



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Defesa de Tese de Doutorado

**DNA – Barcode de *Metzgeria Raddi* (Marchantiophyta) do Brasil**

Tamara Silva Dantas

Brasília - DF

Outubro 2019

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Tamara Silva Dantas

DNA – Barcode de *Metzgeria* Raddi (Marchantiophyta) do Brasil

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara

Brasília - DF  
Outubro 2019

**Tamara Silva Dantas**

**DNA – Barcode de *Metzgeria Raddi* (Marchantiophyta) do Brasil**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara  
Presidente da banca – UnB

Prof. Dr. Marcelo Fragomeni Simon  
Membro da banca – UnB

Prof. Dr. Luciano Coêlho Milhomens Fonsêca  
Membro da banca – UCB

Prof. Dra. Christina Cleo Vinson Willians  
Membro da banca – UnB

Prof. Dra. Maria das Graças Machado de Souza  
Membro da banca – UnB

## **Agradecimentos**

À Deus.

À minha mãe, Tânia, pelo amor, dedicação, paciência e apoio incondicionais; por acreditar em mim em todos os momentos, mesmo que, em muitos deles, fosse a única que acreditasse. Todas as minhas conquistas eu dedico à você.

Ao meu irmão Rafael, meu pai Marcos, familiares e amigos pelo incentivo e apoio constantes.

Ao Ramiro (*in memoriam*), pelo amor, incentivo e apoio com os estudos.

Ao Filipe, pelo carinho e paciência nessa reta final do doutorado.

A todos os amigos de pós-graduação e colegas do Departamento de Botânica e do Laboratório de Criptógamas, em especial a Júlia, Carla, Ana Gabriela, Osvanda, André (Babalaô), Bárbara, Amanda Marinho, Amanda Leal, Allan, Marcos, Abel, Tamara Poliana, Maria Rosa, Eduardo, Diego (Pikachu), Jair, Joice, Aline, Sabrina; pela amizade, conhecimentos e momentos compartilhados.

À Júlia, pela confiança, ajuda e carinho durante toda essa jornada; além de colega de profissão, é uma irmã que eu sempre pude e posso contar em todas as situações.

À professora Graça, pelos ensinamentos e contribuições.

Ao professor Paulo, meu orientador, pelo carinho, oportunidades e confiança para executar o doutorado.

À professora Micheline, pela amizade, paciência e ajuda durante a minha formação, tanto profissional como pessoal.

Ao Michael Stech, pela valiosos ensinamentos e recepção em Leiden.

À Denise Costa e ao Denilson Peralta, pelo aprendizado e contribuição durante o doutorado.

Às professoras Cássia e Sueli, que na figura de coordenadoras, foram sempre presentes e solícitas nos momentos necessários.

Ao *Naturalis Biodiversity Center*, pela recepção e condições de trabalho.

Aos curadores dos herbários RB e SP, pelos empréstimos disponibilizados.

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa PVE e pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.

À FAPDF, pelo auxílio para realização da visita técnica.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela viabilização e pelo apoio para realização deste trabalho.

## **Sumário**

Organização Geral da Tese	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução Geral	14
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>18</b>
Abstract	20
1 Introduction	21
2 Molecular phylogenetic studies of bryophytes	22
3 Molecular phylogenetic studies of Brazilian bryophytes	23
4 DNA barcoding	26
5 DNA Barcoding of bryophytes in Brazil	29
Conclusion	35
6 References	36
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>45</b>
1 Introdução	46
2 Objetivos	49
2.1 Objetivo geral	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 Material e métodos	50
3.1 Obtenção de material	50
3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	51
3.3 Análise de dados	54
3.4 Caracteres Morfológicos	56
4 Resultados e Discussão	57
4.1 Características dos marcadores moleculares, sucesso de amplificação e sequenciamento	57
4.2 Análises filogenéticas e de Neighbor Joining	64
4.3 Sucesso de discriminação das espécies	74
4.4 Distâncias genéticas e “barcode gap”	78
4.5 Variações genéticas e localidades geográficas	82
5 Conclusão	85
6 Referências Bibliográficas	86
7 Anexos	93
Conclusão Geral	98
Plano de Publicação da Tese	98
Bibliografia Geral	99

## **Organização Geral da Tese**

O manuscrito desta defesa de tese de Doutorado está organizado em: resumo, abstract, introdução geral, dois capítulos propostos, conclusão geral, plano de publicação e bibliografia geral.

São apresentados dois capítulos como resultado desta tese de Doutorado. O primeiro capítulo é uma revisão dos trabalhos envolvendo filogenias realizadas no Brasil e/ou por pesquisadores brasileiros e um panorama dos trabalhos que estão em andamento com DNA barcode de briófitas no Brasil. O texto aqui apresentado já está publicado na revista *Brazilian Journal of Botany* (Qualis B2).

O capítulo 2 está estruturado em introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusão. Este capítulo trata das espécies de *Metzgeria* do Brasil a partir de dados moleculares agregados à caracteres morfológicos e o uso dos marcadores moleculares utilizados neste estudo como uma ferramenta no auxílio para identificação das espécies do gênero.

## **Resumo**

As briófitas, *latu sensu*, são o segundo maior grupo de plantas terrestres em número de espécies, ficando atrás apenas das angiospermas e são compostas por três linhas evolutivas: Anthocerotophyta, Marchantiophyta e Bryophyta. Esses grupos são altamente diversos e podem ocorrer em uma ampla variedade de ambientes. A identificação e delimitação de espécies de briófitas são tarefas complicadas porque são plantas muito pequenas, com caracteres morfológicos limitados e muitas vezes variáveis. As hepáticas (Marchantiophyta) possuem 5.200 espécies, das quais 664 ocorrem no Brasil. Dentro deste grupo está o gênero *Metzgeria*, pertencente à família Metzgeriaceae. O gênero apresenta espécies com grande variedade morfológica o que dificulta sua identificação. No Brasil, são registradas 27 espécies de *Metzgeria*, das quais seis são endêmicas. As ferramentas moleculares para auxiliar na identificação de organismos têm sido cada vez mais utilizadas e facilitaram a circunscrição de espécies. Portanto, foi realizada uma revisão dos estudos moleculares realizados no Brasil e o uso de DNA como barcode para briófitas. Além disso, três regiões do DNA (*trnLF*, *trnG* e ITS) foram avaliadas como uma ferramenta de DNA barcode para *Metzgeria*. Os resultados indicaram que esses três marcadores moleculares podem ser eficientes na discriminação de espécies desse grupo, sendo potenciais DNA barcode para este grupo e, podendo também, ser testados em outros grupos de plantas.

## **Palavras-chave**

Briófitas, discriminação de espécies, marcadores moleculares, Metzgeriaceae

## **Abstract**

The bryophytes, *latu sensu*, are the second largest group of terrestrial plants in number of species, being behind only the angiosperms and are composed of three evolutionary lines: Anthocerotophyta, Marchantiophyta and Bryophyta. These groups are highly diverse and can occur in a wide variety of environments. The identification and delimitation of bryophyte species are complicated tasks because they are very small plants with limited, and often variable, morphological characters. The liverworts (Marchantiophyta) have 5, 200 species, of which 664 occur in Brazil. Within this group is the genus *Metzgeria*, belonging to the Metzgeriaceae family. The genus presents species with a wide morphological variety, making identification difficult. In Brazil, 27 species of *Metzgeria* are recorded, six of which are endemic. Molecular tools to aid the identification of organisms have been increasingly used and facilitated the circumscription of species. Therefore, a review of the molecular studies carried out in Brazil and the use of DNA as barcode for bryophytes was performed. In addition, three regions of DNA (*trnLF*, *trnG* and ITS) were evaluated as a DNA barcode tool for *Metzgeria*. The results indicated that these three molecular markers can be efficient in discriminating species of this group. Being potential markers of DNA barcode of this group being able to be tested in other groups of plants as well.

## **Keywords**

Bryophytes, Metzgeriaceae, molecular markers, species discrimination

## Introdução Geral

As briófitas, *latu sensu*, formam o segundo maior grupo de plantas terrestres em número de espécies, estando atrás apenas das angiospermas (Buck & Goffinet 2000). Composta por três linhagens evolutivas: Anthocerotophyta (antóceros), Marchantiophyta (hepáticas) e Bryophyta (musgos) (Qiu et al. 2006), é um grupo altamente diverso e distribuído em todos os ecossistemas terrestres, desde as regiões polares até os trópicos (Frey & Stech 2009) e podem ocorrer nos mais diversos ambientes, desde o nível do mar até elevadas altitudes (Costa et al. 2010). Bryophyta possui, a nível mundial, cerca de 13.000 espécies, Marchantiophyta cerca de 5.000 espécies e Anthocerotophyta aproximadamente 150 espécies (Goffinet & Shaw 2009).

Briófitas são importantes bioindicadoras de qualidade do ar (Fernández & Serrano 2009) e já são utilizadas para estudos de mudanças climáticas globais (Tuba et al. 2011). É relatado que briófitas possuem potencial medicinal como: anticancerígeno e anti-inflamatório, produção de antibióticos e antivirais e cicatrização de queimaduras e hematomas (Fernández & Serrano 2009).

A identificação de espécies de briófitas é muitas vezes dificultada devido ao número limitado de caracteres morfológicos (Vanderpoorten & Goffinet 2006), sendo muitos destes caracteres dificilmente visíveis (Hassel et al. 2013). Além disso, são plantas com plasticidade morfológica considerável, provavelmente como resposta à fatores ambientais (Buryová & Shaw 2005; Hassel et al. 2005; Vanderpoorten & Goffinet 2006).

A circunscrição de espécie de briófitas e o significado da variabilidade morfológica ainda são pouco compreendidos, principalmente, em complexos de espécies (e.g. Stech et al. 2013). A incongruência entre as circunscrições de dados morfológicos e moleculares de espécies vem sendo relatadas (Heinrichs et al. 2009, Vanderpoorten & Shaw 2010) e espécies polifiléticas têm sido cada vez mais encontradas entre musgos (Vanderpoorten & Goffinet

2006; e. g. Câmara & Buck 2012). Muitas vezes, a não distinção de espécies de briófitas tem acarretado problemas em estudos ecológicos e de biodiversidade (Stech et al. 2013), pois espécies são colocadas numa única categoria, como apenas em um gênero ou em espécies de fácil identificação (e.g. Veneklaas et al. 1990, Nadkarni & Matelson 1991, Epstein et al. 2004, Hölscher et al. 2004, Hudson & Henry 2010). A não identificação correta das briófitas, utilizadas em qualquer área de estudo, pode acarretar em equívocos nos resultados, portanto, a identificação correta destas plantas torna-se imprescindível.

DNA barcode foi defendida como uma ferramenta de grande importância para identificação de espécies (e.g. Hebert et al. 2003). A ideia original era identificar todos os organismos com base em sequências de uma região de DNA única, curta e de fácil amplificação. Além disso, não deveria haver sobreposição entre variação intraespecífica e interespecífica (Meyer & Paulay 2005).

Embora para grupos de animais exista um barcode único (COXI), em plantas terrestres é necessário o uso de mais de um ou dois marcadores centrais, e muitas vezes informações adicionais de outras regiões do DNA (e.g. Pennisi 2007, Fazekas et al. 2009, Hollingsworth et al. 2011). As combinações de marcadores incluem as regiões plastidiais de DNA *rbcL* e *matK* como marcadores centrais para plantas terrestres (CBOL Plant Working Group 2009) ou o espaçador *psbA-trnH* juntamente com a região nuclear ribossomal ITS para angiospermas (Kress et al. 2005).

Em briófitas, especialmente em musgos, os marcadores plastidiais tendem a ser curtos, com pouca resolução (espaçador *psbA-trnH*), e a sua capacidade de discriminação ao nível de espécie ainda é debatido (*rbcL*), ou ainda são necessários esforços quanto à configuração dos *primers* e estratégias de amplificação (*trnK / matK*) (e.g. Quandt & Stech 2005, Stech & Frey 2008, Liu et al. 2010, Stech & Quandt 2010, Bell et al. 2012, Hassel et al. 2013). No entanto, pouco se sabe sobre esses marcadores nas hepáticas.

Estudos recentes têm avaliado marcadores filogenéticos amplamente utilizados do genoma plastidial e/ou da região nuclear ribossomal ITS para o DNA barcode de briófitas (e.g. Liu et al. 2010, Yao et al. 2010, Bell et al. 2012, Cräutlein et al. 2011, Liu et al. 2011, Hassel et al. 2013, Stech et al. 2013, Lang et al. 2014). Apesar dos esforços, nenhum consenso foi alcançado sobre a combinação de marcadores ideal para o barcode de briófitas.

Dentro dessa perspectiva, o Naturalis Biodiversity Center em colaboração com o Dutch Bryological and Lichenological Working Group (BLWG) está trabalhando com DNA barcode de toda a brioflora holandesa (Stech & Sparrius 2011). O projeto faz parte do Naturalis DNA Barcoding Program em conjunto com Netherlands Barcode of Life (NBOL) National Node of the International Barcode of Life Project (iBOL). Seguindo este projeto holandês e os outros projetos de DNA barcode com briófitas em curso na Europa (Alemanha, Reino Unido), foi visto a necessidade de um projeto de DNA barcode com briófitas no Brasil, um país tropical com diversidade alta e ameaçada. Cerca de 4.000 espécies de briófitas ocorrem na região Neotropical (Pócs 1982, Gradstein et al. 2001), das quais estima-se que 1.650 espécies ocorram no Brasil (Gradstein & Costa 2003, Costa et al. 2011), o que representa cerca de 9-11% da brioflora global e 41% da brioflora neotropical.

Portanto, foi aprovado pelo edital 71/2013 do MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs o projeto DNA - Barcoding of Brazilian bryophytes – A case study to improve the identification of tropical bryophyte species, onde estão sendo estudados três gêneros de briófitas, sendo dois musgos e uma hepática. Os gêneros escolhidos como alvo deste projeto são bem distribuídos pelo Brasil, possuem espécies endêmicas no país, são importantes ecologicamente em diversos ecossistemas brasileiros e são encontrados materiais disponíveis em coleções de herbários e amostras oriundas de coletas de campo recentes. Dos gêneros alvo do projeto foi escolhido um gênero de hepática: *Metzgeria* Raddi (Metzgeriaceae) para ser estudado nesta tese de doutorado.

Este é um projeto piloto com o objetivo de testar a capacidade de marcadores moleculares, previamente selecionados, em discriminar espécies do gênero estudado. Avaliar se esta ferramenta molecular (DNA barcode) pode auxiliar na identificação de espécies de *Meztgeria* onde, geralmente, são encontradas dificuldades na identificação com a utilização apenas de caracteres morfológicos.

## **CAPÍTULO 1**

### **Bryophyte phylogeny and DNA Barcoding: tools for assessing Brazilian diversity**

Manuscrito publicado pelo periódico Brazilian Journal of Botany (B2)

Dantas TS, Valente DV, Carvalho-Silva M, Câmara PEAS (2018) Bryophyte phylogeny and DNA Barcoding: tools for assessing Brazilian diversity. Brazilian Journal of Botany. DOI:

10.1007/s40415-018-0473-9

**Bryophyte phylogeny and DNA Barcoding: tools for assessing Brazilian diversity**

Tamara Silva Dantas<sup>1</sup><sup>3</sup>; Daiane Valente Valente<sup>1</sup>; Micheline Carvalho-Silva<sup>2</sup>; Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Depto. de Botânica, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus Unaí, Av. Ver. João Narciso, 1380, Cachoeira, 38610-000, Unaí - MG, Brazil.

<sup>3</sup> Author for correspondence (tamara.sdantas@gmail.com; +5561984843134)

## **Abstract**

The identification and delimitation of bryophyte species are complicated tasks because they are very small plants with limited, and often variable, morphological characters. Molecular data have been useful for clarifying the evolutionary relationships among taxa and the diversity of species. The first classification of mosses using DNA was proposed in 2000, while in Brazil the first phylogenetic study of bryophytes using DNA was published in 2006. Other phylogenetic works involving molecular data have since been published for Dicranaceae, Leucobryaceae, Pylaisiadelphaceae and Sematophyllaceae. Another molecular method, DNA barcoding, has recently begun to be used with Brazilian bryophytes. DNA barcoding consists of identifying a short sequence of DNA from a standardized region of the genome that aids in species identification. Many regions of chloroplast and nuclear DNA are being tested as DNA barcode markers for the identification of various groups of plants. The selection of such markers for bryophytes has been controversial and is yet to be investigated for Brazilian taxa. The project “DNA - Barcoding of Brazilian Bryophytes - A case study to improve the identification of tropical bryophyte species” started in 2014 with an initial investigation of four bryophyte genera, including three mosses and one liverwort. Studies that include molecular tools are important because they contribute to biodiversity assessment, forensic analyses and studies of life history and ecology, among other areas of knowledge.

## **Keywords**

Biodiversity, bryophytes, molecular markers, species circumscription, systematics.

## **1 Introduction**

Bryophytes are the second largest group of land plants (Goffinet et al. 2009) with about 4,000 species occurring in the Neotropics (Pócs 1982; Gradstein et al. 2001). Of these, an estimated 1,567 species occur in Brazil, representing 41% of the known Neotropical bryoflora (Flora do Brasil 2020), of which 337 are endemic. The correct identification of bryophyte species is not an easy task and is often hampered by the limited number of morphological characters they possess (Vanderpoorten and Goffinet 2006), few of which are easily visible due to their small size (Hassel et al. 2013). In addition, these characters often exhibit considerable morphological plasticity in response to environmental factors (Buryová and Shaw 2005; Hassel et al. 2005; Vanderpoorten and Goffinet 2006).

Species circumscription and the significance of morphological variation are still poorly understood for bryophytes, especially within species complexes (eg. Stech et al. 2013). Incongruence between species circumscriptions using morphological and molecular data have been reported (Heinrichs et al. 2009; Vanderpoorten and Shaw 2010), with polyphyletic species being increasingly recognized among mosses, raising serious reservations about current species definitions (Vanderpoorten and Goffinet 2006; Câmara and Buck 2012).

The correct identification of bryophytes is essential because misidentifications can lead to misunderstandings in ecological, conservation and biodiversity studies (Stech et al. 2013). Problems related to the distinction of bryophyte species often result in placing them in a single taxon, such as a single genus or species that is easy identifiable (eg Veneklaas et al. 1990; Nadkarni and Matelson 1991; Epstein et al. 2004; Hölscher et al. 2004; Hudson and Henry 2010). Therefore, the use of tools that facilitate species identification and an appreciation of the significance of the morphological variability of these plants is very important for taxonomic studies and other areas of knowledge. In this context, the use of

molecular tools in plant systematics has resulted in entirely new visions of the evolutionary relationships among taxa and the diversity of species.

In this paper we present a review of phylogenetic studies involving bryophytes that occur in Brazil, with a focus on research by Brazilian botanists. We also present a compilation of information regarding DNA barcoding of bryophytes and discuss the current status of such studies in Brazil.

## **2 Molecular phylogenetic studies of bryophytes**

Phylogenetic studies of plants have resulted in a revolution in their classification, such as the flowering plant classifications APG I, II, III and IV (APG 1998, APG II 2003, APG III 2009, APG IV 2016). Rapid changes in classification have also occurred with many other groups, including bryophytes, with increasing use of molecular tools. Even though bryophytes are the second largest group of land plants (Goffinet et al. 2009), molecular phylogenetic studies involving them began relatively late: for Marchantiophyta (Lewis et al. 1997); for Bryophyta (Goffinet et al. 1998, Hyvönen et al 1998, Cox and Hedderson 1999, De Luna et al. 1999, Newton and De Luna 1999, Cox et al. 2000, De Luna et al. 2000, Goffinet and Cox 2000, La Farge et al. 2000, Newton et al. 2000, Shaw et al. 2000); and for Anthocerotophyta (Stech et al. 2003).

However, changes in traditional classification systems based on morphological characteristics have tended to be very slow, and mosses are no exception. The first accepted classification for bryophytes was that of Hedwig (1801), followed by a series of additions by Schwägrichen (1816, 1823, 1824, 1826, 1827, 1830). Major changes were subsequently made by Mitten (1869) and later by Brotherus (1908), Fleischer (1923) and Brotherus (1925). Very few minor changes have occurred since (e.g. Dixon 1932, Walther 1983), until Vitt (1984)

proposed a new classification that has endured until the advent of the use of DNA data in bryophyte systematics.

Studying morphology, Buck and Goffinet (2000) described the class and families of mosses, and proposed the first classification system for mosses incorporating molecular data based on the morphological characters and phylogenetic studies available at the time. This was followed by Goffinet and Buck (2004), who analyzed most of the studies that addressed systematic hypotheses regarding mosses at the time and revised the classification of mosses. Stech and Frey (2008) inferred the phylogenetic relationships within Bryopsida using a combined analysis of non-coding plastid markers, and made taxonomic changes accordingly. Frey et al. (2009) provided a thorough treatment of global morphological and molecular diversity for part of Bryophyta, while Goffinet et al. (2009) continued studying the morphology, phylogeny, and classification of Bryophyta. Thus, in less than a decade at least three new classification systems have been proposed, which represents very rapid change relative to the few changes made in the previous 100 years.

### **3 Molecular phylogenetic studies of Brazilian bryophytes**

The molecular phylogeny of Bryophyta presented in this review is based on studies of Brazilian bryophytes by Brazilian botanists with the aim of presenting a general view of the current status in Brazil. Only a brief review of phylogenetic studies using samples from Brazil is provided for Marchantiophyta and Anthocerotophyta because work involving these two divisions in Brazil is still very scarce.

The first phylogenetic study with bryophytes published in a Brazilian journal by a Brazilian botanist with a Brazilian endemic species (*Paranapiacabaea paulista* W.R. Buck and Vital), was that of Câmara (2006a). This study represented the first attempt to investigate the affinities of this enigmatic endemic genus, yet the data published by Câmara (2006a) are

already outdated and were correctly addressed by Carvalho-Silva et al (2017). In the same year, another paper (Câmara 2006b) presented a brief review of the use of molecular data and the need for additional molecular phylogenetic studies on Brazilian bryophytes, especially for conservation purposes, but provided no new data for any species.

