), whereas in *F. lindbergii* papillae are easily visible in the center of the cells.

TYPE. BRAZIL. PERNAMBUCO: Fernando de Noronha, Trilha para Baía dos Golfinhos, 3°51'25"S, 32°26'37"W, 09.V.2014, Pereira & Santos 480 (holotype: UB isotype: SP).

Etymology: From latin *noronhensis*, referring to the name of Fernando de Noronha Archipelago.

Description:

Plants light to dark green. Stems monomorphic, unbranched or branched, quite variable in length, 2-3 mm long x 1.35-1.5 mm wide often dark brown red or castaneous proximally; weak axillary hyaline nodules present; epidermis and outer tiers of cortical cell small, incrassate, pigmented, inner cortical cells larger, thin-walled, hyaline, central strand present or absent; rhizoids basal, branched, smooth, brownish to castaneous; leaves crispate when dry, as many as 6 pairs, distant to imbricate, oblong to lanceolate, 0.7–0.10mm long x 0.2-0.3 mm wide, acute apex, margin entire, limbate typically on all lamina, limbidium usually ending slightly below leaf apex and at the leaf insertion (shorter in fig 2F), limbidial cells uni- to tristratose, with 1-3 rows of quadrate to oblong chlorophyllose cells on the proximal parts of vaginant laminae, costa percurrent, bryoides type, dorsal lamina variable, even on the same plant, ceasing at or slightly above insertion to long decurrent, vaginant laminae of cauline leaves ½ leaf length, acute, equal or nearly so; lamina cells eguttulate, unistratose, firm walled inconspicuously papillose (uni), papillae generally inconspicuous in optical microscope, cells (7.5 x 5 µm) and hexagonal, often arranged in distinct rows in dorsal and ventral lamina. Sporophyte not observed.

Additional material: BRAZIL. PERNAMBUCO, Fernando de Noronha, lat. 3 865556 long. 32 424444, 09.V.2014, Pereira & Santos 460 (UB). idem, lat. 3 858056 long. 32 442778, 04.V.2014, Pereira & Santos 235 (UB). ibidem, lat. 3 8575 long. 32 444167, 10. II .2014, Pereira & Santos 95 (UB). ibidem, lat. 3 5156 long. 32 2528, 09. V. 2014, Pereira & Santos 452 (UB).

Although the species is similar in some morphological aspects to *F. crispus* and *F. lindbergii*, genetically *F. noronhensis* forms a distant group from the other species and with high support (100/93/1), comprising 36 mutations using the markers rps4 e trnG, being 26 transitions and 10 transversions when compared with *F. lindbergii* and 34 mutations, 23 transitions and 11 transversions with *F. crispus*.

4. Discussion

Several island records proved to be based on incorrectly identified material. This is not unexpected as *Fissidens* is a taxonomically difficult and variable taxon (Iwatsuki & Suzuki 1982; Pursell 2007; Bordin & Yano 2013), which causes a lot of conflict in the identification and circumscription of species.

On Fernando de Noronha Island, 12 species of Fissidentaceae were listed by Pereira & Câmara (2015), however, after re-examination and molecular analysis, this number is reduced to seven. All the samples identified by Pereira & Câmara (2015) as *Fissidens lindbergii* A. Jaeger, were re-identified as *F. flaccidus*. The specimens identified as *F. biformis* Mitt. (as *F. angustifolius* Sull.), *F. bryoides* Hedw. and *F. goyazensis* Broth. all appeared to be one and the same undescribed species, *Fissidens noronhensis* sp. nov. The specimens named *F. hornschurchii* and *F. lagenarius* Mont. appeared to be *F. steerei*, a new occurrence for the Fernando de Noronha Island (Fig. 1).

The updated list comprises four species studied in this paper : viz. *F. flaccidus* Mitt., *F. zollingeri* Mont., *F. steerei* Grout and, *F. noronhensis* sp. nov. *Fissidens*

lindbergii, *F. biformis* (as *F. angustifolius* Sull.), *F. bryoides*, *F. hornschurchii*, *F. lagenarius* and *F. goyazensis* are excluded from the bryoflora of the Fernando de Noronha Island.

Clade D, includes one species *F. flaccidus*. The specimens included in the clade were cited as *F. lindbergii* by Pereira & Câmara (2015). However, *F. lindbergii* has papillose cells whereas these specimens have smooth cells and thus are *F. flaccidus*. Mainland specimens of *F. flaccidus* are morphologically or genetically identical with the island species.

The clade C includes the specimens *F. steerii* from Fernando de Noronha Island. *Fissidens steerei* has a wide distribution, occurring in Mexico, Central America, and South America, growing on soil, limestone and sandstone, usually close to watercourses (Pursell 2007) and are also found on islands, such as Mona Islands (Reyes-Colón & Sastre 1998). In Brazil, *F. steerei* is known only in Goiás and São Paulo states (Bordin & Yano 2013).

The inclusion of *F. crispus* in the phylogeny (Fig. 1) shows that the specimens from the continent do not form a monophyletic clade with the specimens identified as *F. crispus* from Fernando de Noronha (Clades A and F). Moreover, they are morphologically quite different. *Fissidens noronhensis* has smaller gametophytes, an acute apex, thin-walled and papillose (papillae inconspicuous in optical microscope). These differences separates *F. crispus* specimens from the continent from the island specimens, thus allowing the recognition of a new species, *Fissidens noronhensis* from Fernando de Noronha Island, with a genetic distance of 0 between them, however, the continental ones varied genetically, obtaining an average distance between them of 0.006 (Additional documents 3).

Although Fernando de Noronha is a small island of approximately 26 km² but very close to the Brazilian continent, about 545 km, it shares three species of *Fissidens* with the continent (*F. flaccidus*, *F. zollingeri*, *F. steerei*). *Fissidens noronhensis* is endemic to the island and *Fissidens zollingeri* and *F. flaccidus* are also known from Pernambuco, one of the closest states to the island, suggesting that these species may have arrived on the island due to the flow of people caused by the strong tourism occurring in Noronha, as well as long distance dispersion (LDD). The spores contribute to the LDD, mainly, the monoecious species (like the two mentioned) that present larger ranges than the dioecious species (Longton & Schuster 1983). Evidence suggests that vegetative propagules may also contribute to LDD by the wind over more than 4000 km (Karlin *et al.* 2011).