It would take seven more years to see another phylogenetic study involving Brazilian mosses (Câmara and Shaw 2013). However, this paper dealt with the phylogenetic reconstruction of the entire genus *Taxithelium* Mitt. including, but not restricted to or focused on, Brazilian species. The paper revealed the existence of two subgenera within *Taxithelium*, both of which occur in Brazil, and clarified the taxonomy of some problematic Brazilian taxa such as *T. concavum* (Hook.) Spruce ex J. Florsch and *T. planum* (Brid.) Mitt.

The next phylogenetic study performed in Brazil with a focus on Brazilian mosses was that of Carvalho-Silva et al. (2014), who addressed the phylogenetic position and systematics of the genus *Trachyphyllum* A. Gepp. The paper revealed the monophyly of the genus and its close association with the family Pylaisiadelphaceae, rather than Pterigynadraceae as previously accepted.

Gama et al. (2015) studied the Pantropical haplolepideous moss genus *Leucoloma*, which had six Brazilian endemic species. These authors used molecular data from the nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 region and two chloroplast regions (*rps4-trnT-trnL-trnF* and *atpB-rbcL*) together with morphological characters. The authors proposed some synonymies, leaving the genus with only four species for Brazil, only one of which is endemic.

Gama et al. (2016), investigated the genus *Campylopus* (Leucobryaceae) from the little known Brazilian island of Trindade (South Atlantic), revealing its affinities, identity and origin. This was the first time that molecular tools were used to investigate an insular bryoflora in Brazil.

Later, Carvalho-Silva et al. (2017) made a substantial contribution to the understanding of Sematophyllaceae, an especially diverse and complicated family in Brazil, which was quite under-investigated as well. This paper confirmed the monophyly of Sematophyllaceae and some of its genera, such as *Aptychopsis*, *Acroporium*, *Donnellia*, *Trichosteleum* and *Schroeterella*, and described some new genera as well (*Brittonodoxa*, *Vitalia* and *Billbuckia*). This effort helped to clarify the evolutionary significance of some morphological traits. Furthermore, the enigmatic genus *Paranapiacabaea* (first investigated by Câmara (2006a) was finally correctly combined [*Pterogoniopsis paulista* (W.R. Buck and Vital) Carv.-Silva, P.E.A.S. Câmara and W.R. Buck].

Liverwort nomenclature began with Linnaeus (1753), who subdivided them into two morphological groups. Crandall-Stotler and Stotler (2000) tested this hypothesis and recognized two classes according to morphological and phylogenetic analyses. Phylogenetic studies have since shown extensive homoplasy with many of the characters used to define genera or families (Crandall-Stotler et al. 2005), with the most recent classification of Marchantiophyta being based on the phylogeny of Crandall-Stotler et al. (2009a and b).

Although the diversity of liverworts in Brazil is high – about 663 species with 125 endemics (Flora do Brasil 2020) – phylogenetic studies have been scarce. Forrest et al. (2006) assembled a large molecular phylogeny of Marchantiophyta, with their analyses providing support for the monophyly of liverworts and for the previously resolved backbone relationships within Marchantiophyta. Heinrichs et al. (2014), Schäfer-Verwinp et al. (2014) and Bechteler et al. (2016a and b) tested the monophyly of Lejeuneaceae, and although they include some Brazilian endemic species, their focus was not on Brazilian material. Villareal et al. (2016) presented a complete generic-level phylogeny of the complex thalloid liverworts, which they used to estimate divergence times and analyze evolutionary trends. This study included some Brazilian samples, but was not focused on native Brazilian taxa.

The first molecular analyses of hornworts (Anthocerotophyta) were those of Stech et al. (2003) and Duff et al. (2004), who used the chloroplast DNA *trnL-trnF* region and the chloroplast *rbcL* region. The division Anthocerotophyta is represented by only 15 species in Brazil, of which only two are endemic (Flora do Brasil 2020). Phylogenetic research of Brazilian hornworts is just beginning, and is represented by only preliminary unpublished results on the morphology and phylogeny of *Notothylas* from the country.

#### **4 DNA barcoding**

The use of molecular tools for clearly identifying organisms has already become standard procedure. The molecular method for species identification known as DNA barcoding consists of identifying a short DNA sequence from a standardized region of the genome (Herbert et al. 2003) that can be used to identify species.

For a genetic locus to be appropriate for DNA barcoding, three criteria must be met: (i) there must be divergence and significant genetic variation at the species level; (ii) the sequence must be short (600-700bp), to facilitate DNA extraction and amplification; and (iii) there must be conserved flanking regions for the development of universal *primers* (Kress et al. 2005). Moreover, there should be no overlap between intra- and interspecific variation (Meyer and Paulay 2005). In addition to being useful for species-level identification, DNA barcoding has applicability to biodiversity assessment, forensic analyses and studies of life history and ecology (Kress et al. 2005).

The identification of regions for DNA barcoding for the discrimination of species has been more successful, thus far, in animals than in plants (Hebert et al. 2003; Fazekas et al. 2009). For animals, the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) region has already become established as a widely used standard DNA barcoding region (Hebert et al. 2003), and has proven efficient for a wide range of taxonomic groups, including fish (Ward et al. 2005),

Lepidoptera (Hajibabaei et al. 2006), birds (Kerr et al. 2007), and amphibians (Smith et al. 2008). The use of mitochondrial regions, however, is not efficient for species-level discrimination of plants due to the low mutation rate of sequences in these regions (Kress et al. 2005).

Over the last decade there have been many efforts to delimit a DNA barcoding marker for the identification of various groups of plants. With the exception of the mitochondrial region, many regions of the chloroplast and nuclear genomes have been tested individually or in combination. Kress et al. (2005) sought to determine appropriate DNA regions for DNA barcoding of flowering plants and suggested that the *trnH-psbA* spacer has great potential for identification, but more than one *locus* must be employed simultaneously, such as the ribosomal nuclear region ITS, for example, for universal species-level discrimination of flowering plants,.

An investigation conducted by the “Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group” evaluated seven regions of plastid DNA (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* genes and *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA* spacers) and suggested that the combination of the two *loci rbcL\_matK* can be used as a DNA barcoding standard for plants because of their universality, sequence quality, low cost and ability to discriminate about 72% of terrestrial plant species (CBOL Plant Working Group 2009).

According to Chen et al. (2010), the marker that exhibited the best potential for identifying 5,905 species of medicinal plants of 1,010 genera and 219 families of angiosperms, gymnosperms, ferns, mosses, liverworts, algae and fungi, was the ITS2 region. Dong et al. (2015) suggested that *ycf1a* or *ycf1b* are the most variable plastid genome regions and can serve as core barcodes for land plants. In addition to its variability, amplification of *ycf1* primers was quite successful: 98.17% for angiosperms, 90.91% for gymnosperms, 82.80% for monilophytes, and 94.12% for bryophytes.

A universal standard DNA barcode marker for all groups of plants has yet to be identified and has proven difficult to acquire. The situation is no different for bryophytes. Furthermore, bryophytes have long been neglected and have a relatively limited number of researchers investigating them, especially compared to flowering plants, in spite of their high species diversity in Brazil.

Among bryophytes, and especially mosses, plastid markers tend to be short or have low resolution (e.g. *psbA-trnH* spacer). Furthermore, their capacity to discriminate at the species level is still debated (e.g. *rbcL*), and efforts are still needed concerning primer design and the development of amplification strategies (e.g. *trnK/matK*) (e.g. Quandt and Stech 2005; Stech and Frey 2008; Liu et al. 2010; Stech and Quandt 2010; Bell et al. 2011; Hassel et al. 2013).

The selection of a DNA barcoding marker for bryophytes has experienced controversy in recent years. Several DNA barcoding markers have been proposed for bryophytes. For example, Liu et al. (2010) evaluated ten regions (*atpF-atpH*, ITS2, *matK*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *rps4* and *trnL-trnF*) as candidates for DNA barcoding for 49 moss species and nine liverwort species. This author suggested *rbcL*, *rpoC1*, *rps4*, *trnH-psbA*, and *trnL-trnF* as potential candidate regions for DNA barcoding because they are easy to amplify using PCR techniques, of suitable length for easy bidirectional sequencing, and exhibit significant interspecific genetic variability, with resolutions above 84% for the species analyzed.

Liu et al. (2011) evaluated four regions of the chloroplast genome (*rbcL*-a, *rps4*, *trnH-psbA* and *trnL* intron) for DNA barcoding markers of four genera of mosses of Chinese Grimmiaceae, and suggested that the *trnH-psbA* region has the greatest potential as a barcoding marker for that group.

Hassel et al. (2013) investigated how the plastid regions *atpF–atpH*, *rbcL* and *trnH–psbA*, and the nuclear ITS2 region performed as barcode markers for species of five genera of mosses (*Bartramia*, *Distichium*, *Fissidens*, *Meesia* and *Syntrichia*) and one genus of liverwort (*Blepharostoma*) from Boreal and Arctic regions, and suggested that *atpF–atpH*, *rbcL* and ITS2 were the most promising barcode markers for mosses.

Regions *rps4-trnT*, *trnT-trnL*, *ITS1*, *ITS2* were proposed as DNA barcoding markers for some morphologically-complex groups, and gave promising results for *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta) from the Arctic (Lang et al. 2014) and the delimitation of *Racomitrium canescens* (Hedw.) Brid. (Grimmiaceae) from Holarctic regions (Stech et al. 2013).

For DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae), Bell et al. (2011) tested three plastid markers (*matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*) and one nuclear marker (ITS), and found that, in terms of the discriminatory power, ITS was the most informative region, followed by the *matK* marker.

Despite these efforts, research into which region is the ideal DNA barcoding marker has yet to reach a consensus on a standard global marker for delimiting species (Pennisi 2007; CBOL Plant Working Group 2009). A combination of markers that have the capacity to delimit individuals of the bryophyte divisions at the species level has yet to be established. Thus, further research at lower taxonomic levels (e.g. species and genera) is needed for later expansion to higher taxonomic groups. This is also the approach that studies have begun to follow for identifying a DNA barcode marker for bryophytes in Brazil.

## **5 DNA Barcoding of bryophytes in Brazil**

In Brazil, studies using DNA barcoding for delimiting taxonomically confusing plants have been undertaken with Amazon trees (Gonzales et al. 2013), species of Sapotaceae (Vivas

et al. 2014), medicinal plants recommended by the World Health Organization (Palhares et al. 2015), threatened commercially-exploited woody angiosperms from the Southern Atlantic Forests (Bolson 2015), Neotropical species of the genus *Spondias* (Silva et al. 2015) and the species *Cattleya walkeriana* Gardner and *Cattleya loddigesii* Lindl. (Rivera-Jiménez et al. 2017). Studies with bryophytes, however, are just beginning.

A total of 1,567 bryophytes, of which 337 are considered endemic, are currently catalogued for the Brazilian flora (Flora do Brasil 2020). The true number of bryophytes has been estimated to be even higher (about 1650 species), but due to the lack of knowledge about these plants, and the limited number of researchers working with them in Brazil, they remain largely neglected from many studies, floristic surveys and strategies for conservation.

Investigating the application of DNA barcoding to bryophytes in Brazil is an entirely new and unexplored area. Despite calls for the government to support research in this area, a research proposal involving bryophytes had never been funded until 2014.

In 2014, the first Brazilian effort to investigate DNA barcoding for Brazilian bryophytes began with collaboration between University of Brasília and Naturalis Biodiversity Center (Leiden, Netherlands). Among its research areas, this Dutch center investigates phylogeny and DNA barcoding and invests heavily in the development of a reference library with DNA barcodes for Dutch flora and fauna. Following the expertise and approach of this Dutch center, a DNA barcoding project was initiated with a few target species of bryophytes in Brazil, a tropical country with great, but also highly threatened, diversity.

Thus began the project “DNA - Barcoding of Brazilian Bryophytes - A case study to improve the identification of tropical bryophyte species” (Brazilian Barcode Project hereafter), with the support of the Brazilian Government (CNPq - National Council for Scientific and Technological Development and CAPES - Coordination of Improvement of

Higher Level Personnel). Four genera of bryophytes are being investigated, which include three genera of mosses (*Sematophyllum* Mitt., *Schlotheimia* Brid. and *Macromitrium* Brid.) and one liverwort (*Metzgeria* Raddi). These genera are all widely distributed in Brazil, have species endemic to the country, are ecologically important in several Brazilian ecosystems and have fresh material available (also recent herbaria specimens). Furthermore, the morphological characters important for bryophyte identification vary little in these four genera, and thus it is more difficult to delimit their species. This effort represents the first Brazilian project involving DNA barcoding for bryophytes and aims to evaluate which marker or combination of markers have a greater capacity for delimiting species of Brazilian bryophytes. The four genera were chosen as a pilot project to test markers, with the aim of expanding analyses to other groups of bryophytes occurring in Brazil in the future.

The genus of liverwort chosen for this DNA barcode investigation in Brazil was *Metzgeria* Raddi (Metzgeriaceae). This genus has twenty-six species that occur in Brazil, of which six are endemic (Costa 2008; Costa and Peralta 2015). The species of this genus occur predominantly in the in the Atlantic Forest, from the Northeast region to the South region of the country, but are also found in the Amazon forest and in the Cerrado (Costa 2008). Identification of the species of Metzgeriaceae is often considered difficult because some of the characteristics considered important for the delimitation of its species are highly variable, as demonstrated by Costa (2008).

Studying the evolutionary history of liverworts, Forrest et al. (2006) constructed a molecular phylogeny using five regions of DNA: three chloroplast genes (*psbA*, *rbcL* and *rps4*), one nuclear gene (the ribosomal LSU) and one mitochondrial gene (*nad5*). Four species of *Metzgeria* and two species of *Apometzgeria* Kuwah. were included in the study, and formed a monophyletic clade with maximum support. Crandall–Stotler et al. (2009b) studied the phylogeny and classification of Marchantiophyta and synonymized *Apometzgeria* and

*Austrometzgeria* with *Metzgeria*. Fuselier et al. (2009) studied the phylogeography of *Metzgeria furcata* and *Metzgeria conjugata* Lindb. in Europe and North America using five markers: *trnL*, *trnG*, *psbT*, *rpb2* and ITS2. The chloroplast and nuclear regions were analyzed both separately and combined, resulting in a tree topology with support for the same major lineages. Among these five markers, ITS2 had the greatest number of informative characters when compared to the total number of characters for each marker. Investigating the phylogeography of *Apometzgeria*, Fuselier et al. (2011) used the markers *trnL*, *trnG*, *psbT* and *rpb2* to perform a phylogenetic analysis and resolved two major well-supported clades that include specimens of *Apometzgeria*. The study found *Apometzgeria* to be phylogenetically nested within *Metzgeria*, which provides additional evidence of the monophyly of the genus, as reported by Forrest et al. (2006).

The Brazilian Barcode Project is expected to test 22 species of *Metzgeria*, including six endemics, using the molecular markers *trnL-F* and ITS. It is expected that using these two markers, barcoding will be able to circumscribe the species of *Metzgeria* that occur in Brazil, which exhibit extensive morphological variation.

The genus of pleurocarpous moss chosen by the Brazilian Barcode Project, *Sematophyllum* Mitt. (Sematophyllaceae), is widely recognized as highly morphologically variable, which has hindered its delimitation. The genus has no obvious synapomorphy, and is in need of a global taxonomic revision given that phylogenetic data suggest that it is highly polyphyletic (Câmara and Van Rooy 2014). Carvalho-Silva et al. (2017) used eight molecular markers (*trnL-F*, *rps4*, *rbcL*, *nad4/5*, *nad5*, ITS1, ITS2 and 26S) from two genomes to assess the phylogeny of Sematophyllaceae, and found that *Sematophyllum* is in fact polyphyletic, and is segregated into at least three genera (*Sematophyllum*, *Brittonodoxa* W.R. Buck, P.E.A.S. Câmara and Carv.-Silva and *Vitalia* P.E.A.S. Câmara, Carv.-Silva and W.R. Buck). In this case, the genus *Brittonodoxa* was selected as a target taxon for DNA barcode study by

the Brazilian Barcode Project. This genus includes some very common species in Brazil that are distributed throughout the country and possess extensive morphological variation, such as *Brittonodoxa subpinnata* (Brid.) W.R. Buck, P.E.A.S. Câmara and Carv.-Silva, for example. There remains the possibility of testing the discrimination capacity of the markers using all species of *Brittonodoxa* that occur in Brazil.

Preliminary results from our tests with the taxa and eight markers used by Carvalho-Silva et al. (2017) revealed *trnL-F*, *nad4/5*, *nad5* and *rps4* to be the best at distinguishing species of Sematophyllaceae. At this time, the number of included taxa needs to be increased and additional analyses performed with these markers, both separately and in combination, in order to more broadly test their species discrimination potential for the genus *Brittonodoxa*.

Two genera of the family Orthotrichaceae (*Schlotheimia* Brid. and *Macromitrium* Brid.) were also chosen for the Brazilian Barcode Project because of the complexity involved in their identification using morphological characters. In addition, there are several taxonomic problems in these two genera, including a large number of superfluous names attributed to local floras and the lack of keys to facilitate species identification (Wilbraham 2016).

*Schlotheimia* is a monophyletic genus, has a Panropical distribution and contains approximately 120 species (Frey and Stech 2009). Fifty-six species are recorded for the Neotropics, where it is estimated that less than 30 are actually confirmed (Gradstein et al. 2001). Costa and Peralta (2015) recognized 13 species of *Schlotheimia* in Brazil, six of which are endemic. The morphological identification of some of the species of *Schlotheimia* require studying the sporophyte (Peralta, 2016 unpublished data), and since it is not always possible to find fertile plants in the field, DNA barcoding holds promise for facilitating the identification of species of this taxon.

*Macromitrium* Brid. is a large genus, of approximately 350 species that are distributed widely in tropical and subtropical regions of the world (Vitt and Ramsay 1985a, b). In the

Neotropics there are about 125 species of this genus (Gradstein et al. 2001). The morphology of this genus is quite complex, and the characters used for species identification are not well established. Thus, the true diversity of species occurring in Brazil is unknown, but is estimated to be around 20, of which six are endemic (Flora do Brasil 2020).

The molecular circumscription of the genus *Macromitrium* is not well delimited. It is hoped that DNA barcoding will aid in identifying the species of this genus, provide a new perspective regarding the distribution of morphological characters, provide insight into its phylogenetic problems and correctly delimit the genus. In this case, the first step, which is underway, is to increase the taxonomic representation of *Macromitrium* in phylogenetic analyses so that the genus can be delimited and the monophyly of *Macromitrium* assessed. If the genus is found to be monophyletic a single lineage will be chosen for inclusion in DNA barcode studies.

A DNA barcode study of the Chinese species of *Macromitrium* using a combination of different chloroplast markers (*trnL-rps4*, *trnL-trnG-rps4*, *trnL-psbT-rps4*, *trnG-psbT-rps4* and *trnL-trnG-rps4-psbT*) resulted in a successful identification rate of 100%. As a result, the combination *trnL-trnG-psbT* was recommended as a DNA barcode marker for this genus (Li et al. 2013).

Based on the literature and results of partner institutions, the markers used for phylogenetic analyses and that are being tested as candidates for DNA barcoding for *Schlotheimia* and *Macromitrium* are *trnL-F* and *trnG* (markers of chloroplast region), as proposed by (Li et al. 2013) for *Macromitrium*. Also being used and tested is the ITS nuclear marker, which is being used by the Naturalis Biodiversity Center, the partner institution of this project, and which has produced good results with sufficient variation for distinguishing closely related species.

Results of the Brazilian Barcode Project are expected to circumscribe the species of the four genera chosen and better understand the extensive morphological variation they possess. Ultimately the project is expected to expand to other groups of bryophytes.

## **Conclusion**

The correct delimitation of taxa is essential for comprehending the biodiversity of Brazilian bryophytes, determining their current conservation status and developing biodiversity conservation plans. As the present review has shown, few papers have been published by Brazilian bryologists and/or focusing in Brazilian bryophytes from a phylogenetic or barcode perspective. It is clear that more studies are necessary in this area and that it is possible to perform them in Brazil, given that the research group at the cryptogamic laboratory of the Botany Department of University of Brasilia is doing it. Interestingly, most of the papers published so far have dealt with pleurocarpous mosses, but studies are beginning to address other groups of bryophytes, thus contributing to a better understanding of the diversity of Brazilian bryophytes.

## **Acknowledgments**

This project was funded by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa—Brazil) Edital 71/2013 (MEC / MCTI / CAPES / CNPq / FAPs). We thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarships to the first and second authors. We thank Dr. Michael Stech, a collaborating researcher from Naturalis Biodiversity Center; Dr. Denilson Fernandes Peralta, from Institute of Botany of São Paulo; and the curators of the RB and SP Herbaria.

## 6 References

- APG (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann Missouri Bot Gard.* doi: 10.2307/2992015
- APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc.* doi: 10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x
- APG IV (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc.* doi: 10.1111/boj.12385
- Bechteler J, Lee GE, Schafer-Verwimp, Renner MAM, Peralta DF, Heinrichs J (2016a) Towards a monophyletic classification of Lejeuneaceae V: the systematic position of *Pictolejeunea*. *Phytotaxa.* doi: 10.11646/phytotaxa.280.3.4.
- Bechteler J, Lee GE, Schafer-Verwimp, Pócs T, Peralta DF, Renner MAM, Heinrichs J, Schneider H (2016b) Towards a monophyletic classification of Lejeuneaceae IV: reinstatement of *Allorgella*, transfer of *Microlejeunea aphanella* to *Vitalianthus* and refinements of the subtribal classification. *Plant Syst. Evol.* doi: 10.1007/s00606-015-1252-8
- Bell D, Long DG, Forrest AD, Hollingsworth ML, Blom HH, Hollingsworth PM (2011) DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species. *Mol Ecol Resour.* doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03053.x
- Bolson M, Smidt EC, Brotto ML, Silva-Pereira V (2015) ITS and trnH-psbA as efficient DNA Barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLoS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0143049
- Brotherus VF (1908) Bryales. In: Engler A and Prantl K (eds) *Die natürlichen Pflanzenfamilien* I(3). W. Engelmann, Leipzig, pp 1057-1152
- Brotherus VF (1925) Musci (Laubmoose). 2. Hälfte. In: Engler A (ed) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Ed. 2, 11: I–IV. W. Engelmann, Leipzig, pp 1-542
- Buck WR, Goffinet B (2000) Morphology and classification of mosses. In: AJ Shaw and B Goffinet (eds) *Bryoph Biol.* Cambridge University Press, Cambridge, pp 71-123

- Buryová B, Shaw AJ (2005) Phenotypic plasticity in *Philonotis fontana* (Bryopsida: Bartramiaceae). J Bryol. doi: 10.1179/174328205X40545
- Câmara PEAS (2006a) Molecular contribution on the systematics placement of the moss genus *Paranapiacabaea*. Bol Inst Bot. (São Paulo) 18: 159-162
- Câmara PEAS (2006b) Uso e importância da sistemática molecular em conservação, um estudo em Hypnales Bryophyta. In: JE de A Mariath and RP dos Santos (eds) Av Bot Iníc Séc. XXI. Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre, pp 722-725
- Câmara PEAS, Buck W (2012) A re-interpretation of Fabroniaceae, a phylogenetic perspective. Bryologist. doi: 10.1639/0007-2745-115.1.109
- Câmara PEAS, Shaw AJ (2013) A molecular phylogeny of the moss genus *Taxithelium* (Pylaisiadelphaceae) based on plastid, mitochondrial and nuclear markers. Syst Bot. doi.org/10.1600/036364413X674832
- Câmara PEAS, Van Rooy J (2014) A new species of *Sematophyllum* (Sematophyllaceae) from South Africa and a key to the southern African species of the genus. The Bryologist. doi: 10.1639/0007-2745-117.3.297
- Carvalho-Silva M, Dantas TS, Câmara PEAS (2014) Systematic position of the moss genus *Trachyphyllum* A. Gepp (Pylaisiadelphaceae) plus additions to its distribution in the Neotropics. J Bryol. doi: org/10.1179/1743282014Y.0000000110
- 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. doi: org/10.12705/664.2
- CBOL Plant Working Group (2009) A *DNA barcode* for land plants. Proc Natl Acad Sci. PNAS. doi: 10.1073/pnas.0905845106
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhun Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel *DNA barcode* for identifying medicinal plant species. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0008613
- Costa DP (2008) Metzgeriaceae (Hepaticae). Flora Neotropica Monograph 102:1-169
- Costa DP, Peralta DF (2015) Bryophytes diversity in Brazil. Rodriguésia. doi: 10.1590/2175-7860201566409

- Cox CJ, Hedderson TAJ (1998) Phylogenetic relationships among the ciliate arthrodontous mosses: Evidence from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Plant Syst. Evol* 215:199-139
- Cox CJ, Goffinet B, Newton AE, Shaw AJ, Hedderson TAJ (2000) Phylogenetic Relationships among the Diplolepideous-Alternate Mosses (Bryidae) Inferred from Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *The Bryologist*. doi: 10.1639/0007-2745(2000)103[0224:PRATDA]2.0.CO;2
- Crandall-Stotler B, Stotler RE (2000) Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Shaw AJ and B Goffinet (eds) *Bryoph Biol*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 21-70
- Crandall-Stotler BJ, Forrest LL, Stotler RE (2005) Evolutionary trends in the simple thalloid liverworts (Marchantiophyta, Jungermanniopsida subclass Metzgeriidae). *Taxon*. doi: 10.2307/25065359
- Crandall-Stotler B, Stotler RE, Long DG (2009a). Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Goffinet B and AJ Shaw (eds) *Bryoph Biol*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-54
- Crandall-Stotler B, Stotler RB, Long DG (2009b) Phylogeny and classification of the Marchantiophyta. *Edinb. J Bot*. doi.org/10.1017/S0960428609005393
- De Luna E, Newton AE, Withey A, Gonzalez D, Mishler BD (1999) The Transition to Pleurocarpy: A Phylogenetic Analysis of the Main Diplolepidous Lineages Based on *rbcL* Sequences and Morphology. *The Bryologist*. doi: 10.2307/3244253
- De Luna E, Buck WR, Akiyama H, Arikawa T, Tsubota H, González D, Newton AE, Shaw AJ (2000) Ordinal Phylogeny within the Hypnobryalean Pleurocarpous Mosses Inferred from Cladistic Analyses of Three Chloroplast DNA Sequence Data Sets: *trnL-F*, *rps4*, and *rbcL*. *The Bryologist*. doi: 10.1639/0007-2745(2000)103[0242:OPWTHP]2.0.CO;2
- Dixon HN (1932) Classification of mosses. In: Verdoorn F (ed) *Manual of Bryology*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 397-412
- Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J, Zhou S (2015) *lycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep08348
- Duff RJ, Cargill DC, Villarreal JC, Renzaglia KS (2004) Phylogenetic relationships of the hornworts based on *rbcL* sequence data: novel relationships and new insights. *Mongr Sys Bot Mo Bot. Gard*. 98:41-58.

- Epstein HE, Calef MP, Walker MD, Chapin III FS, Starfield AM (2004) Detecting changes in arctic tundra plant communities in response to warming over decadal time scales. *Glob Change Biol.* doi: 10.1111/j.1529-8817.2003.00810.x
- Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Percy DM, Graham SW, Barrett SCH, Newmaster SG, Hajibabaei M, Husband BC (2009) Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using *DNA barcoding* markers? *Mol Ecol Resour.* doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x
- Fleischer M (1923) *Musci Buitenzorg* 4. Brill, Leiden, pp i–xxxi + 1105–1729.
- Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Accessed in: 10 Mar. 2018
- Forrest LL, Christine Davis E, Long DG, Crandall-Stotler BJ, Clark A, Hollingsworth ML (2006) Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta): multiple taxa, genomes and analyses. *The Bryologist.* doi.org/10.1639/0007-2745(2006)109[303:UTEHOT]2.0.CO;2
- Frey W, Stech M (2009). Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta. In: Frey W (ed) *Syllabus of Plant Families* 3, 13th edn. Gebr. Borntraeger, Stuttgart.
- Fuselier L, Davison PG, Clements M, Shaw B, Devos N, Heinrichs J, Hentschel J, Sabovljevic M, Szövényi P, Schuette S, Hofbauer W, Shaw AJ (2009) Phylogeographic analyses reveal distinct lineages of the liverworts *Metzgeria furcata* (L.) Dumort. and *Metzgeria conjugata* Lindb. (Metzgeriaceae) in Europe and North America. *Biol. J. Linn. Soc.* doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01319.x
- Fuselier LC, Shaw B, Engel JJ, von Konrat M, Costa DP, Devos N, Shaw AJ (2011) The status and phylogeography of the liverwort genus *Apometzgeria* Kuwah. (Metzgeriaceae). *The Bryologist.* doi: 10.1639/0007-2745-114.1.92
- Gama R, Stech M, Schäfer-Verwimp A, Peralta DF (2015) A morpho-molecular revision of *Leucoloma* (Dicranaceae, Bryophyta) in Brazil. *Nova Hedwigia* 100: 319 – 332.
- Gama R, Faria ALA, Câmara PEAS, Stech M (2016) Identity and origin of the *Campylopus* (Leucobryaceae, Bryopsida) species from Trindade Island (Brazil). *Cryptogamie Bryologie.* doi: 10.7872/cryb/v37.iss3.2016.241
- Goffinet B, Bayer RJ, Vitt DH (1998) Circumscription and phylogeny of the Orthotrichales (Bryopsida) inferred from rbcL sequence analyses. *Am. J. Bot* 85: 1324-1337

- Goffinet B, Cox CJ (2000) Phylogenetic Relationships among Basal-Most Arthrodontous Mosses with Special Emphasis on the Evolutionary Significance of the Funariineae. *The Bryologist*. doi: 10.1639/0007-2745(2000)103[0212:PRABMA]2.0.CO;2
- Goffinet B, Buck WR (2004) Systematics of the Bryophyta: from molecules to a revised classification. In: Goffinet B, Hollowell V and Magill R (eds) *Molecular systematics of bryophytes*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*, 98: 205-239
- Goffinet B, Buck WR, Shaw AJ (2009) Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: Goffinet B and Shaw AJ (eds) *Bryoph Biol*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 55-138
- Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J, Mori SA, Pétronelli P, Riéra B, et al. (2013) Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0007483
- Gradstein SR, Churchill SP, Salazar-Allen N (2001) Guide to the bryophytes of Tropical America. *Mem N Y Bot Gard* 86: 1-577
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* doi: 10.1073/pnas.0510466103
- Hassel K, Pedersen B, Söderström L (2005) Changes in life-history traits in an expanding moss species: phenotypic plasticity or genetic differentiation? A reciprocal transplantation experiment with *Pogonatum dentatum*. *Ecography*. doi: 10.1111/j.0906-7590.2005.03910.x
- Hassel K, Segreto R, Ekrem T (2013) Restricted variation in plant barcoding markers limits identification in closely related bryophyte species. *Mol Ecol Resour*. doi: 10.1111/1755-0998.12074
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003) Biological identifications through *DNA barcodes*. *Proc R Soc Lond. B*. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hedwig, J. 1801. *Sp. Musc. Frond.* vi + 352 pp.
- Heinrichs J, Hentschel J, Feldberg K, Bombosch A, Schneider H (2009) Phylogenetic biogeography and taxonomy of disjunctly distributed bryophytes. *J Syst Evol*. doi: 10.1111/j.1759-6831.2009.00028.x
- Heinrichs J, Dong S, Schäfer-Verwimp A, Peralta DF, Feldberg K, Schmidt A, Schneider H (2014) Towards a monophyletic classification of Lejeuneaceae II: subtribes Pytnolejeuneinae and Xylolejeuneinae sbr. nov., transfer of *Octolejeunea* to

- Lepidolejeuninae, and generic refinements. *Phytotaxa*. doi: 10.11646/phytotaxa.163.2.1.
- Hölscher D, Köhler L, van Dijk AIJM, Bruijnzeel LA (2004) The importance of epiphytes to total rainfall interception by a tropical montane rain forest in Costa Rica. *J Hydrol*. doi: 10.1016/j.jhydrol.2004.01.015
- Hudson JMG, Henry GHR (2010) High Arctic plant community resists 15 years of experimental warming. *J Ecol*. doi: 10.1111/j.1365-2745.2010.01690.x
- Hyvönen J, Hedderson TA, Smith Merrill GL, George Gibbings J, Koskinen S (1998) On Phylogeny of the Polytrichales. *The Bryologist*. doi: 10.2307/3244524
- Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN (2007) Comprehensive *DNA Barcode* coverage of North American Birds. *Mol Ecol Notes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01670.x.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of *DNA barcodes* to identify flowering plants. *PNAS* 102: 8369–8374. doi: 10.1073/pnas.0503123102
- La Farge C, Mishler BD, Wheeler JA, Wall DP, Johannes K, Schaffer S, Shaw AJ (2000) Phylogenetic Relationships within the Haplolepideous Mosses. *The Bryologist*. doi: 10.1639/0007-2745(2000)103[0257:PRWTHM]2.0.CO;2
- Lang AS, Kruijer JD, Stech M (2014) DNA barcoding of Arctic bryophytes: an example from the moss genus *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta). *Polar Biol*. doi: 10.1007/s00300-014-1509-7
- Lewis L, Mishler BD, Vilgalys R (1997) Phylogenetic relationships of the liverworts (Hepaticae), a basal embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequences of the chloroplast gene *rbcL*. *Mol. Phylogenetics Evol*. doi: 10.1006/mpev.1996.0395
- Li DD, Guo S, Yu J (2013) Feasibility Study on the Identification of Genus *Macromitrium* Based on Four Chloroplast Genes. *Plant Sci*. doi: 10.3724/SP.J.1142.2013.10023
- Linnaeus C (1753) *Species Plantarum* 1. Laurentius Salvius, Stockholm, pp 28
- Liu Y, Yan HF, Cao T, Ge XJ (2010) Evaluation of tem plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *J Syst Evol*. doi: 10.1111/j.1759-6831.2009.00063.x
- Liu Y, Cao T, Ge X-Y (2011) A case study of DNA barcoding in Chinese Grimmiaceae and a moss recorded in China for the first time. *Taxon* 60: 185–193.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol*. doi: 10.1371/journal.pbio.0030422

- Mitten W (1869) Musci austro-americi. Enumeration muscorum omnium autoamericanorum hucusque cognitorum. J. Linn. Soc. Bot. 12: 1-659
- Nadkarni NM, Matelson TJ (1991) Fine litter dynamics within the tree canopy of a tropical cloud forest. Ecology. doi: 10.2307/1941560
- Newton AE, De Luna E (1999) A Survey of Morphological Characters for Phylogenetic Study of the Transition to Pleurocarpy. The Bryologist. doi: 10.2307/3244254
- Newton AE, Cox CJ, Duckett JG, Wheeler JA, Goffinet B, Hedderson TAJ, Mishler BD (2000) Evolution of the Major Moss Lineages: Phylogenetic Analyses Based on Multiple Gene Sequences and Morphology. The Bryologist 103 (2): 187-211
- Palhares RM, Drummond MG, Brasil BSAF, Cosenza GP, Brandão MGL, Oliveira G (2015) Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0127866.
- Pennisi E (2007) Taxonomy – Wanted: A barcode for plants. Science. doi: 10.1126/science.318.5848.190
- Pócs T (1982) Tropical forest bryophytes. In: Smith AJE (ed) Bryoph. Ecol. Chapman and Hall, London and New York, pp 59-104
- Quandt D, Stech M (2005) Molecular evolution and secondary structure of the chloroplast *trnL* intron in bryophytes. Mol Phylogenet Evol. doi: 10.1016/j.ympev.2005.03.01.
- Rivera-Jiménez H, Rossini BC, Tambarussi EV, Veasey EA, Ibanes B, Marino CL (2017) DNA barcode regions for differentiating *Cattleya walkeriana* and *C. loddigesii*. Acta Scientiarum. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v39i1.33024
- Schäfer-Verwimp A, Feldberg K, Dong S, van Melick H, Peralta DF, Schmidt A, Schneider H, Heinrichs J (2014) Towards a monophyletic classification of Lejeuneaceae III: the systematic position of *Leiolejeunea*. Phytotaxa. doi: 10.11646/phytotaxa.170.3.4.
- Schwaegrichen CF (1816) Sp. Musc. Frond., Suppl.1, sect.2, p 374
- Schwaegrichen CF (1823) Sp. Musc. Frond., Suppl.2, sect.1, 1-86
- Schwaegrichen CF (1824) Sp. Musc. Frond., Suppl.2, sect.2, 87-186
- Schwaegrichen CF (1826) Sp. Musc. Frond., Suppl.2, 2 (1): 1-79
- Schwaegrichen CF (1827) Sp. Musc. Frond., Suppl.2, 2 (2): 81-290
- Schwaegrichen CF (1830) Sp. Musc. Frond., p 122

- Silva JN, Costa AB, Silva JV, Almeida C (2015) DNA barcoding and phylogeny in neotropical species of the genus *Spondias*. *Biochem. Syst. Ecol.* doi: 10.1016/j.bse.2015.06.005.
- Smith MA, Poyarkov NAJR, Hebert PDN (2008) CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol Ecol Resour.* doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01964.x
- Shaw AJ (2000) Phylogeny of the Sphagnopsida Based on Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *The Bryologist* 103 (2): 277-306.
- Stech M, Quandt D, Frey W (2003) Molecular circumscription of the hornworts (Anthocerotophyta) based on the chloroplast DNA trnL-trnF region. *Journal of Plant Research.* doi: 10.1007/s10265-003-003-0118-2
- Stech M, Frey W (2008) A morpho-molecular classification of the mosses (Bryophyta). *Nova Hedwigia.* doi: 10.1127/0029-5035/2008/0086-0001
- Stech M, Quandt D (2010) 20,000 species and five key markers: the status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa.* doi: 10.11646/phytotaxa.9.1.11
- Stech M, Veldman S, Larraín J, Muñoz J, Quandt D, Hassel K, Kruijer JD (2013) Molecular species delimitation in the *Racomitrium canescens* complex (Grimmiaceae) and implications for *DNA barcoding* of species complexes in mosses. *PLoS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0053134
- Vanderpoorten A, Goffinet B (2006) Mapping uncertainty and phylogenetic uncertainty in ancestral character state reconstruction: an example in the moss genus *Brachytheciastrum*. *Syst Biol.* doi: 10.1080/10635150601088995
- Vanderpoorten A, Shaw AJ (2010) The application of molecular data to the phylogenetic delimitation of species in bryophyte: A note of caution. *Phytotaxa.* doi: 10.11646/phytotaxa.9.1.12
- Veneklaas EJ, Zagt RJ, Van Leerdam A, van EKR, Broekhoven AJ, Van Genderen M (1990) Hydrological properties of the epiphyte mass of a montane tropical rain forest, Colombia. *Vegetatio* 89: 183-192
- Villareal JC, Crandall-Stotler BJ, Hart ML, Long DG, Forrest LL (2016) Divergence times and the evolution of morphological complexity in an early land plant lineage (Marchantiopsida) with a slow molecular rate. *New Phytologist.* doi: 10.1111/nph.13716
- Vitt DH (1984) Classification of the Bryopsida. In: Schuster RM (ed) *New Man. Bryol.* Vol 2. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, pp 696-759

- Vitt DH, Ramsay HP (1985a) The *Macromitrium* complex in Australasia (Orthotrichaceae, Bryopsida). Part I. Taxonomy and phylogenetic relationships. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 59: 325-451
- Vitt DH, Ramsay HP (1985b) The *Macromitrium* complex in Australasia (Bryopsida: Orthotrichaceae). Part II. Distribution, ecology and paleogeography, Journal of the Hattori Botanical Laboratory 59: 453-468
- Vivas CV, Moraes RCS, Alves-Araújo A, Alves M, Mariano-Neto E, van den Berg C, Gaiotto FA (2014) DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? Genet Mol Biol. doi: 10.1590/S1415-47572014005000019
- Walther K (1983) Brophytina, Laubmoose, Kapitel V2. In: Gerloff J, Poelt J (eds) Syllabus der Pflanzenfamilien. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Ward RW, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) *DNA barcoding* Australia's fish species. Philos. Trans. Royal Soc. B. doi: 10.1098/rstb.2005.1716
- Wilbraham J (2016) Taxonomic notes on African Orthotrichaceae I. New synonymy in *Macromitrium*. J. Bryol. doi: 10.1080/03736687.2015.1124175

## **CAPÍTULO 2**

### **A discriminação de espécies de *Metzgeria* Raddi do Brasil: um estudo molecular e morfológico**

## 1 Introdução

As hepáticas (Marchantiophyta) são compostas por cerca de 5.000 espécies distribuídas mundialmente (Goffinet & Shaw 2009), sendo que no Brasil são registradas 673, distribuídas em 40 famílias (Flora do Brasil 2020). Baseado em análises cladísticas e caracteres morfológicos, Marchantiophyta foi subdividido em duas classes: Marchantiopsida Stotler & Stotl.-Crand. (hepáticas talosas complexas) e Jungermanniopsida Stotler & Stotl.-Crand. Esta última composta por duas subclasses: Metzgeriidae Barthol.-Began (hepáticas talosas simples) e Jungermanniidae Stotler & Stotl.-Crand (hepáticas folhosas) (Crandall-Stotler & Stotler 2000).

Nas hepáticas talosas simples (Metzgeriidae) o talo é simplificado e, normalmente, apresenta a região central (medula) pluriestratificada e dois lóbulos laterais (lâmina) uniestratificados ou biestratificados. Metzgeriidae é composta por 15 famílias, entre elas Metzgeriaceae (Crandall-Stotler & Stotler 2000), e constituem um grupo parafilético (Forrest & Crandall-Stotler 2004, Forrest et al. 2006 e He-Nygrén et al. 2006).

Metzgeriaceae é uma família com distribuição cosmopolita (Costa 2008, Barros et al. 2012) composta por três gêneros: *Metzgeria* Raddi, *Steereella* Kuwah. e *Vandiemenia* Hewson (Crandall–Stotler et al. 2009). As espécies pertencentes a esta família são caracterizadas pela largura do talo, número de células da costa a margem, número de células da costa e da medula, tamanho das células, verrucosidade da cutícula, tipo e disposição dos rizóides no talo, gemas e sexualidade. Embora a família já tenha sido revisada para o Brasil (Costa 1999) e para o Neotrópico (Costa 2008), a taxonomia é considerada caótica (Costa 2008), pois várias características utilizadas para distinguir as espécies, qualitativas e quantitativas, apresentam sobreposição e grande variação nas descrições das espécies.

O gênero *Metzgeria* é composto por 60 a 80 espécies, de acordo com estudos regionais realizados na Europa, América do Norte, Australasia, Pacífico e América do Sul (Phephu &

van Rooy 2013). Na América Tropical, *Metzgeria* é composto por 57 espécies das quais 27 ocorrem no Brasil, sendo seis endêmicas (*M. bahiensis* Schiffn., *M. brasiliensis* Schiffn., *M. convoluta* Steph., *M. cratoneura* Schiffn., *M. psilocraspeda* Schiffn. e *M. subaneura* Schiffn.) (Flora do Brasil 2020). No Brasil, as espécies ocorrem predominantemente na região costeira, na Mata Atlântica, do Nordeste até o sul do país, e também são encontradas na Floresta Amazônica e no Cerrado (Costa 1999, Costa 2008).

*Metzgeria* foi descrita por Raddi (1818) com base em exemplares europeus (Nieva & Schiavone 2002). As plantas deste gênero possuem gametófitos talosos, ramificações dicotômicas ou pinadas (raramente), talo plano a fortemente convexo, com a costa pluriestratificada bem definida e lâmina uniestratificada; rizóides unicelulares dispostos na margem e superfície ventral da costa, na superfície ventral da lâmina podem ser presentes, ocasionais ou raros; dioicas ou monóicas; reprodução assexuada por gemas discóides a liguladas, originadas na margem ou na superfície dorsal do talo; ramos sexuais curtos, na superfície ventral do talo, sobre a costa (Nieva & Schiavone 2002, Costa 2008).