All species registered for Trindade and Fernando de Noronha Island are monoecious species with a rhizautoicous system (male branches attached to the female ones by the rhizoid), this condition favors a greater pre-zygotic investment directed to the male function (Santos *et al.* 2018). In bryophytes it can be explained by the segregation of sexual functions observed in the rhizautoicous and dioicous systems.

These characteristics reveal that the law of Baker (1973) applies to bryophytes, because there is a predominance of bisexual species in the islands, this feature allows intra-gametophytic self-fertilization (fusion of gametes produced by adult gametophytic shoots of the same protonema, and therefore originating from the same sporophyte), thus being able to quickly eliminate harmful recessive mutations and avoid the demographic effect of inbreeding depression (Patiño *et al.* 2013).

For the Trindade Island, the occurrence of two species of Fissidentaceae was confirmed, *Fissidens* sp. and *F. hornschuchii*. The latter is also found in the Brazilian continent corroborating the hypothesis that this species may have arrived through the flow of people visiting the island or through LDD (Karlin *et al.* 2011). The lower number of

species could be explained by the small size of the island when compared to Fernando de Noronha.

The new specie *Fissidens noronhensis* were also inserted in other analyzes with other species of Fissidentaceae (Teixeira *et al. in prep.*). The results support the present clades. As Trindade and Fernando de Noronha are oceanic islands, endemic species are common due to their geolocation, as well as the eventuality of speciation occurring quickly (Stuessy & Ono 1998). Other endemic species have been recorded on other islands as Society Islands (Whittier & Miller 1967), Easter Island (Ireland & Bellolio 2002), and Macronesia (Lobo *et al.* 2011).

It is worth mentioning that all-species found here to occur in Trindade and Fernando de Noronha Islands, have also been reported for other islands: *F. crispus* from Madeira Archipelago (Lobo *et al.* 2011), *F. flaccidus* from the Arabian Peninsula and Socotra (Kürschner & Ochyra 2004), *F. zollingeri*, *F. steerei* in Mona Islands (Reyes-Colón & Sastre -DJ 1998) and *F. hornschurchii* from the Virgin Islands (Pursell 2007).

Acknowledgments

We thank the curators of the herbaria for the loan of specimens under their care. We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grant/Award Number: 001.

5. References

- ALVES R. J. V. 1998. — *Ilha da Trindade e Arquipélago Martin Vaz: Um Ensaio Geobotânico*. Serviço de Documentação da Marinha do Brasil, Rio de Janeiro. Diretoria de Hidrografia e Navegação: 144 p.
- ALVES R. J. V. 2006. — Terrestrial vascular floras of Brazil's oceanic archipelagos. *in*: ALVES R. J. V & CASTRO J. W. A. (eds.). *Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo*: 83-104.

- ANDERSON L. E. 1954. — Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryologists. *The Bryologist* 57: 242-244. <https://doi.org/10.2307/3240091>
- BAKER P. E. 1973. — Islands of the South Atlantic. In: NAIRN A. E. M & STEHLI F. G (eds) *The South Atlantic*. Springer, Boston, MA, 493-553. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3030-1_13
- BATISTELLA M. 1993. — *Cartografia Ecológica do Arquipélago de Fernando de Noronha*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo: 236 p.
- BORDIN J. & YANO O. 2013. — Fissidentaceae (Bryophyta) do Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica* 22: 1-72.
- CÂMARA P. E. A. S. 2009. — Métodos de extração de DNA de Bryophyta para análises filogenéticas. *Heringeriana* 3: 11 -17.
- COX C. J., GOFFINET B., WICKETT N. J., BOLES S. B. & SHAW A. J. 2010. — Moss diversity: a molecular phylogenetic analysis of genera. *Phytotaxa* 9: 175-195. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.10>
- CROSBY M. R., MAGILL R. E., ALLEN B. & HE S. 2000. — A Checklist of the Mosses. Missouri Botanical Garden, St. Louis. Available at <http://www.mobot.org/MOBOT/tropicos/most/checklist.shtml>
- DOYLE J. J. & DOYLE J. L. 1987. — A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- FARIA A. L., CARVALHO-SILVA M., COSTA D. P. & CÂMARA P. E. A. S. 2012. — The bryophytes of Trindade Island, South Atlantic, Brazil. *Acta botanica Brasilica* 26: 783-793. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062012000400008>
- FELSENSTEIN J. 1985. — Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- GUINDON S. & GASCUEL O. 2003. — A simple, fast and accurate method to estimate

- large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52 (5): 696-704.
doi: [10.1080/10635150390235520](https://doi.org/10.1080/10635150390235520)
- HASSEL K., SEGRETO R., & EKREM T. 2013. — Restricted variation in plant barcoding markers limits identification in closely related bryophyte species. *Molecular Ecology Resources* 13 (6): 1047–1057. doi:[10.1111/1755-0998.12074](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12074)
- IRELAND R. R. & BELLOLIO G. 2002. —The mosses of Easter Island. *Tropical Bryology* 21: 11–20. doi:[10.11646/bde.21.1.3](https://doi.org/10.11646/bde.21.1.3)
- IWATSUKI Z. & SUZUKI T. 1982. — A taxonomic revision of the Japanese species of *Fissidens* (Musci). *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 51: 329–508.
- KARLIN E. F., ANDRUS R. E., BOLES S. B. & SHAW A. J. 2011. — One haploid parent contributes 100% of the gene pool for a widespread species in northwest North America. *Molecular Ecology* 20:753–767. doi: [10.1111/j.1365-294X.2010.04982.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04982.x)
- KATOH K., MISAWA K., KUMA K. & MIYATA T. 2002. — MAFFT a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 9: 3059–3066. doi: [10.1093/nar/gkf436](https://doi.org/10.1093/nar/gkf436)
- KÜRSCHNER H. & OCHYRA R. 2004. — Remarkable new records to the bryophyte flora of Yemen (al-Mahra and Socotra Island). Additions to the bryophyte flora of the Arabian Peninsula and Socotra 5. *Cryptogamie Bryologie* 25: 69-81.
- LOBO C., SIM-SIM M., LUÍS L. & STECH M. 2011. — Chorological data and threat status evaluation of *Fissidens* species (Fissidentaceae, Bryophyta) on Madeira Archipelago. *Nova Hedwigia* 92: (1-2) 121-131. doi:[0.1127/0029-5035/2011/0092-0121](https://doi.org/0.1127/0029-5035/2011/0092-0121)