Os estudos de Forrest et al. (2006) e Fuselier et al. (2011) corroboram o monofiletismo do gênero *Metzgeria*. Forrest et al. (2006), utilizando cinco regiões do DNA: *psbA*, *rbcL* e *rps4* (cloroplasto), LSU (nuclear) e *nad5* (mitocondrial) de quatro espécies de *Metzgeria* e duas de *Apometzgeria* Kuwah. (Metzgeriaceae), demonstraram a monofilia do gênero, com suporte máximo. Pouco tempo depois, Crandall–Stotler et al. (2009) estudaram a filogenia e a classificação de Marchantiophyta e sinonimizaram *Apometzgeria* e *Austrometzgeria* Kuwah. a *Metzgeria*. Informações também obtidas por Fuselier et al. (2011), que estudaram a filogeografia de duas espécies (*Apometzgeria pubescens* (Schrank) Kuwah. e *A. frontipilis* (Lindb.) Kuwah. & J.J. Engel) utilizando quatro marcadores moleculares: *trnL*, *trnG*, *psbT* and *rpb2*. Nas análises realizadas neste último estudo também foram incluídas amostras de *Metzgeria* e as análises filogenéticas geraram clados bem suportados e resolvidos, mostrando

que *Apometzgeria* está no mesmo clado que *Metzgeria*, adicionando evidências do monofiletismo de *Metzgeria*, como apresentado anteriormente por Forrest et al. (2006).

Fuselier et al. (2009) investigaram a filogeografia de *Metzgeria furcata* (L.) Dumort. e *Metzgeria conjugata* Lindb. na Europa e na América do Norte utilizando cinco marcadores: *trnL*, *trnG*, *psbT*, *rpb2* e ITS2. Este estudo forneceu informações significantes sobre este grupo, indicando que são plantas com ampla distribuição e que as disjunções continentais abrigam linhagens crípticas. Das cinco regiões utilizadas neste estudo o ITS2 foi o que apresentou o maior número de caracteres informativos (Fuselier et al. 2009).

E, recentemente, foi realizado um trabalho com *Aneura* Dumort., que é um gênero de hepática talosa que, de acordo Crandall–Stotler et al. (2005) e Forrest et al. (2006), é o grupo irmão de *Metzgeria*. Bączkiewicz et al. (2017) investigaram as relações entre espécies de *Aneura maxima* (Schiffn.) Steph., *Aneura mirabilis* (Malmb.) Wickett & Goffinet e espécies crípticas de *Aneura pinguis* (L.) Dumort. Neste estudo, foram utilizados seis marcadores moleculares: *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF* e ITS e amostras de diferentes regiões geográficas. Foram formados dez clados correspondentes à dez espécies crípticas de *A. pinguis*. *Aneura maxima* e *A. mirabilis* formaram clados distintos em *A. pinguis*, o que indica que *A. pinguis* é um táxon parafilético. Todas as espécies crípticas de *A. pinguis* distinguiram-se, claramente, em suas preferências de habitat, sugerindo que adaptações ao habitat poderiam ser uma importante força motriz relacionada à especiação críptica dentro deste táxon. O trabalho acima foi um dos estudos utilizados para comparação com os resultados obtidos no presente estudo por também ter como objetivo a avaliação das regiões moleculares como possíveis DNA barcode e por se tratar de um grupo filogeneticamente próximo à *Metzgeria*.

De acordo com Costa (2008) todas as espécies neotropicais de Metzgeriaceae pertencem à *Metzgeria* e alguns caracteres morfológicos, considerados importantes para a delimitação das espécies, são bastante variáveis, de forma que a circunscrição das espécies

baseada apenas nos caracteres morfológicos é muito difícil. Portanto, baseando-se nas dificuldades que são encontradas para identificar as espécies de *Metzgeria* (Costa 2008), é importante procurar outras fontes de informações que auxiliem na identificação destas espécies.

A identificação de espécies de briófitas é muitas vezes dificultada devido ao número limitado de caracteres morfológicos (Vanderpoorten & Goffinet 2006), sendo poucos destes caracteres facilmente visíveis, e também o tamanho pequeno destas plantas outro fator (Hassel et al. 2013). Além disso, são plantas que muitas vezes apresentam plasticidade morfológica considerável como resposta à fatores ambientais (Buryová & Shaw 2005; Hassel et al. 2005; Vanderpoorten & Goffinet 2006).

Com o objetivo de delimitar de espécies, o DNA barcode é considerado uma ferramenta importante no auxílio para identificação de espécies (e.g. Hebert et al. 2003), que tem como objetivo identificar organismos a partir de sequências de DNA única, curta, de fácil amplificação e que não haja sobreposição entre variação intraespecífica e interespecífica (Meyer & Paulay 2005). Dessa forma, a obtenção e a avaliação de regiões de DNA podem ser particularmente informativas e promissoras como ferramenta de auxílio na discriminação de espécies de *Metzgeria*.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar regiões barcode do genoma de *Metzgeria* que sejam capazes de discriminar as espécies do Brasil.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Discriminar as espécies de *Metzgeria* do Brasil;

- Analisar as características dos marcadores moleculares e os respectivos sucesso de amplificação e sequenciamento;
- Realizar análises filogenéticas e de Neighbor Joining, considerando os caracteres morfológicos para discriminação das espécies;
- Comparar a sucesso de discriminação de espécies de *Metzgeria* através dos marcadores de DNA utilizados para inferir o marcador ótimo ou a combinação de marcadores ótimos para o gênero;
- Comparar as distâncias genéticas (interespecífica X intraespecífica) e a presença de “barcode gap”;
- Avaliar a relação da variação genética e a localidade geográfica das amostras.

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 Obtenção de material**

As plantas utilizadas para este estudo são oriundas de coleções de herbários de instituições colaboradoras (Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RB, Instituto de Botânica - SP e Universidade de Brasília - UB) e de coletas de campo recentes. Do material de herbário, foram selecionadas as amostras mais recentes possíveis (coletadas a partir de 1991) para aumentar as chances de sucesso na extração do DNA. E para a obtenção de amostras frescas foram realizadas duas coletas de campo: uma no Espírito Santo, com o domínio do bioma Mata Atlântica e outra no Rio Grande do Sul, onde foram abrangidos os biomas Mata Atlântica e Pampa. Os locais de coletas das expedições de campo foram selecionados com base na diversidade de espécies do gênero alvo para cada bioma brasileiro e também para abranger a maior quantidade e diversidade de locais possíveis. As amostras foram obtidas segundo o método de caminhamento (Filgueiras et al. 1994), parte de cada amostra coletada foi colocada em sílica para realizar, posteriormente, a extração de DNA e para herborização

utilizou-se as orientações de Yano (1984). O material coletado está depositado no herbário da Universidade de Brasília (UB).

De um a 13 espécimes foram amostrados para cada espécie, de acordo com a disponibilidade de material (considerando o material herborizado e coletas de campo). Foram submetidas aos processos de extração e amplificação de DNA, 24 das 27 espécies de *Metzgeria* que ocorrem no Brasil. As três espécies faltantes, que não foram encontradas dentre as amostras analisadas (de empréstimos de herbário e das coletas realizadas), são: *Metzgeria acuminata* Steph., *Metzgeria adscendens* Steph. e *Metzgeria saccata* Mitt..

*Metzgeria acuminata* é registrada apenas para São Paulo (duas coletas) e Rio Grande do Sul (uma coleta). *Metzgeria adscendens* no Brasil está restrita à três localidades da Mata Atlântica do sudeste/sul do país, sendo que estas regiões estão dentro ou próximas de centros urbanos que sofrem pressão antrópica e não são protegidas por unidades de conservação (Costa 2008). *Metzgeria saccata* ocorre, no Brasil, no estado de São Paulo em domínio de Mata Atlântica (Ellis et al. 2016) e foi registrada apenas por uma coleta até o momento. Segundo Costa (2008), com relação ao status de conservação destas espécies, *M. acuminata* e *M. adscendens* apresentam dados deficientes ou seja, não existem os dados adequados de abundância e/ou distribuição para fazer uma avaliação, direta ou indireta, do risco de extinção do táxon (IUCN 2012) e para *Metzgeria saccata*, que é considerada rara (Ellis et al. 2016), não foi avaliada, ainda, com relação aos critérios da IUCN.

### **3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

A extração de DNA seguiu o protocolo de Doyle & Doyle (1987), com modificações de Câmara (2010). Baseado nos trabalhos que utilizaram dados moleculares para *Metzgeria* - Crandall-Stotler et al. (2005), Fuselier et al. (2009) e Fuselier et al. (2011) - foram selecionados os marcadores moleculares *trnL-F*, *trnG* e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) para serem

testados como ferramentas no auxílio da identificação de *Metzgeria*. Estas três regiões foram escolhidas por terem apresentado capacidade para resolução dos clados nos estudos de Forrest et al. (2006), Fuselier et al. (2009) e Fuselier et al. (2011) e também baseado nos resultados obtidos pelo projeto de DNA barcode holandês.

A amplificação foi feita segundo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Faloona 1987) e os *primers* utilizados para a amplificação das regiões de interesse estão listados na tabela 1. Quando necessário, os amplicons foram gerados em duas partes separadamente, utilizando dois pares de *primers* distintos.

O protocolo padrão de PCR utilizado foi: para 50 µl de solução, contendo 5 µl de Mg buffer, 5µl MgCl<sub>2</sub>, 2µl BSA, 4µl dNTP mix, 0.5µl Taq polimerase, 2,5µl de cada *primer* (10 µM), 2 µl de DNA e 26,5 µl de água Milli-Q.

A amplificação por PCR ocorreu em 35 ciclos. Cada ciclo formado por 30 segundos a 95°C, 45 segundos com temperatura de acordo com a temperatura de anelamento de cada *primer* (Tabela 2) e 1 minuto a 72°C. O ciclo inicial de 95°C tem duração de 1 minuto e a extensão final de 72°C por 5 minutos. A extração e amplificação foram feitas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília e a purificação e o sequenciamento foram realizados pela MacroGen Inc. (Coréia).

Também foram obtidas do Genbank três sequências de duas espécies de *Metzgeria* coletadas no Brasil, são elas: *Metzgeria leptoneura* (códigos: GQ336215 – *trnLF* e GQ335648 – *ITS2*) e *Metzgeria aurantiaca* (código: HQ342635 – *trnLF*).

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para amplificação das regiões *trnL-trnF*, *trnG* e ITS.

<b>Região <i>trnL-trnF</i></b>			
Primers	Direção	Sequência 5'-3'	Referência
<i>trnLF-C</i>	Foward	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al. 1991
<i>trnLF-D</i>	Reverse	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al. 1991
<i>trnLF-E</i>	Foward	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al. 1991
<i>trnLF-F</i>	Reverse	ATITGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al. 1991
<i>trnLF-Cm</i>	Foward	CGAAATTGGTAGACGCTGCG	Frey et al. 1999
<i>trnLF-Fm</i>	Reverse	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Frey et al. 1999
<b>Região <i>trnG</i></b>			
Primers	Direção	Sequência 5'-3'	Referência
<i>trnG-A</i>	Reverse	ACCCGCATCGTTAGCTTG	Pacak & Szweykowska-Kulińska 2000
<i>trnG-B</i>	Foward	GCGGGTATAGTTTAGTGG	Pacak & Szweykowska-Kulińska 2000
TRNR22R	Reverse	CTATCCATTAGACGATGGACG	Nagalingum et al. 2007
<b>Região ITS</b>			
Primers	Direção	Sequência 5'-3'	Referência
Bryo18SF	Foward	GGTGAAGTTTTTCGGATCGCG	Hartmann et al. 2006
Bryo26SR	Reverse	AGATTTTCAAGCTGGGCT	Hartmann et al. 2006
Bryo5.8SF	Foward	GACTCTCAGCAACGGATA	Hartmann et al. 2006
Bryo5.8SR	Reverse	TGCGTTCATCGTTGC	Hartmann et al. 2006
18-antF	Foward	GGAAGGATCATTGCACACACAA	Hedenäs 2008
26-antR	Reverse	TGCTTAAACTCAGCGGGTAGTCT	Hedenäs 2008
18SF	Foward	GAACCTTATCGTTTAGAGGAAGG	Rydin et al. 2004
26SR	Reverse	CCGCCAGATTTTCACGCTGGGC	Rydin et al. 2004
Pisa1	Foward	CCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTTTTTCG	Pisa et al. 2013
Pisa2	Reverse	GCTGGGCTCTTTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	Pisa et al. 2013
18F	Foward	GGAAAGAGAAGTCGTAACAAGG	Stech & Frahm 1999
25R	Reverse	TCCTCCGCTTAGTGATATGC	Stech & Frahm 1999

**Tabela 2.** Temperaturas de anelamento para os *primers* das regiões *trnL- trnF*, *trnG* e ITS.

Par de <i>primers</i> utilizados	Temperatura de anelamento
Região <i>trnL- trnF</i>	
<i>trnLF-C</i> / <i>trnLF-F</i>	48°C e 55°C
<i>trnLF-Cm</i> / <i>trnLF-Fm</i>	47°C, 49°C e 50°C
<i>trnLF-C</i> / <i>trnLF-D</i>	50°C
<i>trnLF-E</i> / <i>trnLF-F</i>	53°C
<i>trnLF-E</i> / <i>trnLF-Fm</i>	48°C
Região <i>trnG</i>	
<i>trnG-B</i> / <i>trnG-A</i>	45°C e 50°C
<i>trnG-B</i> / TRNR22R	42°C
Região ITS	
Bryo18SF / Bryo26SR	48°C e 54°C a 58°C
18-antF / 26-antR	47°C, 49°C, 51°C e 53°C
Pisa1 e Pisa2	58°C e 59°C
18SF / 26SR	48°C a 50°C
18-antF / Bryo5.8SR	54°C
Bryo5.8SF / 26-antR	51°C

### 3.3 Análise de dados

As sequências geradas neste estudo foram combinadas com aquelas disponíveis em estudos anteriores: Fuselier et al. (2009) e Fuselier et al. (2011), além de outras disponíveis no Genbank e as sequências geradas por este trabalho ainda estão sendo depositadas no GenBank (Anexo 2).

As sequências (amplicons) foram editadas e montadas no Geneious v. 9.1.8 (Kearse et al. 2012), sendo alinhadas utilizando o CLUSTALX 2.1 (Higgins & Sharp 1988) e ajustes, por comparação visual, foram realizados no PhyDE v. 0.9971 (Müller et al. 2006). As análises de Máxima Parcimônia foram realizadas no PAUP\* v.4.0a159 (Swofford 2002), as de Máxima Verossimilhança no RAxML v. 8 (Stamatakis 2014) e as análises Bayesianas no Mr Bayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). Os modelos de evolução foram obtidos por meio do

JModeltest 2.1.7 (Guindon & Gascuel 2003, Darriba et al. 2012), para as análises de Verossimilhança e Bayesiana.

O suporte da árvore filogenética foi avaliado através do bootstrap não paramétrico (Felsenstein 1985) com 1.000 repetições para Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança. Para estas análises, foram considerados ramos bem suportados aqueles que em que foi obtido valor de bootstrap  $\geq 70$  (Fazekas et al. 2008, Chen et al. 2013, Hassel et al. 2013, Stech et al. 2013, Lang et al. 2014, Feldberg et al. 2016).

Para as inferências Bayesianas foram feitas duas corridas paralelas de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 5 milhões de gerações, uma árvore foi amostrada a cada 1000 gerações. As primeiras 25% das árvores foram descartadas como “*burn-in*”. O suporte das árvores filogenéticas geradas a partir de Inferência Bayesiana foi avaliado através de probabilidades posteriores e considerados significantes os valores  $\geq 0.95$  (Stech et al. 2013, Lewis et al. 2014, Feldberg et al. 2016, Bączkiewicz et al. 2017).

Os cálculos das variações intraespecífica e interespecífica, entre todas as sequências, foram realizados pelo software PAUP\* v.4.0a159 (Swofford 2002) utilizando o modelo “Kimura 2-parameter” (Kimura 1980). Este modelo é utilizado para calcular as distâncias entre as sequências de nucleotídeos, transformando um alinhamento de múltiplas sequências de DNA em uma matriz de distância. As máximas distâncias intraespecíficas foram plotadas contra as mínimas distâncias interespecíficas para todos os possíveis pares de espécies para inferir a presença de uma lacuna entre estes valores (“barcode gap”) (Stech et al. 2013, Lang et al. 2014). Ou seja, para averiguar se existe a sobreposição (“barcode gap” negativo) ou não (“barcode gap” positivo) entre os valores intraespecíficos e interespecíficos.

As matrizes de distância geradas foram utilizadas para a construção das árvores de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), que também foram realizadas utilizando o PAUP\* v.4.0a159 (Swofford 2002). O sucesso na discriminação das espécies foi definido a partir dos

resultados das análises de Neighbor Joining considerando apenas as espécies em que houve o sucesso de sequenciamento de mais de uma amostra por espécie. Foram considerados os cladogramas monofiléticos que apresentaram bootstrap  $\geq 70\%$  (Hartmann et al. 2006, Hassel et al. 2013, Vivas et al. 2014). Este valor foi considerado para determinar o sucesso de discriminação das espécies.

O *outgroup* escolhido para as análises, *Aneura pinguis* (L.) Dumort. e *Lobatiriccardia lobata* (Schiffner) Furuki, foi baseado em Crandall-Stotler et al. (2005) e Forrest et al. (2006). As análises moleculares foram realizadas com cada marcador individualmente e em combinação e nas análises combinadas foram utilizadas apenas as amostras (mesmo *voucher*) que possuem sequência para os três marcadores.

### **3.4 Caracteres Morfológicos**

Em cada espécime de *Metzgeria* foram observadas características morfológicas consideradas importantes para a identificação das espécies, de acordo com Costa (2008), como, por exemplo: largura do talo, número de células da costa à margem, número de células da costa à medula, tamanho das células, verrucosidade da cutícula, tipo e disposição dos rizóides no talo, gemas e sexualidade.

A partir das informações morfológicas para a família, obtidas por Costa (2008) pela identificação das amostras utilizadas neste estudo, foi realizada a comparação dos resultados moleculares com as identificações obtidas através dos caracteres morfológicos considerados importantes para a identificação das espécies (Costa 2008). Considerando as comparações realizadas, foi avaliado se a quantidade de espécies discriminadas geneticamente corresponde as encontradas morfológicamente.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Características dos marcadores moleculares, sucesso de amplificação e sequenciamento

Foram amplificadas e sequenciadas, com alta qualidade, todas as regiões propostas neste estudo e, no total, foram geradas 80 seqüências do marcador *trnLF*, 79 do ITS e 44 do *trnG*, totalizando 203 novas seqüências de *Metzgeria* (os *vouchers* são apresentados no anexo 2).

Considerando o sucesso de amplificação das amostras herborizadas (Tabela 3), o ITS2 foi o que apresentou maior taxa de sucesso (91.66%), seguido do ITS1 (88.88%), do *trnLF* (57.85%), do *trnG* (47.05%) e do ITS total (38.84%). O *trnG* apresentou a maior taxa de sucesso de sequenciamento (100%) para as amostras herborizadas, seguido do *trnLF* (97.14%), do ITS1 (96.87%), do ITS2 (87.87%) e do ITS (82.97%).

Já para as amostras oriundas das expedições de campo realizadas recentemente (material coletado em 2016 e 2017) (Tabela 3), que foram submetidas a extração de DNA antes de passarem pelo processo de herborização (não herborizadas), o marcador que apresentou maior taxa de sucesso na amplificação foi o *trnG* (92.85%), seguido por ITS e *trnLF*, que apresentaram a mesma taxa de amplificação (86.66%). O sucesso de sequenciamento foi de 100% para os três marcadores testados (ITS, *trnG* e *trnLF*) para estas amostras.

**Tabela 3.** Taxa de sucesso de amplificação e sequenciamento de DNA para das amostras herborizadas e não herborizadas de *Metzgeria* do Brasil.

Marcador molecular	Sucesso de amplificação do material herborizado (%)	Sucesso de amplificação do material não herborizado (%)	Sucesso de sequenciamento do material herborizado (%)	Sucesso de sequenciamento do material não herborizado (%)
ITS	38.84	86.66	82.97	100
ITS1	88.88	*	96.87	*
ITS2	91.66	*	87.87	*
<i>trnG</i>	47.05	92.85	100	100
<i>trnLF</i>	57.85	86.66	97.14	100

\* Não foi testado, já que o ITS total apresentou alto sucesso de amplificação e sequenciamento.

Foram obtidas sequências de 21 das 24 espécies de *Metzgeria* estudadas. Amostras de *Metzgeria agnewiae* Kuwah., *Metzgeria hegewaldii* Kuwah. e *Metzgeria lechleri* Steph. foram submetidas aos processos de extração e amplificação de DNA, porém, sem sucesso. Para *Metzgeria agnewiae* houve o sucesso na amplificação e sequenciamento de uma única amostra, e apenas do marcador ITS1.

Para *Metzgeria aurantiaca* Steph., *M. consanguinea* Schiffn., *M. furcata*, *M. herminieri* Schiffn., *M. liebmanniana* Lindenb. & Gottsche e *M. rufula* Spruce houve sucesso na amplificação e sequenciamento de apenas uma amostra, considerando os marcadores *trnL-F* e ITS (Figura 1). Dentre estas seis espécies houve sucesso na amplificação e sequenciamento apenas da amostra de *Metzgeria rufula* para o marcador *trnG*. Todos os espécimes das espécies citadas acima são plantas que passaram por processo de herborização.

As características dos marcadores moleculares amplificados, *trnL-trnF*, *trnG* e ITS, são apresentadas na Tabela 4. O ITS1 foi a região do DNA que apresentou a maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos (37.82%), seguido do *trnG*, do ITS, ITS2 e *trnL-F*.

**Tabela 4.** Características dos marcadores *trnL-trnF*, *trnG* e ITS1, ITS2 e ITS e das matrizes combinadas analisados nas análises filogenéticas e Neighbor Joining.

Características	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnG</i>	ITS1	ITS2	ITS	<i>trnL-trnF</i> + <i>trnL-trnF</i> +	
						ITS	<i>trnG</i> + ITS
<b>Taxa incluídos</b>	85	49	80	81	78	76	43
<b>Tamanho da matriz</b>	529	736	476	404	880	1409	2145
<b>Sítios variáveis (%)</b>	34.78%	46.05%	49.78%	36.63%	43.06%	30.74%	23.68%
<b>Sítios parcimoniosamente informativos</b>	127	238	180	113	293	416	658
<b>Sítios parcimoniosamente informativos (%)</b>	24%	32.34%	37.82%	27.98%	33.29%	29.52%	30.67%

As amostras oriundas das expedições de campo recentes, que não passaram pelo processo de herborização, obtiveram maior sucesso de amplificação (acima de 86%) para as três regiões. Com base no presente estudo e em trabalhos realizados com outras briófitas (Liu et al. (2010), Bell et al. (2012), Bączkiewicz et al. (2017) e Yodphaka et al. (2018)), foi possível inferir que existe um alto sucesso na amplificação e sequenciamento de regiões de DNA de plantas que não foram herborizadas.