- LONGTON R. E. & SCHUSTER R. M. 1983. — Reproductive Biology. *in* SCHUSTER R. M. (ed.) *New Manual of Bryology*. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Japan, 386–462.
- MÜLLER K., QUANDT D., MÜLLER J. & NEINHUIS C. 2006. — Phylogenetic Data Editor, version 0.995. www.phyde.de.
- MÜLLER K. 2005. — SEQSTATE – primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Applied bioinformatics*. 4. 65-69. doi: 10.2165/00822942-200504010-00008
- PATIÑO J., BISANG I., HEDENÄS L., DIRKSE G., BJARNASON A. H., AH-PENG C. & VANDERPOORTEN A. 2013. — Baker’s law and the island syndromes in bryophytes. *Journal of Ecology* 101:1245–1255. doi:10.1111/1365-2745.12136
- PEREIRA C. G. & CÂMARA P. E. A. S. 2015. — Brioflora da Ilha de Fernando de Noronha, Brasil. *Pesquisas Botânica* 67: 149-179.
- PURSELL R. A. 2007. — *Fissidentaceae*. *Flora Neotropica*, Monograph 101: 1–278.
- REYES-COLÓN C. M. & SASTRE I. D. J. 1998. — Bryophytes of Mona Island Natural Reserve, Puerto Rico. *Tropical Bryology* 14:35-41. <https://doi.org/10.11646/bde.14.1.7>
- RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D. L., DARLING A., OHNA S. H., LARGET B., LIU L., SUCHARD M. A. & HUELSENBECK J. P. 2012. — Mrbayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across A Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3):539–542. doi: [10.1093/sysbio/sys029](https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029)
- SANTOS W. L., ALVARENGA L. D. P. & PÔRTO K. 2018. — Sexual dimorphism, vegetative growth and reproductive investment in the rhizautoicous moss *Fissidens flaccidus* (Fissidentaceae, Bryopsida). *Cryptogamie Bryologie* 39:1-11.

doi: [10.7872/cryb/v39.iss2.2018.271](https://doi.org/10.7872/cryb/v39.iss2.2018.271)

- SERAFINI T. Z., FRANÇA G. B. D. & ANDRIGUETTO-FILHO J. M. 2010. — Ilhas oceânicas brasileiras: biodiversidade conhecida e sua relação com o histórico de uso e ocupação humana. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 10 (3): 281- 301.
- SIMMONS M. P & OCHOTERENA H. 2000. — Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49:369-381.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.369>
- SOTO J. M. R. 2009. — Ações antrópicas negativas nas ilhas oceânicas brasileiras. *in*: MOHR L. V. M., CASTRO J. W. A., COSTA P. M. S. & VÁLKA R. (ed.). *Ilhas Oceânicas Brasileiras – da pesquisa ao manejo*: 321-342.
- SHIMODAIRA H. & HASEGAWA M. 1999. — Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular biology and evolution* 16(8): 1114-1116. [doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201)
- STUESSY T. F. & ONO M. 1998. — *Evolution and Speciation of Island Plants* NY, USA Cambridge University Press
- SUZUKI T., INOUE Y., TSUBOTA H. 2018. — Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 190-202.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.020>
- SWOFFORD D. L. 2002. — PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TEIXEIRA W., CORDANI U. G., MENOR E. A., TEIXEIRA M. G. & LINSKER R. 2003. — *Arquipélago Fernando de Noronha – o paraíso do vulcão*. Ed. Terra Virgem: 168 p.

- TEIXEIRA T. P. O., BORDIN J. & CARVALHO-SILVA M. Phylogeny of Fissidentaceae Schimp. (BRYOPHYTA) from Brasil. Unpublished.
- THOMPSON J. D., GIBSON T. J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D.G. 1997. —The Clustax windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882. doi: [10.1093/nar/25.24.4876](https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876)
- WALTER H. S. 2004. —The mismeasure of islands: implications for biogeographical theory and the conservation of nature. *Journal of Biogeography*, 31(2):177-197. doi:[10.1046/j.0305-0270.2003.00989.x](https://doi.org/10.1046/j.0305-0270.2003.00989.x)
- WERNER O., PATIÑO J., GONZÁLEZ-MANCEBO J. M., GABRIEL R. M. A. & ROS R. M. 2009. —The taxonomic status and the geographical relationships of the Macaronesian endemic moss *Fissidens luisieri* (Fissidentaceae) based on DNA sequence data. *Bryologist* 112: 315–324. doi: [10.1639/0007-2745-112.2.315](https://doi.org/10.1639/0007-2745-112.2.315)
- WHITTIER H. O & MILLER H. A. 1967. Mosses of the Society Islands: *Fissidens*. *The Bryologist* 70: 76-93. doi: [10.2307/3241141](https://doi.org/10.2307/3241141)

figures

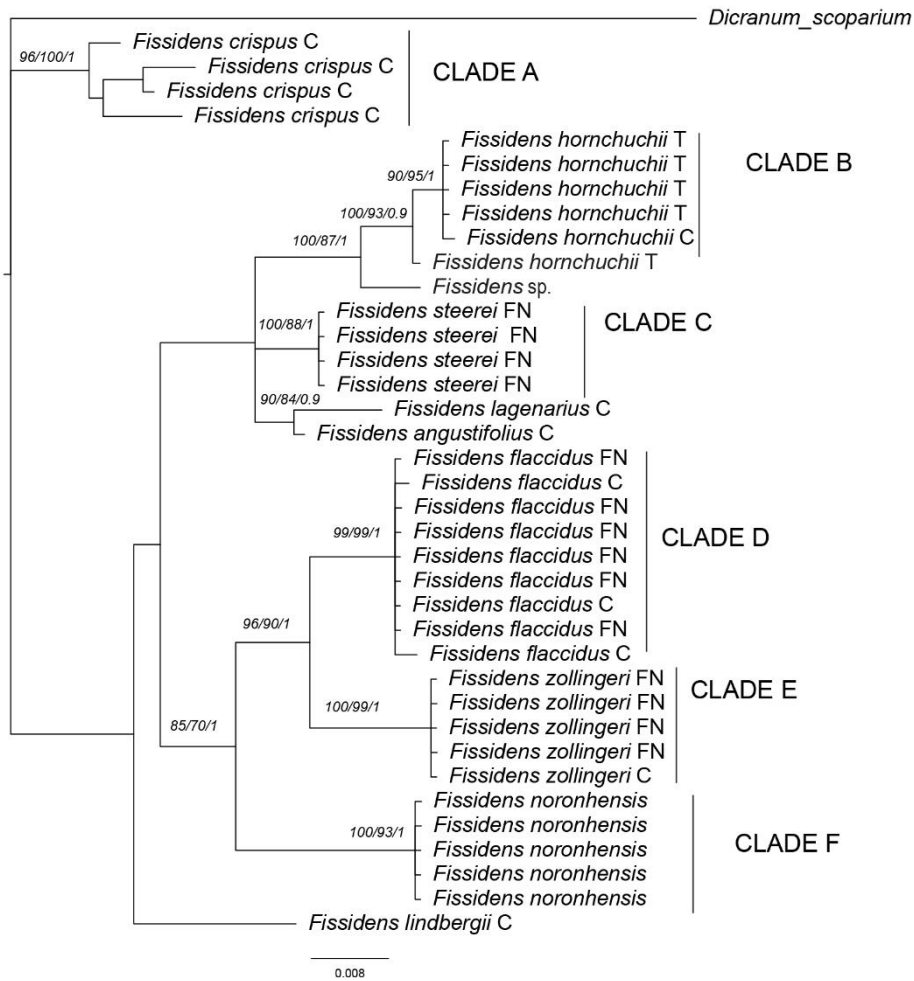


Figure 1. Phylogenetic tree based on analysis with the concatenated sequences of chloroplast *rps4* and *trnG* genes. The numbers next to the branches are the bootstrap values for Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and later probabilities for Bayesian, respectively. Abbreviations follow, C (continental); T (Trindade Island); FN (Fernando de Noronha)