No entanto, as taxas de amplificação das amostras herborizadas foram, de forma geral, consideradas baixas (abaixo de 56%) para três regiões de DNA utilizadas (*trnL-F*, *trnG* e ITS total). Isso pode ser explicado pelo fato destas amostras serem oriundas de herbários que utilizam (ou utilizaram) métodos de expurgo da coleção. Além disso, o DNA de amostras herborizadas sofre processo de degradação (Staats et al. 2011, Drábková 2014, Weiß et al. 2016, Shepherd 2017).

Foi feita a comparação entre as taxas de sucesso de amplificação e sequenciamento deste estudo e outros trabalhos realizados com briófitas: Liu et al. (2010), Bell et al. (2012), Bączkiewicz et al. (2017) e Yodphaka et al. (2018). As porcentagens dos trabalhos mencionados se referem ao DNA extraído de amostras desidratadas em sílica gel ou depositadas em herbário recentemente e os valores obtidos, no presente estudo são similares a estes trabalhos citados acima. Os resultados mostram a importância de obter material fresco ou que não tenha passado pelo processo de herborização (ou recentemente depositados em herbário), para facilitar a amplificação e sequenciamento de espécimes de hepáticas. Sendo um fator a se considerar quando o objetivo for a realização de estudos moleculares com este grupo de planta.

Também foi realizada a comparação entre as porcentagens de sítios parcimoniosamente informativos dos marcadores moleculares *trnL-F*, *trnG*, ITS1, ITS2 e ITS total (Tabela 5) com outros trabalhos também realizados com briófitas, como os de

Bączkiewicz et al. (2017), Bell et al. (2012), Fuselier et al. (2009), Fuselier et al. (2011), Liu et al. (2010) e Yodphaka et al. (2018).

**Tabela 5.** Comparação entre as porcentagens de sítios parcimoniosamente informativos dos marcadores moleculares *trnL-F*, *trnG*, ITS1, ITS2 e ITS total de estudos realizados com briófitas. O hífen (-) indica que não foi possível realizar a comparação, pois as respectivas regiões de DNA não foram analisadas nos respectivos estudos.

<b>Sítios parcimoniosamente informativos</b>	<b><i>trnL-F</i></b>	<b><i>trnG</i></b>	<b>ITS1</b>	<b>ITS2</b>	<b>ITS total</b>
<b>Este estudo</b>	24%	32.34%	37.82%	27.98%	33.29%
<b>Bączkiewicz et al. (2017)</b>	14.77%	-	31.15%	30.50%	25.90%
<b>Bell et al. (2012)</b>	-	-	11.4%	15.4%	-
<b>Fuselier et al. (2011)</b>	16.84%	20.33%	-	-	-
<b>Fuselier et al. (2009)</b>	13.23%	13.17%	-	13.53%	-

Para o marcador *trnL-F* são observadas altas taxas de sucesso de amplificação e sequenciamento. Yodphaka et al. (2018) obtiveram sucesso de 86% na amplificação e de 74% no sequenciamento desta região. Já no estudo de Liu et al. (2010) as taxas de sucesso de amplificação e sequenciamento foram acima de 97% e Bączkiewicz et al. (2017) obtiveram 100% de sucesso na amplificação e sequenciamento para este marcador. No presente estudo (considerando as amostras não herborizadas), o *trnL-F* apresentou sucesso de amplificação de 86% e de sequenciamento de 100%, valores bem parecidos com os encontrados na literatura. Estes resultados mostram que esta é uma região do DNA em que é fácil de se obter a sequência, uma das premissas do DNA barcode. Porém, analisando a quantidade de sítios informativos, esta foi a região que apresentou a menor porcentagem quando comparada com os outros marcadores (Tabela 5), como é observado nos trabalhos de Bączkiewicz et al. (2017), Fuselier et al. (2011) e no presente estudo.

O *trnL-F* é uma das regiões do DNA mais comumente utilizadas em estudos filogenéticos de briófitas (Stech & Quandt 2010) e foi observado, no presente estudo e por Yodphaka et al. (2018), que o *trnL-F* é uma região facilmente amplificada e sequenciada, mas que apresenta capacidade limitada em distinguir espécies (Figura 2). Porém, quando analisada

juntamente com outras regiões, contribui para o aumento no sucesso de discriminação das espécies.

Já, quanto ao *trnG*, considerando a variação genética, facilidade de amplificação e sequenciamento e somada a capacidade de discriminar espécies aqui observadas, o *trnG* se mostra um marcador molecular promissor como DNA barcode para *Metzgeria*. Além disso, sua crescente utilização, em estudos moleculares em diversos níveis taxonômicos de briófitas, indica que esta região tem potencial para se tornar ainda mais popular em estudos filogenéticos (Stech & Quandt 2010).

O *trnG* é uma região que apresenta um nível relativamente alto de variabilidade em briófitas (Stech & Quandt 2010), e que, nos trabalhos de Pacak & Szweykowska-Kulińska (2000), Pedersen & Hedenäs (2003), Fuselier et al. (2011) e no presente estudo, apresentou maior variação genética que o *trnL-F*. Aparentemente é uma região muito mais fácil de ser amplificada com *primers* universais (pelo menos em angiospermas) (Stech & Quandt 2010) e esta característica foi observada no presente estudo, pois o sucesso de amplificação e sequenciamento (amostras não herborizadas) foi de 100% para ambos.

Em relação ao ITS1, os dados observados mostram que esta é uma região promissora para ser utilizada em trabalhos moleculares por apresentar facilidade de obtenção de sequências de DNA, por ser uma região informativa e com alta capacidade para discriminar espécies. No presente estudo, o ITS1 apresentou sucesso de amplificação de 88.88% (realizada apenas com amostras herborizadas), valor próximo ao encontrado por Yodphaka et al. (2018) (85.26%). Já o sucesso no sequenciamento desta região no presente estudo foi maior (96.87%) do que o obtido por Yodphaka et al. (2018) (46.46%) para esta mesma região. Bączkiewicz et al. (2017) também analisaram este marcador separadamente e obtiveram 100% de sucesso de amplificação e sequenciamento. Estes resultados mostram que esta é uma região curta (476 pares de bases) e de fácil obtenção de sequências de DNA de boa qualidade,

pondendo ser utilizada com facilidade em estudos em que não são possíveis obter amostras frescas.

Dentre os marcadores moleculares analisados neste estudo, o ITS1 foi o que apresentou a maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos (Tabela 5), isso também é observado por Bączkiewicz et al. (2017). Já, no trabalho realizado por Bell et al. (2012), o ITS1 foi a segunda região com maior número de sítios parcimoniosamente informativos (Tabela 5). Além disso, o ITS1, quando avaliado separadamente, foi o marcador que apresentou a maior capacidade de discriminar as espécies deste estudo (57%) (Figura 2). O ITS1, separadamente, é uma região pouco avaliada em estudos com briófitas. Geralmente, quando essa região nuclear é utilizada, são apresentados resultados e informações referentes ao ITS total (ITS1-5.8S-ITS2).

O marcador molecular ITS2 foi a região que apresentou a maior taxa no sucesso de amplificação para material herborizado neste estudo (91.66%) e também mais de 87% das amostras foram sequenciadas com sucesso. Esses valores são maiores dos que os obtidos por Bell et al. (2012), Liu et al. (2010) e Yodphaka et al. (2018) e um pouco inferiores aos obtidos por Bączkiewicz et al. (2017), no qual 100% das amostras foram amplificadas e sequenciadas com sucesso. Esses resultados mostram, em geral, que o ITS2 é uma região de fácil obtenção da sequência e, além disso, essa foi a região mais curta dentre todas as analisadas (no presente estudo: 404 pares de bases) e isso também foi observado nos trabalhos de Bączkiewicz et al. (2017) e Fuselier et al. (2009). Sendo essas características (fácil amplificação/sequenciamento e ser uma região curta) primordiais em estudos de DNA barcode.

O ITS2 apresentou 27.98% dos sítios parcimoniosamente informativos, valor próximo ao encontrado por Bączkiewicz et al. (2017) (Tabela 5). Também foi observado que este marcador apresentou capacidade para discriminar metade das espécies amostradas neste estudo. Também é possível observar que o ITS2 é uma região promissora para estudos de

DNA barcode por apresentar algumas das características essenciais para este tipo de investigação. Além disso, esta é uma região bastante utilizada em trabalhos com *Metzgeria*, de forma que existem várias sequências disponíveis no Genbank (cerca de 145) que podem ser utilizadas em estudos moleculares deste grupo.

Com a amplificação da região do ITS em duas partes (ITS1 e ITS2) houve o aumento do sucesso na amplificação deste marcador para as amostras herborizadas, isso foi feito após a tentativa e falha em amplificar o ITS total (ITS1-5.8S-ITS2).

O ITS total (ITS1-5.8S-ITS2) apresentou alto sucesso de amplificação e sequenciamento de DNA, 86.66% e 100%, respectivamente (esses valores correspondem aos resultados obtidos com as amostras frescas neste estudo). E, no caso do sucesso de sequenciamento, foi maior do que o obtido por Bell et al. (2012) (76%).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a região do ITS total é de fácil amplificação e sequenciamento (considerando as amostras frescas) e que, no caso das amostras herborizadas, mesmo que o sucesso de amplificação tenha sido de 38.84%, o sucesso de sequenciamento foi alto (82.97%), mostrando que é um marcador viável de se utilizar em estudos moleculares mesmo quando forem obtidas apenas amostras oriundas de herbário.

Além disso, o ITS total foi a segunda região com a maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos (33.29%) neste estudo e, assim como observado no estudo de Bączkiewicz et al. (2017), o ITS total apresentou maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos que os marcadores plastidiais. Esta região apresentou 57% da capacidade de discriminar as espécies aqui estudadas, sendo, juntamente com o ITS1, os marcadores moleculares que apresentaram maior sucesso na discriminação de espécies de *Metzgeria*. Além de apresentar características fundamentais para ser utilizado em estudos de DNA barcode, o ITS total é um dos marcadores moleculares que mais possuem sequências

disponíveis no Genbank para Marchantiophyta (Stech & Quandt 2010), facilitando os trabalhos moleculares, de forma geral, com este grupo.

Com relação a capacidade informativa dos marcadores moleculares, o ITS2 foi a região do DNA mais informativa nos trabalhos de Bell et al. (2012) e Fuselier et al. (2009). Já no estudo realizado por Fuselier et al. (2011) a região mais informativa foi o *trnG*. Considerando o presente estudo e o de Bączkiewicz et al. (2017), onde foi possível comparar as quatro regiões utilizadas (*trnL-F*, *trnG*, ITS1 e ITS2), a região que foi mais informativa foi ITS1. É possível perceber, pelos trabalhos analisados e pelo presente estudo, que as regiões do *trnG* e do ITS (em parte ou total) são informativas e polimórficas sendo potenciais regiões para uso como DNA barcode.

#### **4.2 Análises filogenéticas, Neighbor Joining e considerações morfológicas**

Análises de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e Neighbor Joining foram realizadas com os marcadores moleculares *trnL-trnF*, *trnG* e ITS (ITS1 e ITS2) separados e combinados. A combinação das matrizes foi possível, pois as árvores individuais não mostraram incongruências. Na figura 1 é apresentado um cladograma obtido através de Inferência Bayesiana baseado nos marcadores moleculares *trnL-trnF* e ITS combinados. É possível observar o monofiletismo das *Mezgeria* que ocorrem no Brasil, corroborando com o monofiletismo do gênero como apresentado por Forrest et al. (2006) e Fuselier et al. (2011). Nas análises filogenéticas estão destacados 17 clados (Figura 1), dos quais 14 clados são bem suportados (valores de bootstrap superiores a 70 para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor Joining; e probabilidades posteriores superiores a 0.95 para Inferência Bayesiana).

Como o número de sequências obtidas referente ao marcador molecular *trnG* foi consideravelmente inferior às outras duas regiões do DNA utilizadas, os resultados obtidos

por este marcador são apresentados no anexo 1 e são comentadas juntamente com a apresentação de cada clado destacado da Figura 1.

Considerando os resultados obtidos nas análises filogenéticas (Figura 1) e de Neighbor Joining foi possível discriminar nove espécies de *Metzgeria* (baseado na análises do *trnL-F* e ITS; Figura 1) que ocorrem no Brasil. Foram elas: *Metzgeria brasiliensis*, *M. ciliata*, *M. convoluta*, *M. cratoneura*, *M. dichotoma*, *M. fruticola*, *M. psilocraspeda*, *M. scyphigera* e *M. uncigera*. Estas espécies foram discriminadas com base nos resultados moleculares obtidos e observando as características morfológicas das respectivas espécies descritas por Costa (2008).

As duas amostras de *Metzgeria scyphigera* A.Evans. compõem o clado F (76/72/0.99/78), como não houve sucesso na amplificação do *trnG* das duas amostras referentes à esta espécie, não foi possível fazer a comparação entre os resultados obtidos pelo *trnLF* e pelo ITS. *Metzgeria ciliata* Raddi formam um clado monofilético (clado H) bem suportado (75/86/0.97/82). Para o *trnG* obteve-se sucesso no sequenciamento de três das quatro amostras de *M. ciliata* (M61, M86 e M94) e esta mesma topologia foi observada para este marcador com baixo suporte (57/61/0.88/57).

O clado I (100/99/1/100) é composto pelas amostras de *Metzgeria brasiliensis*. Para esta espécie foram amplificadas as amostras M56 e M95 para o *trnG*, gerando um também um clado monofilético bem suportado com estas duas amostras. O mesmo ocorre com o clado J (100/99/1/100) e o clado L (99/99/1/100), formados por representantes de *Metzgeria cratoneura* e *Metzgeria convoluta*, respectivamente.

As amostras de *Metzgeria psilocraspeda* Schiffn. formam o clado N (100/55/1/100) e como grupo irmão está o clado O (100/97/1/94), formado por *Metzgeria dichotoma* (Sw.) Nees. Em relação ao *trnG*, foram sequenciadas as amostras M39, M57 e M62 (*M. psilocraspeda*) e M3 e M58 (*M. dichotoma*) e foi observada a mesma topologia citada acima

para estas espécies. Duas amostras de *Metzgeria fruticola* Spruce formam um clado bem suportado (clado Q) (100/99/1/100). Não foi possível observar se isso ocorre com o *trnG*, pois apenas uma amostra foi sequenciada (M127). O clado R (100/99/1/100) é formado por espécimes de *Metzgeria uncigera* A.Evans. e esta topologia também foi observada com o *trnG*.

Além das nove espécies de *Metzgeria* discriminadas (Figura 1), também foram discriminadas *Metzgeria aurantiaca*, *M. bahiensis*, *M. leptoneura* e *M. subaneura*. Totalizando 13 espécies circunscritas pelas regiões de DNA utilizadas neste trabalho, separadamente ou em conjunto. O clado M apresentou suporte de 74/71/0.96/72 nas análises de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV), Inferência Bayesiana (IB) e Neighbor Joining (NJ), respectivamente. Este clado é composto por uma amostra de *Metzgeria liebmanniana* e *M. aurantiaca*. Esta topologia também é encontrada nas análises realizadas com o *trnLF* e ITS separadamente. Porém, está disponível no GenBank uma sequência do marcador molecular *trnLF* de *Metzgeria aurantiaca* oriunda do Brasil, que quando adicionada à matriz e refeitas as análises, apenas com o *trnLF*, geram um clado bem suportado (94/96/1/93) composto pela amostra *Metzgeria aurantiaca* gerada neste estudo (M80) e pela *M. aurantiaca* disponível no GenBank (código: HQ342635) e a amostra de *Metzgeria liebmanniana* aparece parafilética à este clado formado pelas duas amostras de *M. aurantiaca*.

Portanto, a espécie *Metzgeria aurantiaca* foi uma espécie discriminada neste estudo, a partir de uma amostra de *M. aurantiaca* do Genbank (que não foi observada a morfologia neste estudo) e por espécime sequenciado neste estudo (M80) da região *trnL-F*. No espécime M80 são observadas as características morfológicas de *M. aurantiaca*, como, por exemplo, talo de um só tipo e plano, células da margem não diferenciadas com um rizóide por célula e células da lâmina verrucosas, além de outras características condizentes com a descrição desta

espécie feita por Costa (2008). Esta espécie apresenta caracteres morfológicos mais incomuns, como, por exemplo, a ocorrência de cutícula verrucosa nas células da lâmina, considerada rara em Metzgeriaceae. Esta característica foi observada em apenas oito das 57 espécies de *Metzgeria* que ocorrem no Neotrópico e é considerada uma boa característica taxonômica para estas espécies. *Metzgeria brasiliensis* é a espécie que mais se assemelha morfológicamente à *M. aurantiaca*, mas que são distintas, entre outras características, pelas células da margem não diferenciadas do restante da lâmina em *Metzgeria aurantiaca* e que em *M. brasiliensis* estas são diferenciadas (Costa 2008). A observação de caracteres morfológicos quantitativos que não se sobrepõem facilita a identificação da espécie, aumentando a chance da amostra do Genbank estar identificada corretamente. Não foi possível realizar estas mesmas análises com o marcador *trnG*, pois não houve sucesso na amplificação das amostras destas espécies.

*Metzgeria bahiensis* foi discriminada apenas com o marcador molecular *trnL-F*, pois não houve sucesso no sequenciamento das outras regiões do DNA propostas. Acrescentada das informações morfológicas observadas (como o talo ondulado, levemente convexo e densamente hirsuto; duas fileiras de células epidérmicas em ambas as superfícies e rizóides presentes na superfície ventral da lâmina), características que são similares ao que é descrito por Costa (2008), foi possível discriminar esta espécie.

O clado P (98/98/1/97) é composto por três espécimes identificados como *Metzgeria leptoneura* Spruce. Não é possível comparar esta topologia com o marcador *trnG*, pois houve o sequenciamento de apenas uma amostra desta espécie. No Genbank existe uma amostra identificada como *Metzgeria leptoneura* coletada no Brasil em que estão disponíveis sequências do *trnL-F* (código: GQ336215) e ITS2 (código: GQ335648). Nas análises realizadas com estes dois marcadores a amostra oriunda do Genbank não forma um clado monofilético com as amostras identificadas com *Metzgeria leptoneura* neste estudo. Como

não houve acesso à amostra do Genbank não foi possível confirmar a identificação da mesma. Então *M. leptoneura* foi considerada uma espécie discriminada considerando a amostragem deste trabalho.

Os espécimes de *Metzgeria leptoneura* são plantas que apresentam talo convexo a fortemente convexo, duas fileiras de células epidérmicas em ambas as superfícies (ventral e dorsal) e as células da margem não são diferenciadas, apresentando dois rizóides (falcados a fortemente falcados) por célula. Esta espécie apresenta características morfológicas em comum com outras espécies, como, por exemplo, com *M. albinea*. Segundo Costa (2008). *Metzgeria leptoneura* se diferencia de *M. albinea* por apresentar células mamilosas e os rizóides da margem e costa longos e fortemente falcados. No entanto, pela descrição de *Metzgeria albinea* os rizóides na margem e na superfície ventral da costa podem ser, ocasionalmente, falcados (Costa 2008). Ou seja, são características morfológicas bem variáveis dentro de cada espécie e que dificultam a identificação. Portanto, optou-se por não considerar a amostra do Genbank na avaliação de discriminação da espécie, pois esta pode estar identificada de forma equivocada e, como não se obteve acesso à esta amostra, não foi possível fazer nenhum tipo de análise relacionada à morfologia do espécime. Dessa forma, neste estudo considera-se que foi possível discriminar esta espécie baseado nas informações dos marcadores moleculares e das características morfológicas observadas considerando os espécimes analisados durante este estudo.

*Metzgeria subaneura* apresenta talo de dois tipos (atenuado e não atenuado), duas fileiras de células epidérmicas em ambas superfícies e um rizóide por célula da margem. Esta espécie foi discriminada nas análises combinadas do *trnG* + ITS e dos três marcadores moleculares juntos. As respectivas amostras desta espécie apresentam características morfológicas condizentes com as descritas por Costa (2008).

Não foi possível discriminar com os marcadores moleculares utilizados: *Metzgeria albinea*, *M. conjugata* e *M. myriopoda*. Acredita-se que a adição de outras regiões do DNA possa auxiliar a discriminação destas espécies e avaliar a ocorrência de espécies crípticas e/ou espécies novas. O clado B apresentou suportes e propabilidades posteriores de 96/99/1/97 para Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV), Inferência Bayesiana (IB) e Neighbor Joining (NJ), respectivamente. Sendo formado por cinco amostras de *Metzgeria albinea* Spruce. Esta mesma topologia foi observada nas análises realizadas com o *trnG* (96/98/1/97). Outras cinco amostras de *Metzgeria albinea* formam o clado D, mas sem suporte nas quatro análises. Além disso, mais três amostras desta mesma espécie, oriundas do Rio Grande do Sul, formam o clado E (70/72/0.99/72). Destas três amostras houve sucesso no sequenciamento de duas amostras: M130 e M136 para o marcador molecular *trnG* e estas duas amostras também formam um clado com 94/96/1/96 de suporte, congruente com os resultados observados no *trnLF* e ITS.

*Metzgeria albinea* é uma espécie polifilética, de acordo com os resultados observados, e que não foi possível discriminar com o uso das ferramentas moleculares utilizadas neste estudo. Todas as amostras analisadas apresentam morfologia similar à descrita por Costa (2008), como, por exemplo, talo convexo, duas fileiras de células epidérmicas em ambas superfícies, rizóides uniformes na margem de eretos a flexuosos (raramente falcados) e dois rizóides por célula. Não foi observada nenhuma característica morfológica que pudesse ser associada às diversas linhagens encontradas e, também, não foi possível analisar se existe alguma relação com fatores ecológicos, pois as informações dos *vouchers* são escassas neste sentido. Acredita-se que é necessário o uso de mais marcadores moleculares para testar o monofiletismo desta espécie e avaliar a possível existência de espécies crípticas ou se tratam-se de espécies distintas.

O clado A é composto pelas amostras de *Metzgeria conjugata*, porém este clado não é suportado em nenhuma das quatro análises realizadas e nem com os marcadores moleculares analisados separadamente. As amostras em que houve sucesso de amplificação e sequenciamento desta espécie para o *trnG* (Anexo 1) foram: M90, M91, M112, M118, M122, M123, M125 e M132. As análises realizadas com este marcador (Anexo 1) apresentaram topologia similar com o *trnL-F* e ITS, formando um clado com estas amostras, porém com baixo suporte (-/56/0.91/-). As topologias deste clado são congruentes quando observadas as análises com os marcadores moleculares separados e concatenados, porém com suporte baixo em todas as análises. Desta forma, não foi possível discriminar esta espécie baseado nos marcadores moleculares utilizados, porém estas amostras apresentam características morfológicas compatíveis com as descritas para *M. conjugata* por Costa (2008). Esta espécie foi identificada baseada apenas nos caracteres morfológicos descritos por Costa (2008), como, por exemplo, o talo não atenuado e convexo; dois rizóides por célula da margem e gemas raras, marginais e liguladas.

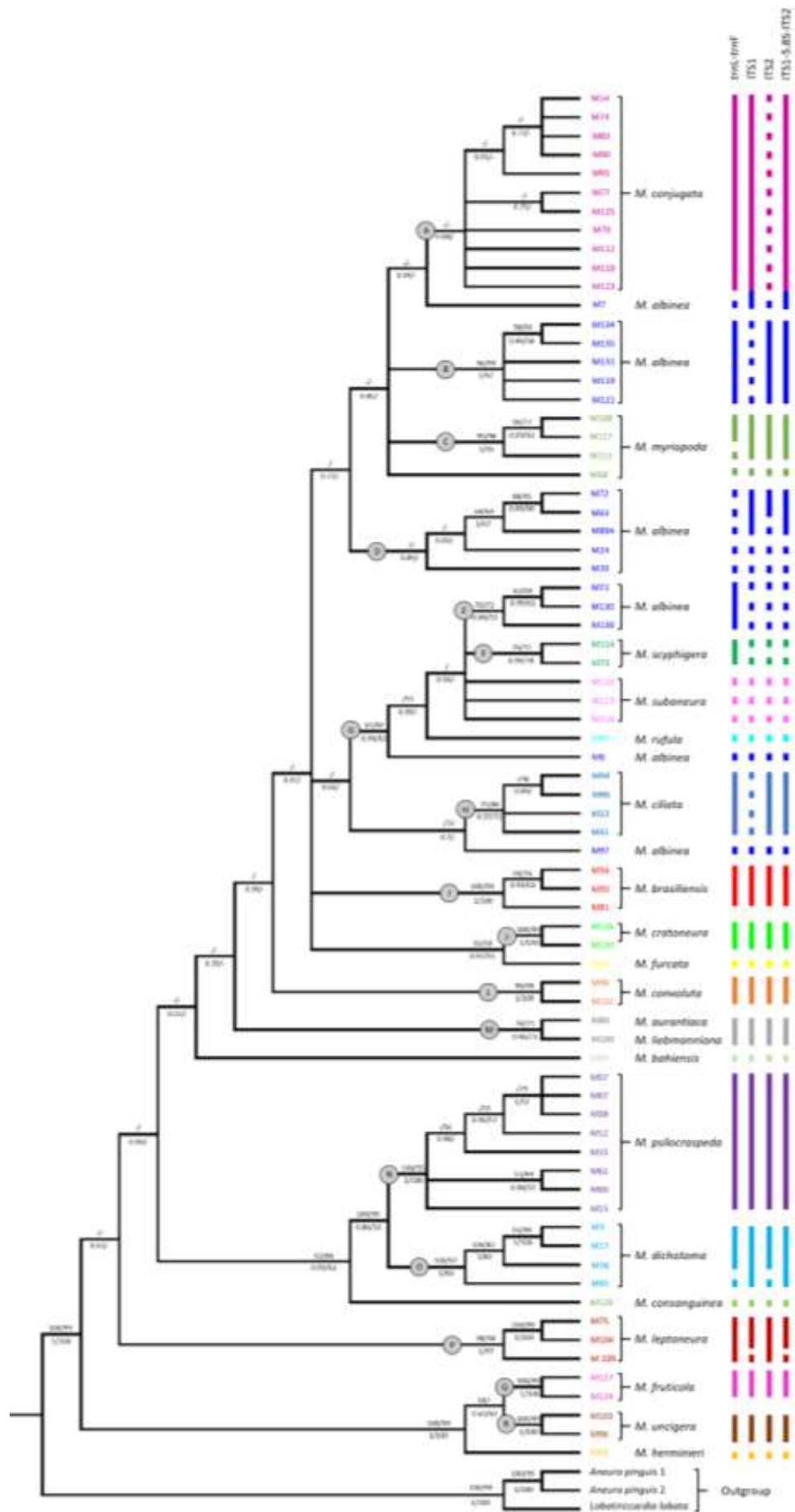
O clado C apresentou bom suporte (95/98/1/95) e é composto por três amostras de *Metzgeria myriopoda* Lindb. coletadas no Espírito Santo, no entanto, outra amostra identificada como *Metzgeria myriopoda* (M68), coletada no Paraná, não está neste clado. Quando analisadas as distâncias genéticas das três amostras do Espírito Santo, estas apresentam entre si valores entre zero a 0.001328 para o marcador ITS, 0.002755 para o *trnLF* e zero para o *trnG*. Quando estas três amostras são comparadas com a oriunda do Paraná (M68), os valores são: entre 0.010701 e 0.012045 para o ITS e entre zero e 0.002755 para *trnLF*. Não foi possível realizar esta última comparação com o *trnG*, pois não houve sucesso na amplificação da amostra M68 para este marcador. A distância genética entre a amostra do Paraná e as do Espírito Santo, observada no ITS, é maior do que quando comparadas apenas as amostras do Espírito Santo. Isso é um indício que existe divergência

genética entre as amostras do Paraná e as do Espírito Santo, sendo a localização geográfica uma possível explicação para o resultado observado. Porém, na análise de distância genética realizada com o *trnLF* observou-se que não houve aumento entre os valores obtidos considerando somente as plantas do Espírito Santo e quando consideradas as duas localidades, assim como foi encontrado com o ITS. Observou-se que não existe diferença genética no marcador *trnLF* que possa ser relacionada com as regiões geográficas. Na análise da morfologia destas amostras não foi observada nenhuma característica que as diferenciasse, sendo condizentes com a descrição de *Metzgeria myriopoda*. Portanto, baseado nos caracteres morfológicos e as informações genéticas obtidas, estas amostras foram denominadas *Metzgeria myriopoda*, mas as variações genéticas dos marcadores moleculares utilizados não foram suficientes para discriminar esta espécie das outras de *Metzgeria*.

*Metzgeria myriopoda* é morfológicamente semelhante à *Metzgeria conjugata* quando estéril, sendo diferenciada de *M. conjugata* por apresentar talo com grande quantidade de gemas marginais liguladas e em *M. conjugata* a presença de gemas é rara (Costa 2008). Neste trabalho também foi possível observar essas características morfológicas, o que facilitou a distinção destas duas espécies. As amostras de *M. myriopoda* e *M. conjugata* foram identificadas com base nas descrições e observações feitas por Costa (2008). Porém, os marcadores moleculares utilizados neste estudo não foram capazes de discriminar estas espécies.

Foi possível perceber que algumas características utilizadas para identificar e distinguir espécies são qualitativas, como o formato de talo e rizóides, e que a mesma espécie pode apresentar uma ampla variação nestes caracteres. Além disso, os caracteres quantitativos apresentam uma grande variação e sobreposição nas descrições das espécies de *Metzgeria*, de forma que várias destas espécies apresentam valores parecidos para estas características. Portanto, muitas vezes é necessário avaliar muitos caracteres morfológicos (que nem sempre

são encontrados nos materiais disponíveis, por exemplo: gemas e ramos sexuais), dificultando a identificação das amostras. Porém, com a junção dos dados morfológicos e dos moleculares, a distinção das espécies de *Metzgeria* do Brasil foi facilitada. Sendo assim, o uso de marcadores moleculares se mostra como uma ferramenta que auxilia na discriminação de espécies que são complexas do ponto de vista taxonômico.

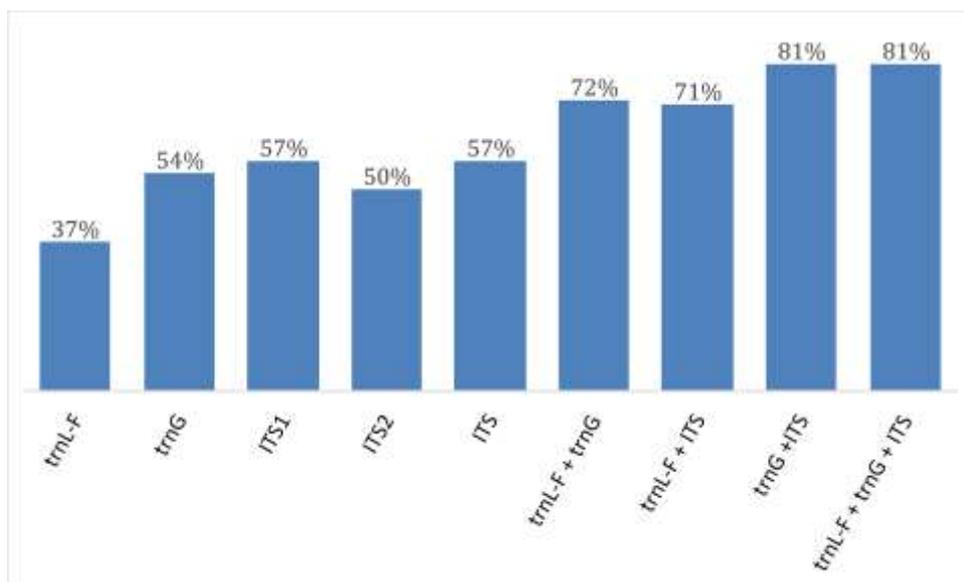


**Figura 1.** Cladograma obtido através de Inferência Bayesiana baseado nos marcadores moleculares *trnL-trnF* e ITS combinados. Os valores acima dos ramos referem-se ao bootstrap das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente, e os valores abaixo dos ramos referem-se às probabilidades posteriores da Inferência Bayesiana e valores de bootstrap das análises de Neighbor Joining, respectivamente. As barras apresentadas ao lado representam as topologias das análises bayesianas dos marcadores moleculares analisados separadamente. As barras contínuas indicam que as amostras referentes à elas formaram um grupo monofilético e as barras tracejadas indicam que os respectivos espécimes apresentaram-se parafiléticos para o respectivo marcador molecular analisado.

### 4.3 Sucesso de discriminação das espécies

As análises de Neighbor Joining foram realizadas com as mesmas amostras utilizadas para filogenia, com os marcadores separados e concatenados. Nestas análises também é possível observar topologias similares às encontradas nas análises filogenéticas. Os valores de bootstrap de cada clado da análise de Neighbor Joining são apresentados juntamente os com valores das análises filogenéticas na figura 1 e no anexo 1. Considerando os cladogramas formados nas análises de Neighbor Joining, com suporte igual ou superior à 70%, foi possível analisar o sucesso em discriminar espécies de *Metzgeria* do Brasil de cada marcador molecular utilizado, separados e concatenados (Figura 2).

As análises realizadas com cada marcador molecular, separadamente, mostram que o ITS1 apresentou maior sucesso em discriminar as espécies de *Metzgeria* (57%), o *trnG* discriminou 54% das espécies, seguido do ITS2 (50%) e *trnL-F* que discriminou 37% das espécies amostradas. Quando os marcadores foram concatenados, as combinações que apresentaram o maior sucesso em discriminar as espécies foram o *trnG*+ITS e *trnL-F*+*trnG*+ITS, ambas com 81% das espécies discriminadas. Seguido do *trnL-F*+*trnG* com 72% de sucesso na discriminação das espécies, do *trnL-F*+ITS com 71% e do ITS com 57% de discriminação das espécies de *Metzgeria* do Brasil (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagem do sucesso de discriminação de espécies de *Metzgeria* do Brasil.

Analisando a capacidade de discriminação de espécies no trabalho de Liu et al. (2010), que utilizou espécimes de briófitas, o *trnL-F* discriminou 86.84% das espécies amostradas e o ITS2 discriminou 71.05%. Já no estudo de Bell et al. (2012), dentre as regiões testadas como DNA barcoding para *Herbertus* (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS, ITS1 e ITS2), as que apresentaram maior capacidade de resolução e discriminação de espécies foi o ITS total (ou apenas o ITS2). Resultado similar é observado por Yodphaka et al. (2018), que avaliou seis regiões de DNA (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*, *psbA*, ITS1 e ITS2) como barcode para hepáticas epífilas, onde o ITS2 apresentou 100% de discriminação das espécies na análise de Neighbor Joining. Já o *trnL-F* apresentou 16.67% de capacidade discriminatória para o grupo analisado.

Porém, no estudo de Bączkiewicz et al. (2017), com três espécies de *Aneura*, não foram observadas essas diferenças na capacidade de discriminação dos marcadores moleculares utilizados. Todos os marcadores (*matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF* e ITS) apresentaram 100% de capacidade de discriminação das espécies analisadas. No presente estudo, o *trnG* e o ITS (tanto em parte quanto total) mostraram capacidade de discriminação das espécies amostradas acima de 50% e, dentre as regiões utilizadas, o *trnL-F* apresentou

menor capacidade de discriminação. A maior capacidade de discriminar espécies observadas neste trabalho foi obtida com a combinação das regiões *trnG* + ITS e *trnL-F* + *trnG* + ITS.

Na Tabela 6 são apresentadas as espécies em que se obteve mais de uma amostra por espécie, possibilitando as análises de discriminação (Neighbor Joining) das espécies. As análises foram realizadas com os marcadores moleculares separados e concatenados e os valores referem-se ao bootstrap dos clados monofiléticos das respectivas espécies (foram consideradas discriminadas as espécies com valor de bootstrap  $\geq$  a 70%).

**Tabela 6.** Lista de espécies de *Metzgeria*, com mais de um espécime amostrado, que foram discriminadas pelos marcadores moleculares *trnL-F*, *trnG*, ITS e suas combinações. Os valores referem-se ao bootstrap obtidos através das análises de Neighbor Joining (foram considerados os clados monofiléticos que apresentaram bootstrap  $\geq$  a 70%, as espécies em que foram observadas este parâmetro foram consideradas como discriminadas). O hífen indica que não foram feitas análises com as respectivas regiões por haver apenas uma amostra da respectiva espécie.

Espécie	<i>trnL-F</i>	<i>trnG</i>	ITS1	ITS2	ITS	<i>trnL-F</i> + <i>trnG</i>	<i>trnL-F</i> + ITS	<i>trnG</i> + ITS	<i>trnL-F</i> + <i>trnG</i> + ITS
<i>M. albinea</i>	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
<i>M. aurantiaca</i>	93	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bahiensis</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. brasiliensis</i>	87	99	96	95	99	100	99	100	100
<i>M. ciliata</i>	<50	57	<50	<50	62	82	71	87	95
<i>M. conjugata</i>	<50	<50	<50	<50	<50	57	<50	<50	<50
<i>M. convoluta</i>	86	100	84	75	96	100	99	100	100
<i>M. cratoneura</i>	65	96	99	94	99	99	99	100	100
<i>M. dichotoma</i>	<50	99	93	<50	93	100	94	100	100
<i>M. fruticola</i>	100	-	100	100	100	-	100	-	-
<i>M. leptoneura</i>	<50	-	74	74	77	-	96	-	-
<i>M. myriopoda</i>	<50	64	<50	<50	<50	71	<50	99	99
<i>M. psilocraspeda</i>	<50	93	99	86	99	97	100	100	100
<i>M. scyphigera</i>	<50	-	<50	<50	<50	-	77	-	-
<i>M. subaneura</i>	<50	57	<50	<50	<50	62	<50	75	75
<i>M. uncigera</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100

As espécies *Metzgeria brasiliensis*, *M. convoluta*, e *M. uncigera* foram espécies discriminadas com a utilização dos três marcadores moleculares separados e concatenados.

*Metzgeria aurantiaca* e *M. bahiensis* foram discriminadas nas análises realizadas com o *trnL-F*. *Metzgeria ciliata* foi discriminada nas análises realizadas com o *trnL-F* + *trnG*, *trnL-F* + *ITS*, *trnG* + *ITS* e *trnL-F* + *trnG* + *ITS*.

*Metzgeria cratoneura* apresentou bootstrap superior à 70% em todas as análises de Neighbor Joining, exceto com a região *trnL-F*. *Metzgeria dichotoma* foi discriminada em todas as análises de Neighbor Joining, com exceção das realizadas com o *trnL-F* e o *ITS2*. *Metzgeria fruticola* foi discriminada em todas análises realizadas (*trnL-F*, *ITS1*, *ITS2*, *ITS* e *trnL-F* + *ITS*). Da mesma forma que *Metzgeria leptoneura*, exceto pela análise com o *trnL-F*. *Metzgeria myriopoda* foi discriminada apenas nas análises com o *trnG* e suas combinações.

*Metzgeria psilocraspeda* foi discriminada em todas as análises realizadas, exceto na análise com o *trnL-F* separadamente. *Metzgeria scyphigera* foi discriminada apenas na análise do *trnL-F* e *ITS* concatenados. *Metzgeria subaneura* foi discriminada apenas nas análises do *trnG* + *ITS* e dos três marcadores concatenados.

As espécies *Metzgeria albinea* e *M. conjugata* não foram discriminadas em nenhuma das análises realizadas. Não foi obtido sucesso na amplificação do *trnG* para as espécies: *Metzgeria aurantiaca*, *M. bahiensis*, *M. fruticola*, *M. leptoneura* e *M. scyphigera*; portanto, não foi possível avaliar a discriminação destas espécies com a utilização deste marcador molecular e suas combinações como com as outras regiões analisadas neste estudo.

Foi observado que foi possível discriminar algumas espécies analisando apenas um um marcador molecular e que para outras espécies foi necessária a junção de dois ou três marcadores moleculares para que a espécie fosse discriminada. O nível de diversidade genética é determinado pela taxa de mutação (Kimura & Crow 1964, Kimura 1983), ou seja, a quantidade de mutações que ocorrem ao longo do tempo. As mutações naturais são geradas durante a evolução das espécies e, apesar de a taxa de mutação natural ser muito baixa (em fanerógamas), uma grande quantidade de mutações ocorrem durante uma longa história

evolutiva (Jiang & Ramachandran 2010). Além disso, é considerado que as taxas de mutação variam entre espécies (Hua & Bromham 2017). Desta forma, é possível compreender o motivo de serem necessárias diferentes quantidades de marcadores moleculares para discriminar espécies, como foi observado neste estudo. Provavelmente algumas espécies são mais antigas na história evolutiva, acumulando mais mutações em seu DNA, o que facilita a distinção entre espécies (com um marcador). Ao contrário de plantas mais recentes, que ainda possuem poucas mutações, dificultando a sua discriminação e necessitando da análise de mais marcadores para que sejam discriminadas.

#### **4.4 Distâncias genéticas e “barcode gap”**

Na tabela 7 são apresentados os valores das distâncias intraespecíficas e interespecíficas e não foi considerada *M. albinea*, por apresentar espécimes em distintas linhagens genéticas. Em todas as análises realizadas com os marcadores moleculares utilizados é possível observar que existe sobreposição entre as distâncias intraespecíficas e interespecíficas, não havendo um “barcode gap” entre estes valores. O “barcode gap” é a existência de um intervalo entre a distância máxima interespecífica e a distância mínima intraespecífica, ou seja, não havendo sobreposição (overlap) entre estes dois valores. A existência deste intervalo também foi analisada em outros estudos com briófitas que tinham como objetivo a delimitação de espécies, como, nos trabalhos realizados por Bączkiewicz et al. (2017), Lang et al. (2014), Liu et al. (2010) e Stech et al. (2013).

**Tabela 7.** Distâncias intraespecíficas e interespecíficas de *trnL-trnF*, *trnG*, ITS e matrizes combinadas de *Metzgeria* do Brasil. Na última linha é apresentado o overlap entre a distância máxima intraespecífica e a distância mínima interespecífica. Valores de *Metzgeria albinea* foram excluídos.

	<i>trnL-F</i>	<i>trnG</i>	<i>trnL-F + trnG</i>	ITS	ITS1	ITS2	<i>trnL-F + trnG + ITS</i>
<b>intra</b>	0 – 0.041548	0 – 0.027889	0 – 0.019015	0 – 0.043708	0 – 0.073662	0 – 0.034126	0 – 0.018832
<b>inter</b>	0 – 0.144315	0.006079 – 0.130132	0.005734 – 0.134364	0.001321 – 0.164736	0 – 0.233198	0 – 0.133863	0.008385 – 0.137104
<b>overlap</b>	0.041548	0.02181	0.013281	0.042387	0.073662	0.034126	0.010447

As distâncias genéticas médias das amostras de *Metzgeria albinea* com o *trnL-F* e ITS concatenados são apresentadas na tabela 8. Nesta tabela foram utilizados os valores da matriz concatenada (*trnL-F* e ITS) por esta apresentar o maior número de amostras de *M. albinea*, possibilitando um maior número de dados para serem analisados. É possível observar que a distância entre os clados e as amostras não ultrapassam 3%, como é proposto por Hebert et al. (2004) e Bączkiewicz et al. (2017) para considerar espécies distintas, mesmo se tratando de espécimes em linhagens distintas.

**Tabela 8.** Média das distâncias genéticas das amostras de *Metzgeria albinea* baseadas na matriz concatenada do *trnL-F* e ITS.