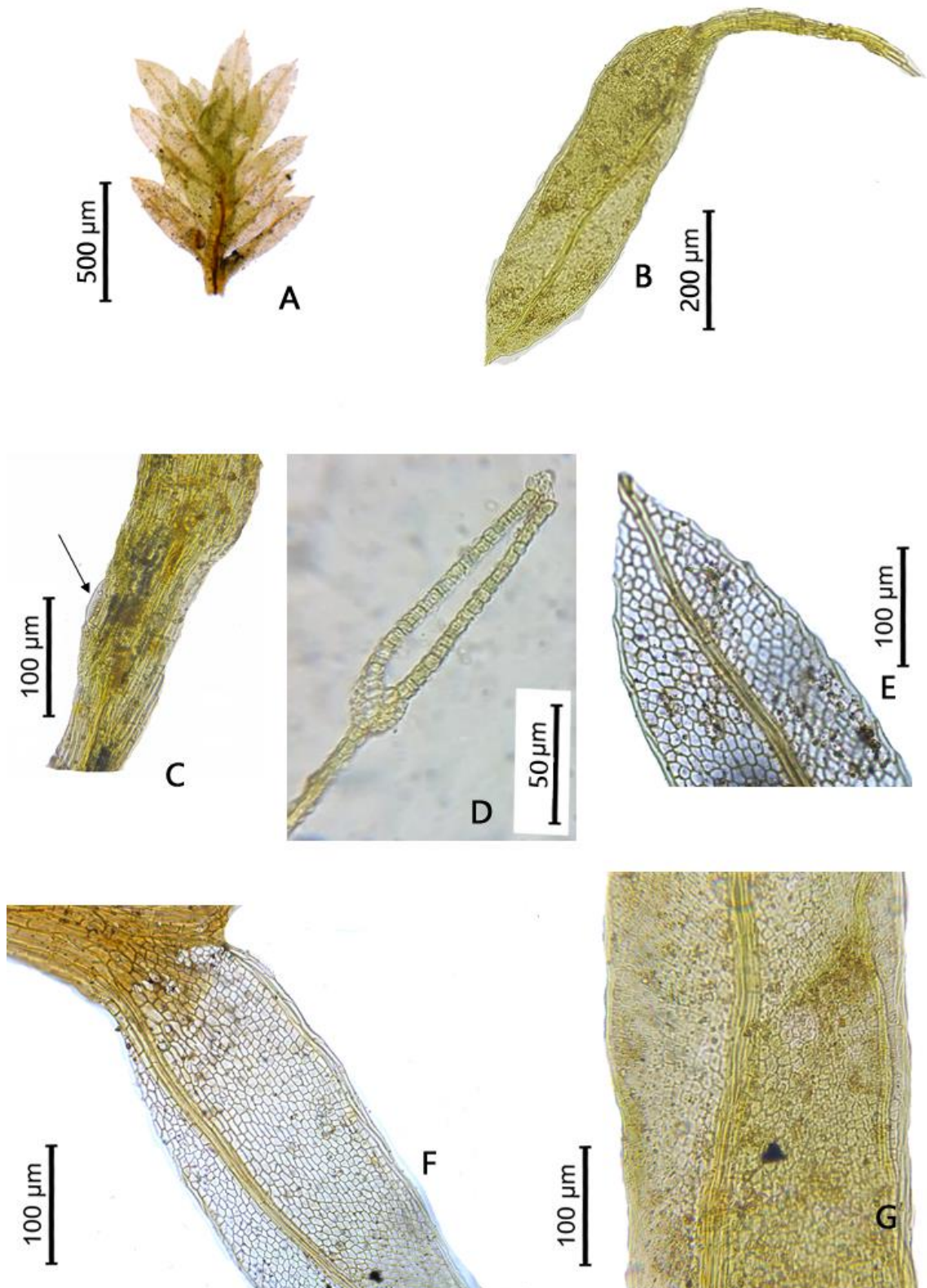


Figure 2. *Fissidens noronhensis* sp. nov.: (A) Vegetative plant, (B) oblong leaf, (C) axillary nodules, (D) cross section vaginant laminae, (E) leaf with acute apex, (F) basal part of leaf, (G) mid leaf with hexagonal cells.

CAPITULO 3

Plano de submissão: Revista Phytotaxa

Taxonomic notes on South American *Fissidens* (Fissidentaceae)

TAMARA POLIANA DE OLIVEIRA TEIXEIRA ^(1,4), CRISTIELLY DE OLIVEIRA SILVA MACHADO ⁽¹⁾, ALLAN LAID ALKIMIN FARIA ⁽¹⁾, DENILSON PERALTA ⁽²⁾, JUÇARA BORDIN ⁽³⁾ & MICHELINE CARVALHO-SILVA ⁽¹⁾

¹ *Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil*

² *Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade Litoral Norte -Osório, Rua Machado de Assis, 95520-000, Osório, RS, Brazil*

³ *Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brazil*

⁴ *Author for correspondence (marahadassa@hotmail.com)*

ABSTRACT

Three contributions for the taxonomy of *Fissidens* are provided here: *Fissidens trinidadensis* is validated and two varieties of *Fissidens acacioides* are synonymized. The name *Fissidens trinidadensis* was formerly used without a valid description and herewith we describe it as an endemic new species to Trindade Island. We provide a complete description, illustration and comparison with closed related species.

Key words: *Fissidens acacioides*, *Fissidens trinidadensis*, new species, synonymy

Introduction

Fissidentaceae Schimper (1856:96) are acrocarpous mosses comprising a single genus, *Fissidens* Hedwig (1801:152) that includes c. 440 species worldwide (Crosby et al., 2000), with 66 species recorded in Brazil (Bordin 2022, Teixeira *et al.* 2022). Although the family is well delimited, species distinction is considered difficult (Iwatsuki & Suzuki 1982) as the morphology of the species is very plastic (Pursell, 2007, Bordin & Yano 2013) with variability in size, leaf morphology and cell ornamentation cells, among other features.

Teixeira *et al.* (2022) studied *Fissidens* in the Brazilian Oceanic Islands using molecular and morphological data comprising 37 representatives of the genus with plastid gene data (*trnG* and *rps4*), recovering and a clade named “B”. The name *Fissidens trinidadensis* was cited in this clade, however it lacked a proper description thus has not been validly published according to the International Code of Plant and Fungi Names, article 32 (Turland *et al.* 2018).

Faria *et al.* (2012) recorded two species in Trindade Island morphologically determined as *F. zollingeri* Montagne (1845:114) and *F. hornschurchii* Montagne (1840:342). However, Teixeira et al. (2022) using molecular tools confirmed only *F. hornschurchii* and cited another species (*Fissidens* sp.). *Fissidens* sp. refers to a species different according to the molecular and morphological data presented and was cited in “Clade B” with the name *Fissidens trinidadensis*. In this way we are providing a formal description to validate this name here.

Another adjustment needed after the molecular study regards the heterotypic varieties of *Fissidens acacioides* Schrader (1803:197). The name *F. acacioides* was placed in the synonymy of *F. osmundioides* Hedwig (1801:7-11) by Turner in 1804

(TURNER 1804), however Pursell (1999) reestablished *F. acacioides* at species level and created two new combinations: *F. acacioides* var. *immersus* (Mitt.) Pursell (1999:175) and *F. acacioides* var. *brevicostatus* (Pursell, Brugg.-Nann. & Allen) Pursell (1999:175). *Fissidens acacioides* belongs the subgenus *Fissidens*, section *Fissidens* (Pursell 2007) which encompasses species with few stable characters and considerable variability, consequently difficult to identify (Bruggeman-Nannenga 1973, Pursell 2007, Bordin 2011).

Pursell *et al.* (1988) and Pursell (2007) pointed out the short costa as the only characteristic that separates the *F. acacioides* var. *brevicostatus* from the other varieties, while they split out the *F. acacioides* var. *acacioides* from *F. acacioides* var. *immersus* using the leaf shape and exerted capsule in *F. acacioides* var. *acacioides* vs. immersed in *F. acacioides* var. *immersus*. the identification of specimens without sporophytes is difficult, restricting the determination only to the variable leaf shape.

As part of her doctoral thesis, Bordin (2011) carried out a morphometric study of the species of the subgenus *Fissidens*, section *Fissidens*. The results showed that the *F. acacioides* varieties (*F. acacioides* var. *acacioides*, *F. acacioides* var. *immersus*; *F. acacioides* var. *brevicostatus*) formed a separate group from the other taxa by the absence of limbidium, however, the measurements did not segregate the varieties. Bordin (2011) also studied the type materials of these varieties and did not find features for the separation of varieties, and emphasized the use of molecular tools to clarify these relations.

Therefore, using morphometric and morphological results from Bordin (2011) and our molecular data we are indicating their synonymization.

Material and methods

Morphological studies were based on the analysis of 80 specimens from 8 herbaria (H-BR, HUCS, MBM, PACA, SP, ICN and ALCB, UB) acronyms according to Thiers, continuously updated). To confirm the identity of the specimens, the samples were mounted with Hoyer (Anderson 1954) semi-permanent slides and observed in stereoscopic microscope and optical microscope, species identification was carried out by consulting specific literature.

Our molecular study used chloroplast markers (*rps4* and *trnG*). The samples (table 1) were subjected to extraction and amplification (Suzuki *et al.* 2018, Teixeira *et al.* 2022, Werner *et al.* 2009). The sequencing was done by MACROGEN INC. (South Korea).

Genetic distance analyses were performed using the software PAUP Version 4.0a169 (Swofford 2000).

Taxonomic treatment

Fissidens trinidadensis Teixeira, Bordin, Alkimim-Faria & M. Carv.-Silva Type: Brazil. Trindade Island: Ilha da Trindade, leito do córrego e ponto do Noroeste da ilha, (Lat:-20.509167 long:-29.337222 WGS84), 332 m alt. 28.II.2011, A.L.A. Faria 420 (holotype UB; isotype SP) (Figure 1).

Diagnosis: The species is recognized by its large leaves, quadratic and isodiametric cells and limbidium, in the vaginant laminae, 4 cells wide at the base. The species was previously treated as *F. zollingeri* for presents leaves palmately arranged, cells hexagonal and axillary hyaline nodules. However, in the analyzed material could not observed long-retangular and pellucids cells in the median region of vaginant laminae as occurs in *F. zollingeri*.

Etimology: the specific epithet *trinidadensis* refers to its distribution in Trindade Island.

Plants usually light green to brown. Stems monomorphic, unbranched and branched, very variable in length, 1.5–2.5x0.7–1.3mm; rhizoids, basal and axillary, smooth, reddish, axillary hyaline nodules present. Leaves crispate when dry, usually loosely imbricate, often palmately arranged, as many as 5 pairs, oblong, acute, ca. 1.6x0.28mm, margin entire, serrulate at apex, cells isodiametric quadratic, limbate on all lamina, limbidium cell uni-and bistratose; costa percurrent, bryoides type; vaginant laminae $\pm \frac{1}{2}$ leaf length, acute, unequal, lamina cells rectangular, limbidium in the vaginant laminae 4 cells at base. Perichaetia terminal. Sporophyte not observed.

Although the species shares some characters with *F. zollingeri*, *F. trinidadensis* forms a distinct and completely separate clade (Clade B) from *F. zollingeri*, with 16 mutations for the rps4 marker, 11 transitions and 5 transversions (Teixeira *et al.* 2022). The species is recognized by its large leaves, quadratic and isodiametric cells and limbidium in the vaginant laminae 4 cells wide at base. On the island the species was previously treated as *F. zollingeri*, presenting palmately arranged leaves, hexagonal cells and axillary hyaline nodules as described by Bordin & Yano (2013) and Pursell (2007). However, the analyzed

material from Trindade Island lacks the long rectangular and pellucid cells in the median region of vaginant laminae found in *F. zollingeri*. Although known only from the type material, there is no doubt regarding the morphological and molecular differences to support the description of this species.