Clado/ amostra	M7	Clado B	Clado D	Clado E	M6
<b>Clado B</b>	0.016404	-			
<b>Clado D</b>	0.017704	0.013805	-		
<b>Clado E</b>	0.027544	0.024887	0.026458	-	
<b>M6</b>	0.023781	0.02434	0.028394	0.018444	-
<b>M97</b>	0.021897	0.017848	0.017653	0.0215921	0.022731

Na tabela 9 são apresentadas as distâncias intraespecífica e interespecífica de quatro espécies de *Metzgeria* incluídas neste trabalho: *Metzgeria fruticola*, *M. uncigera*, *M.*

*dichotoma* e *M. psilocraspeda*. Esta análise foi feita separadamente, pois estas espécies são bem discriminadas pelas análises filogenéticas e de Neighbor Joining e, além disso, é possível estabelecer relações filogenéticas entre elas. *Metzgeria dichotoma* é grupo irmão de *M. psilocraspeda* e *Metzgeria fruticola* está na mesma linhagem que *M. uncigera*. Apresentando estes valores é possível realizar uma comparação com a tabela 7 (onde foram incluídas todas as espécies, com exceção de *M. albinea*). Quando considerados os valores da tabela 7 (onde na maioria das espécies não foi possível estabelecer relações filogenéticas entre elas) é observado que não existe um “barcode gap” (“barcode gap” negativo), mas quando comparadas espécies com relações filogenéticas mais esclarecidas (Tabela 9) é observado que não existe sobreposição entre as distâncias intraespecíficas e interespecíficas, existindo um “barcode gap” entre elas (“barcode gap” positivo).

**Tabela 9.** Distâncias intraespecíficas e interespecíficas de *Metzgeria fruticola*, *M. uncigera*, *M. dichotoma* e *M. psilocraspeda* baseado nos marcadores moleculares *trnL-F*, *trnG* e ITS. O hífen (-) significa que não foi possível realizar essa comparação, pois não foi aplicada mais de uma amostra para a respectiva espécie.

<b>Espécies</b>	<b><i>trnL-F</i></b>	<b><i>trnG</i></b>	<b>ITS</b>
<i>M. fruticola</i> X <i>M. fruticola</i>	0.002747	-	0.002621
<i>M. uncigera</i> X <i>M. uncigera</i>	0	0	0.003918
<i>M. fruticola</i> X <i>M. uncigera</i>	0.076127	0.077812	0.100618
<b>overlap</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Espécies</b>	<b><i>trnL-F</i></b>	<b><i>trnG</i></b>	<b>ITS</b>
<i>M. dichotoma</i> X <i>M. dichotoma</i>	0.01275	0.027889	0.012011
<i>M. psilocraspeda</i> X <i>M. psilocraspeda</i>	0.006728	0.006796	0.007157
<i>M. dichotoma</i> X <i>M. psilocraspeda</i>	0.022513	0.049867	0.054739
<b>overlap</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Neste estudo, os marcadores analisados, separadamente e em conjunto, apresentam “barcode gap” negativo, ou seja, houve sobreposição entre os valores intraespecíficas e interespecífico para todas as regiões analisadas (Tabela 7). Não sendo possível estabelecer um valor de distância genética como parâmetro para distinguir as espécies amostradas.

Esta sobreposição de valores também ocorreu em algumas espécies de musgos (Bryophyta) estudados por Stech et al. (2013) e os autores estudam individualmente cada caso como, por exemplo, com *Racomitrium muticum* (Kindb.) Frisvoll e *Racomitrium pygmaeum* Frisvoll que apresentaram a sobreposição de valores, mas são facilmente distinguíveis pelos caracteres morfológicos.

Também foi observado por Yodphaka et al. (2018) a sobreposição das distâncias genéticas com o uso do *trnL-F* e do *psbA*. No entanto, o ITS2 e o *rbcL* apresentaram “barcode gap” positivo no trabalho mencionado, ou seja, não houve sobreposição entre os valores intraespecíficas e interespecífico. Foram consideradas regiões que apresentaram maior potencial para discriminação de espécies de hepáticas epífilas, levando em conta a abordagem do DNA barcode devido à universalidade de *primers*, sucesso no sequenciamento e alto poder discriminatório.

É importante lembrar que, no presente estudo, não ficaram claras as relações filogenéticas da maioria das espécies de *Metzgeria* do Brasil, mas quando comparadas apenas espécies com relações filogenéticas bem resolvidas (Tabela 9), é possível observar a existência de um “barcode gap” positivo com todos os marcadores moleculares utilizados.

No estudo de Stech et al. (2013), em que é possível observar que as relações filogenéticas entre as espécies de *Racomitrium* analisadas são bem resolvidas, observa-se a existência de “barcode gap” positivo nos marcadores plastidiais e “barcode gap” negativo no marcador nuclear (ITS). O mesmo é observado no estudo de Bączkiewicz et al. (2017), o “barcode gap” positivo foi detectado no *rbcL*, no *trnL-F*, na combinação dessas duas regiões e

em todas as combinações feitas com as regiões de cloroplasto e não foi detectado claramente o “barcode gap” com o ITS total, ITS1 e ITS2. Neste caso as relações filogenéticas entre as três espécies de *Aneura* também são bem resolvidas.

Portanto, é possível que a capacidade de discriminação de marcadores moleculares esteja relacionada à variação genética e a resolução filogenética que cada marcador apresenta em determinado grupo. De forma que quanto melhor estiverem estabelecidas as relações filogenéticas evolutivas em um grupo alvo de estudo, mais clara seria a discriminação de espécies devido ao “gap” que seria encontrado na comparação entre as distâncias genéticas.

É proposto como limiar entre espécies uma divergência genética de 2% ou 3% (Hebert et al. 2004, Bączkiewicz et al. 2017). Porém, os limiares de distância podem ser menores do que este proposto, como o observado no estudo de Stech et al. (2013) em que os valores foram inferiores a 1%, em alguns casos, pois se tratam de espécies próximas. No presente estudo, também foram observados baixos percentuais de divergência genética entre algumas espécies discriminadas, mas, ainda sim, foi possível distinguí-las com base nos resultados moleculares e características morfológicas.

Baseando-se nos estudos citados anteriormente e no presente estudo é possível observar que o ITS e/ou ITS2 são as regiões de DNA que apresentam maior capacidade de discriminação para as briófitas, sendo regiões com potencial para DNA barcode deste grupo de plantas.

#### **4.5 Variações genéticas e localidades geográficas**

Em quatro espécies de *Metzgeria* analisadas neste estudo foi possível observar que os marcadores moleculares utilizados apresentaram capacidade de discriminar amostras relacionadas à localidade em que foram coletadas. As espécies foram: *Metzgeria brasiliensis*, *M. dichotoma*, *M. leptoneura* e *M. myriopoda*. Em outros estudos filogenéticos também foi

possível associar as informações obtidas com resultados moleculares com as localidades geográficas de alguns espécimes estudados.

Heinrichs et al. (2013) reconstruíram a filogenia de *Lejeunea* (Porellales) com marcadores de DNA plastidiais (*trnL-trnF* e *rbcL*) e nuclear (ITS), utilizando o arcabouço filogenético para reconstruir a origem do gênero e inferir evidências sobre a dispersão deste grupo. Neste caso, as regiões de DNA utilizadas apresentaram árvores filogenéticas bem suportadas. Análises filogeográficas realizadas por Fuselier et al. (2009) com três espécies de *Metzgeria* foram baseadas em cinco regiões de DNA: *trnL*, *trnG*, *psbT*, *rpb2* e ITS2 e resultados preliminares indicaram que não houveram conflitos entre as análises realizadas com os genomas separados e em conjunto. As regiões plastidiais e nuclear foram informativas para resolver padrões filogeográficos que suportam linhagens distintas da Europa e da América do Norte.

Em outro estudo de filogeografia feito por Fuselier et al. (2011) com *Apomezteria* (sinonimizada para *Metzgeria* em 2009) foram utilizados o *trnL*, *trnG*, *psbT* e *rpb2* nas análises filogenéticas e filogeográficas. O *trnG* foi a região mais polimórfica dentre as quatro analisadas. Estes marcadores geraram árvores bem suportadas, contribuindo para as discussões taxonômicas e filogeográficas avaliadas.

Carter et al. (2017) investigaram a biogeografia e a delimitação de espécies de *Frullania* subgênero *Microfrullania* (Frullaniaceae, Marchantiophyta) do hemisfério sul, utilizando os marcadores moleculares: *trnL-F*, *trnG* e ITS. As análises filogenéticas dos dados concatenados apresentaram árvores com forte suporte dos ramos (com a exceção de um único clado) e o ITS1 foi o marcador que apresentou maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos (37%). O estudo foi capaz de esclarecer circunscrições de espécies, descobrir novas espécies e estimar a história biogeográfica do grupo analisado; mostrando que os marcadores moleculares utilizados apresentam capacidade para

circunscrever espécies e que apresentam diferenças genéticas relacionadas à localidade das amostras. No presente estudo, o marcador molecular ITS1 também foi o que apresentou a maior porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos, assim como no estudo realizado por Carter et al. (2017).

No presente estudo notou-se que em algumas espécies (*Metzgeria brasiliensis*, *M. dichotoma*, *M. leptoneura* e *M. myriopoda*) os marcadores moleculares utilizados foram capazes de discriminar as amostras de acordo com a sua localidade de coleta, sugerindo que existem diferenças genéticas entre espécimes de diferentes regiões. Nas árvores filogenéticas geradas com o *trnL-F* e o ITS (Figura 1) é possível observar que as amostras M56 e M95 (*Metzgeria brasiliensis*), que são oriundas do Paraná, apresentam diferença genética em comparação com a amostra M81, da mesma espécie, que foi coletada em São Paulo. Não foi possível realizar esta análise com o *trnG*, pois não houve sucesso no sequenciamento da amostra M81.

As amostras M3 e M17 de *Metzgeria dichotoma* são oriundas do Distrito Federal e apresentam diferença genética em comparação com as outras amostras desta espécie M58 e M85, coletadas em Minas Gerais e São Paulo, respectivamente. Para a amostra M106 (*M. dichotoma*), também coletada no Distrito Federal, houve sucesso de sequenciamento apenas na região ITS. Nas análises realizadas com este marcador, a amostra M106 está no mesmo clado que as outras amostras no Distrito Federal, corroborando a topologia encontrada para esta espécie na Figura 1.

Esta distinção genética também é observada em *Metzgeria leptoneura* (Figura 1), as amostras M75 e M104 são oriundas de São Paulo, já a amostra M109 é uma coleta do Paraná. Não foi possível analisar se esta topologia ocorre com o uso do marcador molecular no *trnG*, pois foi amplificada apenas a amostra M109 para este marcador. Da mesma forma, os espécimes de *Metzgeria myriopoda* coletados no Espírito Santo (M108, M111 e M117)

apresentam diferença genética em relação à amostra M68 (oriunda do Paraná). Não houve a formação de um clado monofilético composto pelos quatro espécimes desta espécie (Figura 1) e não foi possível observar se esta topologia também ocorre nas análises realizadas com o *trnG*, pois não houve sucesso no sequenciamento da amostra M68.

As quatro espécies analisadas foram identificadas baseando-se nos caracteres morfológicos descritos por Costa (2008) e não foi observado nenhuma diferença morfológica que se poderia relacionar com a localidade das amostras coletadas. Neste estudo, a quantidade de sequências obtidas por espécie e por localidade são bem inferiores aos estudos mencionados anteriormente. Porém, mesmo com essa baixa amostragem, é possível perceber que as regiões de DNA utilizadas também apresentam capacidade de detectar diferenças genéticas associadas à localização dos espécimes, corroborando o uso destes marcadores como promissores para estudos filogeográficos.

## 5 Conclusão

Baseando-se nos estudos citados anteriormente e no presente estudo é possível observar que o ITS e/ou ITS2 são as regiões de DNA que apresentam maior capacidade de discriminação para as briófitas, sendo regiões com potencial para DNA barcode deste grupo de plantas. Os marcadores moleculares utilizados neste estudo (*trnL-F*, *trnG*, ITS total, ITS1 e ITS2) foram capazes de distinguir espécies de *Metzgeria* que ocorrem no Brasil, facilitando a discriminação destas espécies. Sendo, na maioria dos casos, congruentes com a identificação morfológica das espécies deste gênero, que muitas vezes é confusa quando analisados somente os caracteres morfológicos.

As regiões do DNA avaliadas neste estudo apresentaram alto sucesso no sequenciamento e, dentre elas, o *trnG*, ITS1 e ITS total foram as regiões que apresentam maior capacidade em discriminar as espécies. Sendo que quando feitas análises em conjunto

com os marcadores *trnG* e ITS foi alcançado o maior sucesso em discriminação das espécies. Desta forma, com a utilização das regiões *trnG* e ITS são obtidos resultados satisfatórios quando considerada a capacidade de discriminação de espécies de *Metzgeria* do Brasil.

As regiões de DNA testadas neste trabalho apresentaram um “barcode gap” positivo, se consideradas as espécies bem resolvidas filogeneticamente, são regiões curtas e de fácil amplificação com *primers* universais para briófitas. Além disso, apresentam divergência e variação genética à nível de espécie. Desta forma, os marcadores moleculares utilizados neste estudo (principalmente o *trnG* e ITS) se encaixam nos requisitos propostos para DNA barcode, como: a universalidade de *primers*, sucesso no sequenciamento e poder discriminatório. Os marcadores moleculares aqui testados podem ser empregados em outros grupos de briófitas, a fim de auxiliar em estudos taxonômicos e de discriminação de espécies, pois se mostraram eficientes para discriminar as espécies amostradas.

## 6 Referências Bibliográficas

- Bączkiewicz A, Szczecińska M, Sawicki J, Stebel A, Buczkowska K. 2017. DNA barcoding, ecology and geography of the cryptic species of *Aneura pinguis* and their relationships with *Aneura maxima* and *Aneura mirabilis* (Metzgeriales, Marchantiophyta). PLoS ONE 12(12): e0188837
- Barros FSM, Siqueira MF, Costa DP. 2012. Modeling the potential geographic distribution of five species of *Metzgeria* Raddi in Brazil, aiming at their conservation. The Bryologist 115 (2): 341-349
- Bell D, Long DG, Forrest AD, Hollingsworth ML, Blom HH, Hollingsworth PM. 2012. DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species. Molecular Ecology Resources 12: 36–47.
- Câmara PEAS. 2010. Métodos de extração de DNA de Briófitas para estudos filogenéticos. Heringeriana 3:11-17
- Câmara PEAS & Shaw J. 2013. A Molecular Phylogeny of the Moss Genus *Taxithelium* (Pylaisiadelphaceae) Based on Plastid, Mitochondrial and Nuclear Markers. Systematic Botany 38(4):861-868

- Carter BE, Larraín J, Manukjanová A, Shaw B, Shaw AJ, Heinrichs J, Lange Pd, Suleiman M, Thouvenot L, Konrat Mv. 2016. Species delimitation and biogeography of a southern hemisphere liverwort clade, *Frullania* subgenus *Microfrullania* (Frullaniaceae, Marchantiophyta), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107:16-26
- Chen CW, Huang YM, Kuo LY, Nguyen QD, Luu HT, Callado JR, Farrar DR, Chiou WL. 2013. *trnL-F* is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (Pteridaceae). *Annals of Botany* 111: 663–673
- Costa DP. 1999. Metzgeriaceae (Metzgeriales, Hepatophyta) no Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Costa DP. 2008. Metzgeriaceae (Hepaticae). *Flora Neotropica Monograph* 102:1–169
- Costa DP. 2020. Metzgeriaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB97844>>. Acesso em: 10 Mai. 2018
- Crandall-Stotler B & Stotler RE. 2000. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Shaw AJ & Goffinet B (eds) *Bryophyte Biology*, 1<sup>st</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp 21-70
- Crandall-Stotler BJ, Forrest LL, Stotler RE. 2005. Evolutionary Trends in the Simple Thalloid Liverworts (Marchantiophyta, Jungermanniopsida Subclass Metzgeriidae). *Taxon* 54 (2): 299-316
- Crandall-Stotler B, Stotler RE, Long DG. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Goffinet B and Shaw AJ (eds) *Bryophyte Biology*, 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-54
- Crandall-Stotler B, Stotler RB, Long DG. 2009. Phylogeny and classification of the Marchantiophyta. *Edinburgh Journal of Botany* 66(1): 155-198
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772
- Doyle JJ & Doyle JL. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Drábková LZ. 2014. DNA Extraction from Herbarium Specimens. *Methods in molecular biology* (Clifton NJ) 1115: 69-84
- Duarte-Silva AG, Carvalho-Silva M, Câmara PEAS. 2013. Morphology and development of leaf papillae in the Pilotrichaceae. *Acta Botanica Brasilica* 27(4): 737-742

- Ellis LT, Asthana AK, Srivastava P, Omar I, Rawat KK, Sahu V, Cano MJ, Costa DP, Dias EM, Dias dos Santos N, Silva JB, Fedosov VE, Kozhin MN, Ignatova EA, Germano SR, Golovina EO, Gremmen NJM, Ion R, Ștefănuț S, von Konrat M, Jimenez MS, Suárez GM, Kiebacher T, Lebouvier M, Long DG, Maity D, Ochyra R, Parnikoza I, Plášek V, Fialová L, Skoupá Z, Poponessi S, Aleffi M, Sabovljević MS, Sabovljević AD, Saha P, Aziz MN, Sawicki J, Suleiman M, Sun B-Y, Váňa J, Wójcik T, Yoon Y-J, Żarnowiec J, Larraín J. 2016. New national and regional bryophyte records, 46. *Journal of Bryology* 38(1): 47-63
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH. 2008. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS ONE* 3(7): e2802.
- Feldberg K, Váňa J, Krusche J, Kretschmann J, Patzak SDF, Pérez-Escobar OA, Rudolf NR, Seefelder N, Schäfer-Verwimp A, Long DG, Schneider H, Heinrichs J. 2016. A phylogeny of Cephaloziaceae (Jungermanniopsida) based on nuclear and chloroplast DNA markers. *Organisms Diversity & Evolution*. DOI 10.1007/s13127-016-0284-4
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 779–783
- Filgueiras TS, Nogueira PE, Brochado AL, Guala II GF. 1994. Caminhamento: um método expedito para levantamentos florísticos qualitativos. *Cadernos de Geociências* 12: 39-43
- Flora do Brasil 2020. Briófitas in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128467>>. Acesso em: 10 Mai. 2018
- Forrest L & Crandall-Stotler B. 2004. A phylogeny of the simple thalloid liverworts (Jungermanniopsida, Metzgeriidae) as inferred from five chloroplast genes. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. 98. 119-140
- Forrest LL, Christine Davis E, Long DG, Crandall-Stotler BJ, Clark A, Hollingsworth ML. 2006. Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta): multiple taxa, genomes and analyses. *The Bryologist* 109(3):303-334
- Frey W, Stech M, Meißner K. 1999. Chloroplast DNA-relationship in palaeoaustral *Lopidium concinnum* (Hypopterygiaceae, Musci). An example of steno-evolution in mosses.

- Studies in austral temperate rain forest bryophytes 2. *Plant Systematics and Evolution* 218: 67–75
- Fuselier L, Davison PG, Clements M, Shaw B, Devos N, Heinrichs J, Hentschel J, Hentschel J, Sabovljevic S, Szövényi P, Schuette S, Hofbauer W, Shaw J. 2009. Phylogeographic analyses reveal distinct lineages of the liverworts *Metzgeria furcata* (L.) Dumort. And *Metzgeria conjugata* Lindb. (Metzgeriaceae) in Europe and North America. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 745–756
- Fuselier LC, Shaw B, Engel JJ, von Konrat M, Costa DP, Devos N, Shaw AJ. 2011. The status and phylogeography of the liverwort genus *Apometzgeria* Kuwah. (Metzgeriaceae). *The Bryologist* 114(1):92-101
- Goffinet B & Shaw AJ. 2009. *Bryophyte biology*, 2<sup>a</sup> edição, Cambridge University Press, Cambridge
- Gradstein SR & Costa DP. 2003. The Hepaticae and Anthocerotae of Brazil. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 87: 1–318
- Guindon S & Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704
- Hartmann FA, Wilson R, Gradstein SR, Schneider H, Heinrichs J. 2006. Testing hypotheses on species delimitations and disjunctions in the liverwort *Bryopteris* (Jungermanniopsida: Lejeuneaceae). *International Journal of Plant Sciences* 167: 1205–1214
- Hassel K, Segreto R, Ekrem T. 2013. Restricted variation in plant barcoding markers limits identification in closely related bryophyte species. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12074
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101 (41) 14812-14817
- Hedenäs L. 2008. Molecular variation and speciation in *Antitrichia curtispindula* s.l. (Leucodontaceae, Bryophyta). *Botanical Journal of the Linnean Society* 156: 341-354
- Heinrichs J, Dong S, Schäfer-Verwimp A, Pócs T, Feldberg K, Czumaj A, Schmidt AR, Reitner J, Renner MAM, Hentschel J, Stech M, Schneider H. 2013. Molecular Phylogeny of the Leafy Liverwort *Lejeunea* (Porellales): Evidence for a Neotropical