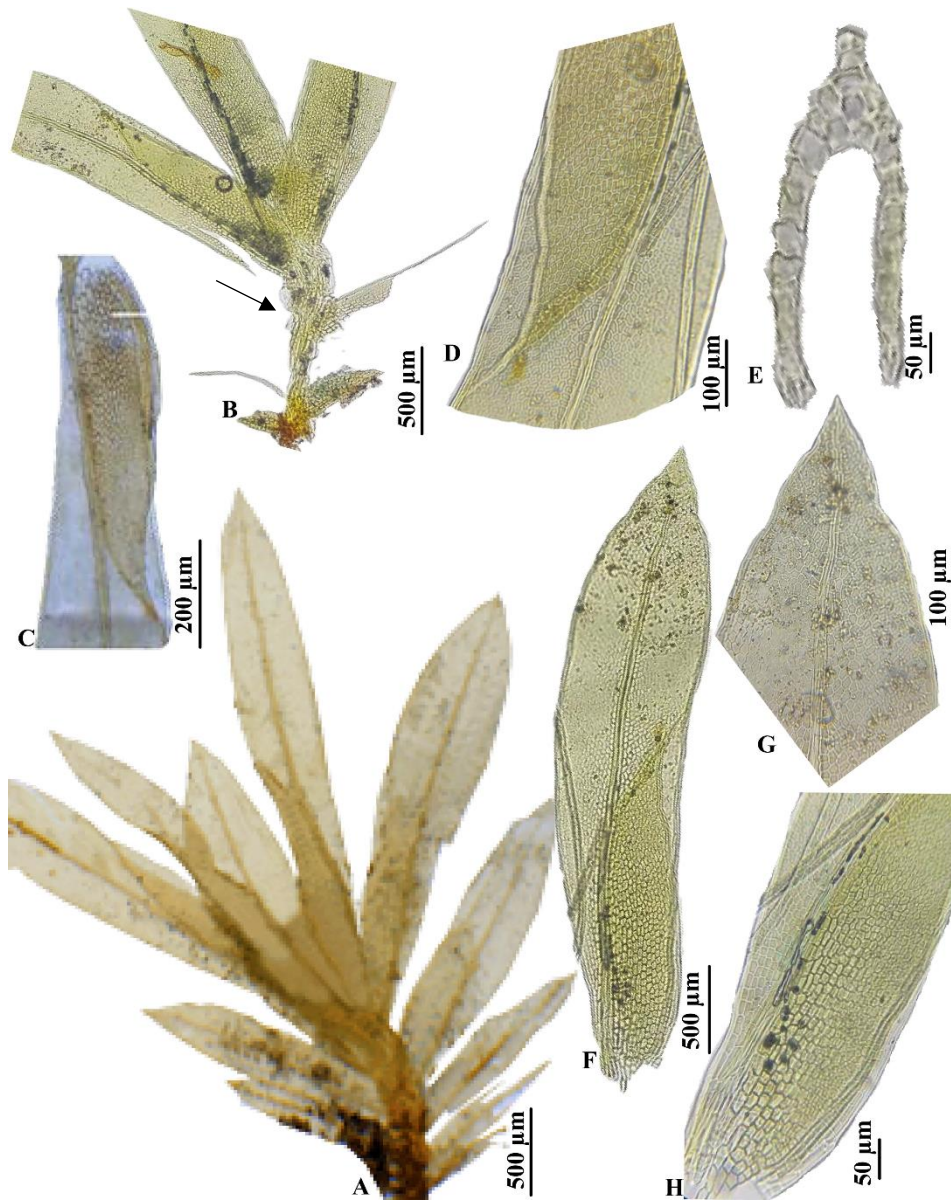


FIGURE 1. *Fissidens trinidadensis* sp. nov.: (A) vegetative plant, (B) axillary nodules, (C) mid leaf, (D) vaginant laminae (E) cross section vaginant laminae, (F) leaf (G) leaf apex, (H) basal part of leaf.

Fissidens acacioides Schrad, J. Bot. (Schrad.) 1:197. 1803, Type. Patagonia (Lectotype OXF! designated by Pursell, 1999a)

=*Fissidens acacioides* var. *brevicostatus* (Pursell, Brugg.- Nann. & B.H. Allen) Pursell, Bryobrothera 5: 175.1999. *Fissidens stissotheca* var. *brevicostatus* Pursell, Brugg.-Nann. & B. H. Allen, Bryologist 91:213.1988. — Type. Brazil. Rio Grande do Sul: Herval, 600m. II-1913, *Herter s.n.* (Holotype, H-BR!), *syn. nov.*

=*Fissidens acacioides* var. *immersus* (Mitt.) Pursell, Bryobrothera 5:175.1999. *Fissidens immersus* Mitt., J. Linn. Soc., Bot: 12:584.1869. — Type: Brazil, *Burchell 7737-2J* (Holotype, NY), *syn. nov.*

F. acacioides presents a small difference in the plant size among the varieties, however, Pursell (1988, 2007) differentiates *F. acacioides* var. *brevicostatus* from the others by presenting a smaller coast and *F. acacioides* var. *acacioides* from *F. acacioides* var. *immersus* by the shape of the leaves and the emerged or immersed capsule.

F. acacioides is distinguished by its bryoides costa, large leaves, margin elimbate, laminal cell distinct and eguttulate. The molecular data (Teixeira *et al.* 2022) allows the recognition of a single species, however it does not allow to varietal distinction, with a distance of 0 among them, while the difference of *F. acacioides* and the closer species *F. zollingeri* is 0.03800 (Table 1).

The *Fissidens* var. *brevicostatus* was not included in the molecular analysis because the only citation of the taxon is the type material (Brazil, Rio Grande do Sul, *Herter s.n.*). However, this type material, later placed in the herbarium H (hb Brotherus), was analyzed by Bordin (2011) and Bordin & Yano (2013) and the observations served as a basis for the present synonymization.

Phylogenetic evidence

A tree with complex species of the *Fissidens* subgenus *Fissidens* was built with a total of 12 taxa amplified with the *rps4* and *trnG* markers (Fig. 2), and 1159 pair bases, despite having few samples of each taxon and with some poorly supported clades, it is possible to verify that *F. acacioides* var. *acacioides* and *F. acacioides* var. *immersus* (Fig. 2, clade I) are retrieved together with high support (100/100/1), including genetic distance as 0. Thus, allowing the synonymization of these varieties.

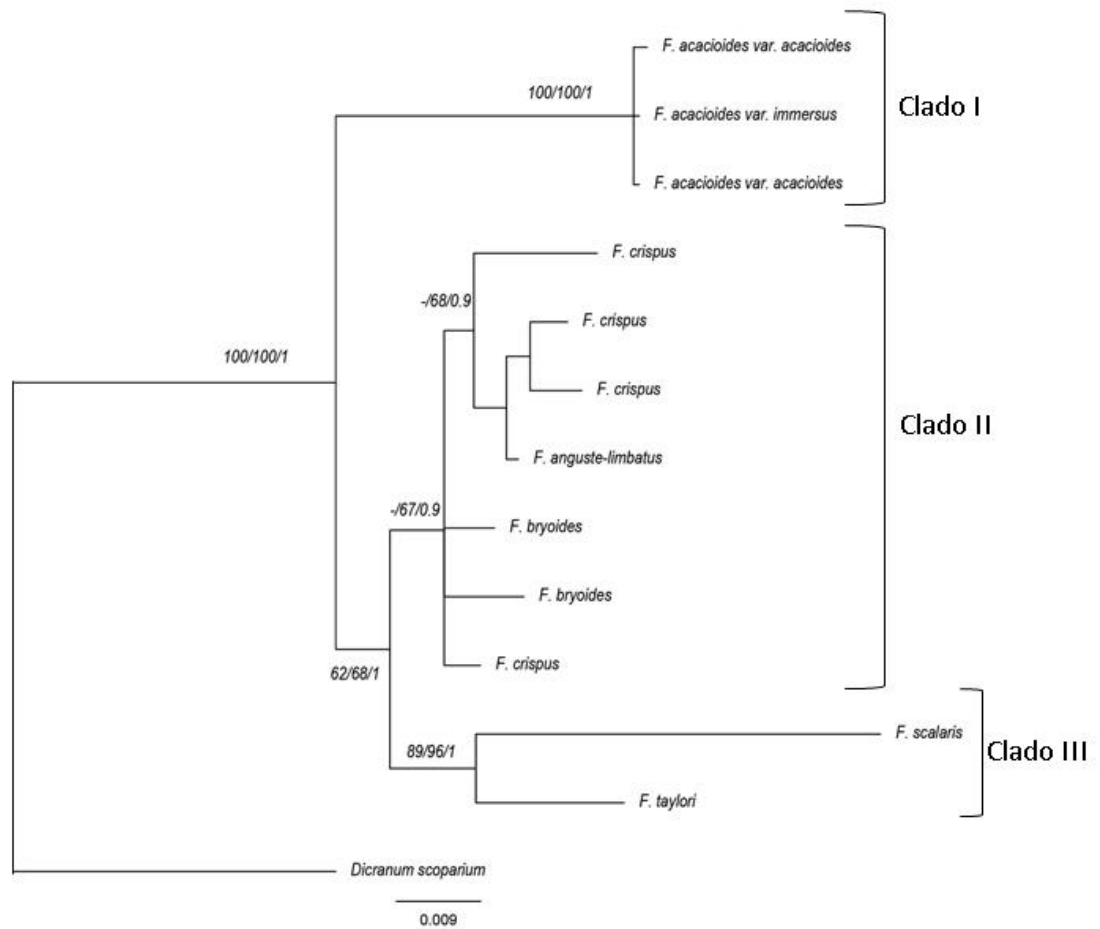


FIGURE 2. Phylogenetic tree based on analyzes with the chloroplast markers *rps4* and *trnG*, the figures close to the branches correspond to the values obtained by Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference

The results referring to clade I allowed the synonymization of *Fissidens acacioides*. The morphological data show small variations in size between the varieties, corroborating the data obtained by Bordin & Yano (2013), however, the molecular data are blunt that it is about of the same taxon, with distance 0 between them.

Table 1. Genetic distance between *Fissidens acacioides*.

	1	2	3
1. <i>F. zollingeri</i>	-		
2. <i>F. acacioides</i> var. <i>acacioides</i>	0.03800	-	
3. <i>F. acacioides</i> var. <i>immersus</i>	0.03800	0,00000	-

Acknowledgments

We thank the curators of the herbaria for the loan of specimens under their care. The first author is grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grant/Award Number: 001.

References

- Anderson, L.E. (1954). Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryologists. *The Bryologist* 57: 242-244.
- Bordin, J. & Yano, O. (2011). Fissidentaceae (Bryophyta) do Brasil. Tese de Doutorado- Instituto de Botânica da Secretaria de estado do meio ambiente, São Paulo, 2011. 350 p.
- Bordin, J. & Yano O. (2013). Fissidentaceae (Bryophyta) do Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica* 22: 1-72.
- Bordin J. (2022). Fissidentaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB96294>>. Acesso em: 19 jun. 2022
- Bruggeman-Nannenga, M.A. (1973). The section Pachylomidium (Genus Fissidens). I. The species of Tropical and Subtropical South America. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Series C: *Biological and Medical Sciences* 76(2): 141–148.

- Crosby, M.R., Magill R.E., Allen B. & He S. (2000). A Checklist of the Mosses. Missouri Botanical Garden, St. Louis. Available at <http://www.mobot.org/MOBOT/tropicos/most/checklist.shtml>
- Faria, A. L., Carvalho-Silva, M., Costa, D. P. & Câmara, P.E.A.S. (2012). — The bryophytes of Trindade Island, South Atlantic, Brazil. *Acta botanica Brasilica* 26: 783-793. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062012000400008>
- Hedwig, J. (1801). *Species Muscorum Frondosorum*. 152.
- Iwatsuki, Z. & Suzuki, I.T. (1982). — A taxonomic revision of the Japanese species of *Fissidens* (Musci). *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 51: 329–508.
- Montagne, J.P.F.C. (1840). *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 2, 14:342.
- Montagne, J.P.F.C. (1845). *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 3, 4:114.
- Pursell, R.A. (1999). *Bryobrothera* 5:175.
- Pursell, R. A. (2007). Fissidentaceae. *Flora Neotropica, Monograph* 101: 1–278.
- Schrader, H.A. (1803). *Journal für die Botanik* 1801(1):197.
- Schimper, W.P. (1856). *Corollarium Bryologiae Europaeae* 96.
- Suzuki, T., Inoue, Y. & Tsubota, H. (2018). Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 190–202.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Teixeira, T.P.O, Faria, A.L.A, Bordin, J. & Carvalho-Silva, M. (2022). Phylogeny and morphology of Fissidentaceae Schimp. in the South Atlantic Islands and description of a new species. *Cryptogamie, Bryologie* 43 (1): 1-8. <https://doi.org/10.5252/cryptogamie-bryologie2022v43a1>. <http://cryptogamie.com/bryologie/43/1>
- Turland, N.J., Wiersema, J.H., Barrie, F.R., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Kusber, W.H., Li, D.Z., Marhold, K., May, T.W., McNeill, J., Monroe, A.M., Prado, J., Price, M.J. & Smith, G.F. (2018). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China. *Regnum Vegetabile* 159:1–254

Turner D. (1804). *Muscologiae Hibernicae spicilegium*. Yarmouth

Werner, O., Ros, R. M. & Guerra, J. (2002). Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Bryology* 24, 127–131.

List of samples used in phylogenetic analysis

SPECIES	LOCALITY	VOUCHER
<i>F. acacioides</i>	Nova Esperança, RS	Bordin, 3946 (UB)
<i>F. acacioides</i>	Nova Esperança, RS	Bordin, 3949 (UB)
<i>F. acacioides</i>	São Vicente do Sul, RS	Bordin, 3864 (UB)
<i>F. anguste-limbatus</i>	Cambará do Sul, RS	Bordin, 3836 (UB)
<i>F. bryoides</i>	Campos do Jordão, SP	Peralta 12470 (SP)
<i>F. bryoides</i>	USA	Shevock 32994 (UB)
<i>F. crispus</i>	Brasília, DF	Gama 563 (UB)
<i>F. crispus</i>	Santa Tereza, RS	Bordin 3779 (UB)
<i>F. crispus</i>	Brasília, DF	Gama 560 (UB)
<i>F. crispus</i>	Rio Grande do Sul	Bordin 3887 (UB)
<i>F. scalaris</i>	Nova Esperança, RS	Bordin, 3951
<i>F. taylori</i>	Minas Gerais	Peralta 11929 (SP)