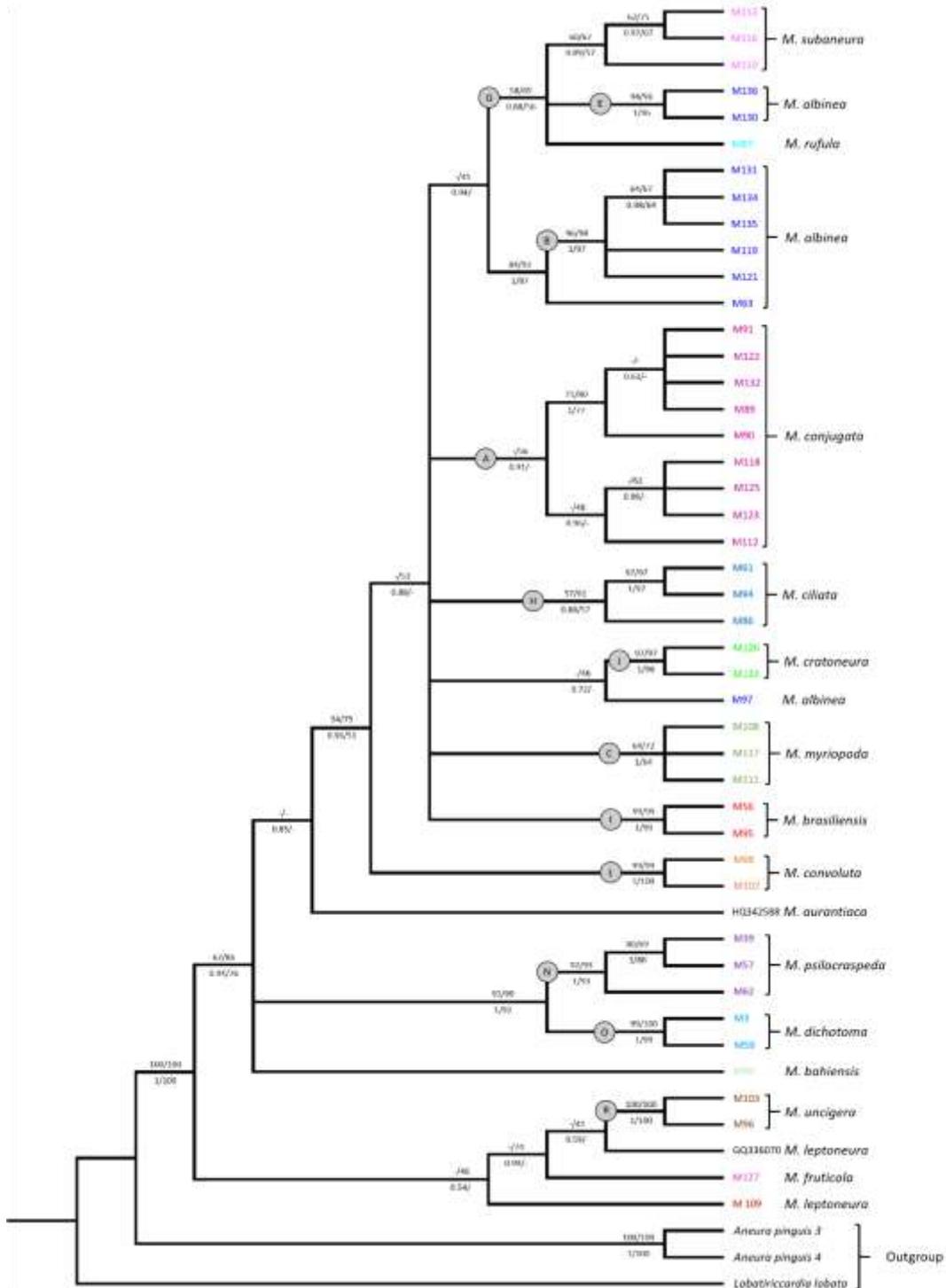
- Origin, Uneven Distribution of Sexual Systems and Insufficient Taxonomy. *PLoS ONE* 8(12): e82547
- He-Nygrén X, Juslén A, Ahonen I, Glenny D, Piippo S. 2006. Illuminating the evolutionary history of liverworts (Marchantiophyta)—towards a natural classification. *Cladistics* 22: 1–31
- Higgins DG & Sharp PM. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244
- Hua X & Bromham L. 2017. Darwinism for the Genomic Age: Connecting Mutation to Diversification. *Frontiers in Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2017.00012.
- Jiang S & Ramachandran S. 2010. Natural and artificial mutants as valuable resources for functional genomics and molecular breeding. *International Journal of Biological Sciences* 6(3): 228-251
- 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
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 15:111-120
- Kimura M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kimura M & Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Lang AS, Kruijer JD, Stech M. 2014. DNA barcoding of Arctic bryophytes: an example from the moss genus *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta). *Polar Biol*. doi: 10.1007/s00300-014-1509-7
- León Yáñez S, Gradstein SR, Castillo J, & Moscoso A, Navarrete H. 2014. *Guía de Briofitas Comunes de los Andes de Quito*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 108 p.
- Lewis LR, Behling E, Gousse H, Qian E, Elphick CS, Lamarre JF, Bêty J, Liebezeit J, Rozzi R, Goffinet B. 2014. First evidence of bryophyte diaspores in the plumage of transequatorial migrant birds. *PeerJ* 2:e424. doi 10.7717/peerj.424
- Liu Y, Yan H-F, Cao T, Ge X-J. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *Journal of Systematic and Evolution* 48: 36–46.

- Meyer CP & Paulay G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol.* doi: 10.1371/journal.pbio.0030422
- Müller K, Quandt D, Müller J, Neinhuis C. 2006. PhyDE®: Phylogenetic Data Editor. [www.phyde.de](http://www.phyde.de).
- Mullis KB & Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350
- Nagalingum NS, Schneider H, Pryer KM. 2007. Molecular Phylogenetic Relationships and Morphological Evolution in the Heterosporous Fern Genus *Marsilea*. *Systematic Botany* 32(1):16-25
- Nieva MM & Schiavone MM. 2002. El género *Metzgeria* (Metzgeriales-Hepatophyta) en los bosques montanos del Noroeste de Argentina. *Tropical Bryology* 21: 123-133
- Pacak A & Szweykowska-Kulińska Z. 2000. Molecular Data Concerning Allopolyploid Character and the Origin of Chloroplast and Mitochondrial Genomes in the Liverworts Species *Pellia borealis*. *Plant Biotechnology Journal* 2(2): 101-108
- Phephu N & van Rooy J. 2013. Studies in the Liverwort Family Metzgeriaceae (Metzgeriales) from Southern Africa. 1. *Metzgeria nudifrons* Stephani and a Key to the Species. *Polish Botanical Journal* 58(2): 449-455
- Pisa S, Werner O, Vanderpoorten A, Magdy M, Ros RM. 2013. Elevational patterns of genetic variation in the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* (Bryaceae). *American Journal of Botany* 100(10): 2000–2008
- Raddi G. 1818. *Jungermanniografia Etrusca*. *Mem. Mat. Fis. Soc. Ital. Sci. Modena* 18: 14-56
- 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
- Rydin C, Pedersen KR, Friis EM. 2004. On the evolutionary history of Ephedra: Cretaceous fossils and extant molecules. *PNAS*: 101 (47) 16571-16576
- Shepherd LD .2017. A non-destructive DNA sampling technique for herbarium specimens. *PLoS ONE* 12(8): e0183555
- Staats M, Cuenca A, Richardson JE, Vrieling-van Ginkel R, Petersen G, Seberg O, Bakker FT. 2011. DNA Damage in Plant Herbarium Tissue. *PLoS ONE* 6(12): e28448
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312-3.

- Stech M & Frahm J. 1999. The status of *Platyhypnidium mutatum* Ochyra & Vanderpoorten and the systematic value of the Donrichardsiaceae based on molecular data. *Journal of Bryology* 21:191-195
- Stech M & Quandt D. 2010. 20,000 species and five key markers: the status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa* 9: 196–228
- Stech M, Veldman S, Larraín J, Muñoz J, Quandt D, Hassel K, Kruijer JD. 2013. Molecular species delimitation in the *Racomitrium canescens* complex (Grimmiaceae) and implications for DNA barcoding of species complexes in mosses. *PLoS ONE* 8(1): e53134
- Swofford DL. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analyses using parsimony (\*and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109
- Vivas CV, Moraes RCS, Alves-Araújo A, Alves M, Mariano-Neto E, van den Berg C, Gaiotto FA. 2014. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification?. *Genetics and Molecular Biology*: 37, 4, 662-670
- Weiß CL, Schuenemann VJ, Devos J, Shirsekar G, Reiter E, Gould BA, Stinchcombe JR, Krause J, Burbano HA. 2016. Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens. *Royal Society Open Science* 3: 160239
- 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: 27-30
- Yodphaka S, Boonpragob K, Lumbsch HT, Kraichak E. 2018. Evaluation of six regions for their potential as DNA barcodes in epiphyllous liverworts from Thailand. *Applications in Plant Sciences* 6(8): e1174.

## 7 Anexos

**Anexo 1.** Cladograma obtido através de Inferência Bayesiana baseado no marcador molecular *trnG*. Os valores acima dos ramos referem-se ao bootstrap das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente, e os valores abaixo dos ramos referem-se às probabilidades posteriores e valores de bootstrap das análises de Inferência Bayesiana e de Neighbor Joining, respectivamente.



**Anexo 2.** Lista de espécies, código deste trabalho, localidade, número de tomo ou coletor, herbário depositado e código das amostras depositadas no Genbank para os marcadores moleculares *trnL*, *trnF*, *trnG* e ITS. Os campos preenchidos com “este estudo” terão suas sequências depositadas futuramente.

Espécie	Código	Localidade	Número de tomo/coletor	Herbário	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnG</i>	ITS1	ITS2
<i>Aneura pinguis</i> (L.) Dumort.	1	Polônia	POZW 42711		KJ400409	-	KJ400399	KJ400399
	2	Polônia	POZW 42764		KJ400411	-	KJ400401	KJ400401
	3	Reino Unido	EDNA 06; 06249 VC44		-	EF547777	-	-
	4	Reino Unido	EDNA 06; 06251 VC45		-	EF547778	-	-
<i>Lobatiriccardia lobata</i> (Schiffn.) Furuki	-	Nova Zelândia	D. Glenny & A. Kinser; det. Crandall-Stotler 4581 (ABSH)		AY507553	DQ983879	DQ986148	DQ986148
<i>Metzgeria albinea</i> Spruce	M7	Minas Gerais	RB365416	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M119	Minas Gerais	SP481092	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M121	Minas Gerais	SP481068	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M71	Rio Grande do Sul	SP422557	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M130	Rio Grande do Sul	Valente 1142	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M131	Rio Grande do Sul	Valente 1158	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M134	Rio Grande do Sul	Valente 1052	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M135	Rio Grande do Sul	Valente 1089	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M136	Rio Grande do Sul	Valente 1076	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M72	São Paulo	SP419372	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M63	São Paulo	SP439952	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M89A	São Paulo	SP411585	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M20	São Paulo	RB488438	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M4	Santa Catarina	RB486934	RB	Este estudo	-	-	Este estudo
	M5	Rio de Janeiro	RB339135	RB	Este estudo	-	-	-
	M24	Rio de Janeiro	RB474715	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M6	Espírito Santo	RB371948	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M97	Paraná	SP462177	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
M8	Pernambuco	RB333329	RB	Este estudo	-	-	-	
<i>Metzgeria aurantiaca</i> Steph.	M80	Rio Grande do Sul	SP402913	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	-	Brasil	Wasum, R 28-Oct-88 (NYBG 00919674)	NY	HQ342635	HQ342588	-	-

<i>Metzgeria bahiensis</i> Schiffn.	M99	Paraná	SP461471	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M132A	Rio Grande do Sul	Valente 829	UB	Este estudo	-	-	-
<i>Metzgeria brasiliensis</i> Schiffn.	M56	Paraná	SP454942	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M95	Paraná	SP461166		Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M81	São Paulo	SP414362	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria ciliata</i> Raddi	M94	São Paulo	SP439881	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M61	São Paulo	SP411582	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M86	Paraná	SP461404	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M22	Rio de Janeiro	RB441107	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria conjugata</i> Lindb.	M14	Rio de Janeiro	RB345156	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M112	Rio de Janeiro	SP480127	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M74	Pernambuco	SP432448	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M83	São Paulo	SP414493	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M91	São Paulo	SP448842	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M70	São Paulo	SP419414	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M89B	São Paulo	SP411585	SP	-	Este estudo	-	-
	M90	Minas Gerais	SP410652	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M118	Minas Gerais	SP452049	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M77	Paraná	SP458524	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M123	Rio Grande do Sul	Valente 1212	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M125	Rio Grande do Sul	Valente 1257	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M132B	Rio Grande do Sul	Valente 829	UB	-	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M122	Rio Grande do Sul	Valente 1297	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	-
<i>Metzgeria consanguinea</i> Schiffn.	M120	São Paulo	SP395178	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria convoluta</i> Steph.	M98	São Paulo	SP439324	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M102	Paraná	SP461170	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria cratoneura</i> Schiffn.	M126	Rio Grande do Sul	Valente 965	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M133	Rio Grande do Sul	Valente 952	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria dichotoma</i> (Sw.) Nees	M1	Distrito Federal	Rocha 18	UB	Este estudo	-	-	-
	M3	Distrito Federal	Soares 34	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M17	Distrito Federal	Soares 454	UB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M106	Distrito Federal	SP422166	SP	-	-	Este estudo	Este estudo

	M58	Minas Gerais	SP425150	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M85	São Paulo	SP421432	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria fruticola</i> Spruce	M127	Rio Grande do Sul	Valente 957	UB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M129	Rio Grande do Sul	Valente 968	UB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria furcata</i> (L.) Dumort.	M40	Rio de Janeiro	RB506235	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria herminieri</i> Schiffn.	M43	Rio de Janeiro	RB604932	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria leptoneura</i> Spruce	M75	São Paulo	SP432428	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M104	São Paulo	SP440024	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M115	São Paulo	SP440173	SP	Este estudo	-	-	-
	M109	Paraná	SP452192	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	-	Brasil	Schafer-Verwimp & Verwimp 13077 JENA 1990		GQ336215	GQ336215		
<i>Metzgeria liebmanniana</i> Lindenb. & Gottsche	M100	Minas Gerais	SP407410	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria myriopoda</i> Lindb.	M108	Espírito Santo	SP477919	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M117	Espírito Santo	SP478035	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M111	Espírito Santo	SP477852	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M68	Paraná	SP455008	SP	Este estudo		Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria psilocraspeda</i> Schiffn.	M57	São Paulo	SP388932	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M67	São Paulo	SP411660	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M62	São Paulo	SP419157	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M39	Rio de Janeiro	RB592537	RB	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M13	Rio de Janeiro	RB343297	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M15	Rio de Janeiro	RB592449	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M12	Espírito Santo	RB372341	RB	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
	M60	Paraná	SP457863	SP	Este estudo	-	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria rufula</i> Spruce	M87	São Paulo	SP404327	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria scyphigera</i> A.Evans	M73	Rio de Janeiro	SP437001	SP	Este estudo		Este estudo	Este estudo
	M114	São Paulo	SP440029	SP	Este estudo		Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria subaneura</i> Schiffn.	M110	Paraná	SP458332	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
	M116	Paraná	SP464643	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo

	M113	Minas Gerais	SP481080	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
<i>Metzgeria uncigera</i>	M96	Rio de Janeiro	SP437006	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo
A.Evans	M103	Rio de Janeiro	SP437005	SP	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este estudo

## Conclusão Geral

A utilização de marcadores moleculares como DNA barcode é uma ferramenta que auxilia na discriminação de espécies, porém ainda não existe um consenso sobre quais regiões utilizar em estudos realizados com plantas. Dessa forma, são realizados diversos estudos que analisam a capacidade de marcadores moleculares em discriminar espécies nos diferentes grupos de plantas. O DNA barcode se mostra importante para facilitar a identificação de espécies, ainda mais quando considerados alguns países, como o Brasil, que possuem uma alta biodiversidade, mas com lacunas de conhecimento a esse respeito. Dessa forma, estudos que visam entender e avaliar como as regiões de DNA se comportam quando utilizadas como DNA barcode são importantes para embasar futuros trabalhos de biodiversidade, ecologia, filogenia, filogeografia, entre outros.

## Plano de Publicação da Tese

Esta tese está dividida em dois capítulos que serão (ou foram) submetidos independentemente à periódicos especializados na área.

Proposta de publicações oriundas dos capítulos desta tese de doutorado:

Artigo 1: Bryophyte phylogeny and DNA Barcoding: tools for assessing Brazilian diversity

DOI: 10.1007/s40415-018-0473-9

Manuscrito publicado pelo periódico Brazilian Journal of Botany. Este artigo faz parte de uma seção especial do fascículo 2 sobre “o uso de ferramentas moleculares para a sistemática de algas, fungos e plantas” publicado em junho de 2018.

Artigo 2: A discriminação de espécies de *Metzgeria* Raddi do Brasil: um estudo molecular e morfológico

Manuscrito a ser submetido no periódico Annals of Botany (A1).

## Bibliografia Geral

- Bell, D., Long, D.G., Forrest, A.D., Hollingsworth, M.L., Blom, H.H., Hollingsworth, P.M. 2012. DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species. *Molecular Ecology Resources* 12: 36–47.
- Buck, W.R. & Goffinet, B. 2000. Morphology and classification of mosses. *In*: SHAW, A. J. & Goffinet, B. *Bryophyte Biology*. Cambridge: University Press Cambridge, cap. 3, p. 113.
- Buryová, B. & Shaw A.J. 2005. Phenotypic plasticity in *Philonotis fontana* (Bryopsida: Bartramiaceae). *Journal of Bryology*, 27: 13–22.
- Câmara P.E.A.S. & Buck W.R. 2012. A re-interpretation of Fabroniaceae, a phylogenetic perspective. *The Bryologist* 115(1): 109-117.
- CBOL Plant Working Group (2009) A *DNA barcode* for land plants. *Proc Natl Acad Sci. PNAS*. doi: 10.1073/pnas.0905845106
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhun Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel *DNA barcode* for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0008613
- Costa, D.P. da, Almeida J. S. dos S, Dias, N. dos S, Gradstein, S. R., Churchil, S. P. 2010. *Manual de Briologia*. Editora Interciência.
- Costa, D.P., Pôrto, K.C., Luiz-Ponzo, A.P., Ilkiu-Borges, A.L., Bastos, C.J.P., Câmara, P.E.A.S., Peralta, D.F., Bôas-Bastos, S.B.V., Imbassahy, C.A.A., Henriques, D.K., Gomes, H.C.S., Rocha, L.M., Santos, N.D., Siviero, T.S., Vaz-Imbassahy, T.F., Churchill, S.P. 2011. Synopsis of the Brazilian moss flora: checklist, distribution and conservation. *Nova Hedwigia* 93: 277–334.
- Epstein, H.E., Calef, M.P., Walker, M.D., Chapin III, F.S., Starfield, A.M. 2004. Detecting changes in arctic tundra plant communities in response to warming over decadal time scales. *Global Change Biology* 10: 1325–1334.
- Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Burgess, K.S., Percy, D.M., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Newmaster, S.G., Hajibabaei, M., Husband, B.C. 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1): 130–139.
- Fernández, E.G. & Serrano, A.M.V. 2009. *Atividade biológica das Briófitas. Âmbito Cultural Edições*. 190pp.
- Frey, W. & Stech, M. 2009. Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta. *In*: Frey W. (ed.): *Syllabus of Plant Families. A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, 13th ed., Part 3 Bryophytes and seedless Vascular Plants. Gebr. Borntraeger, Stuttgart.

- Goffinet, B. & Shaw, A.J. 2009. Bryophyte biology, 2<sup>a</sup> edição, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gradstein, S.R., Churchill, S.P. & Salazar-Allen, N. 2001. Guide to the bryophytes of Tropical America. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 86: 1-577.
- Gradstein, S.R. & Costa, D.P. 2003. The Hepaticae and Anthocerotae of Brazil. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 87: 1–318.
- Hassel, K., Pedersen, B., Söderström, L. 2005. Changes in life-history traits in an expanding moss species: phenotypic plasticity or genetic differentiation? A reciprocal transplantation experiment with *Pogonatum dentatum*. *Ecography* 28: 71–80.
- Hassel, K., Segreto, R., Ekrem, T. 2013. Restricted variation in plant barcoding markers limits identification in closely related bryophyte species. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12074.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 313–321.
- Heinrichs, J., Hentschel, J., Feldberg, K., Bombosch, A., Schneider, H. 2009. Phylogenetic biogeography and taxonomy of disjunctly distributed bryophytes. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 497–508.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS ONE* 6: e19254.
- Hölscher, D., Köhler L., van Dijk A.I.J.M., Bruijnzeel L.A. 2004. The importance of epiphytes to total rainfall interception by a tropical montane rain forest in Costa Rica. *Journal of Hydrology* 292: 308–322.
- Hudson, J.M.G. & Henry G.H.R. 2010. High Arctic plant community resists 15 years of experimental warming. *Journal of Ecology* 98: 1035–1041.
- Liu, Y., Yan, H-F., Cao, T., Ge, X-J. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *Journal of Systematic and Evolution* 48: 36–46.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol.* doi: 10.1371/journal.pbio.0030422
- Nadkarni N. M. & Matelson T.J. 1991. Fine litter dynamics within the tree canopy of a tropical cloud forest. *Ecology* 72: 2071–2082.
- Pennisi E. 2007 Taxonomy – Wanted: A barcode for plants. *Science* 318: 190–191.
- Pócs, T. 1982. Tropical Forest Bryophytes. In: Smith, A.J.E. (ed.). *Bryophyte Ecology*. New York: Chapman and Hall, p. 59–103.
- Quandt, D. & Stech, M. 2005. Molecular evolution of the *trnL* intron in bryophytes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 429–443.
- Qiu, Y-L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrovskaya, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M.,

- Ambros, M., Crandall Stotler, B., Duff, J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., Davis, C.C. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *PNAS* 103: 15511–15516.
- Stech, M. & Frey, W. 2008. A morpho-molecular classification of the mosses (Bryophyta). *Nova Hedwigia* 86: 1–21.
- Stech, M. & Quandt, D. 2010. 20,000 species and five key markers: the status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa* 9: 196–228.
- Stech, M. & Sparrius, L. 2011. The Netherlands about to barcode the entire Dutch bryophyte flora. *Bryol. Times* 132: 14.
- Stech, M., Veldman, S., Larraín, J., Muñoz, J., Quandt, D., Hassel, K., Kruijer, J.D. 2013. Molecular species delimitation in the *Racomitrium canescens* complex (Grimmiaceae) and implications for DNA barcoding of species complexes in mosses. *PLoS ONE* 8(1): e53134. doi:10.1371/journal.pone.0053134.
- Tuba, Z., Slack, N.G., Stark, L.R. 2011. *Bryophyte Ecology and Climate Change*. Cambridge University Press.
- Vanderpoorten, A. & Goffinet, B. 2006. Mapping uncertainty and phylogenetic uncertainty in ancestral character state reconstruction: an example in the moss genus *Brachytheciastrum*. *Systematic Biology* 55: 957–971.
- Vanderpoorten, A. & Shaw, A.J. 2010. The application of molecular data to the phylogenetic delimitation of species in bryophytes : A note of caution. *Phytotaxa* 9: 229–237.
- Veneklaas, E.J., Zagt, R.J., van leerdem, A., van Ek, R., Broekhoven, A.J., van Genderen, M. 1990. Hydrological properties of the epiphyte mass of a montane tropical rain forest, Colombia. *Vegetatio* 89: 183–192.