

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE FICOLOGIA**

ANA BEATRIZ JANDUZZO AMARO DE LIMA

**PLASTICIDADE MORFOLÓGICA EM MICRIOALGAS VERDES COCOIDES
EM DIFERENTES CONDIÇÕES ABIÓTICAS E SUAS IMPLICAÇÕES NA
DELIMITAÇÃO ESPECÍFICA**

São Carlos – SP

2021

ANA BEATRIZ JANDUZZO AMARO DE LIMA

Plasticidade morfológica em microalgas verdes cocoides em diferentes condições abióticas e suas implicações na delimitação específica

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Inessa Lacativa Bagatini

Co-orientadora: Dr.^a. Naiara Carolina Pereira Archanjo

São Carlos – SP

2021

RESUMO

As microalgas verdes cocoides possuem morfologia simples, convergência morfológica e plasticidade fenotípica, características que dificultam sua correta identificação. Dados moleculares têm sido insuficientes para delimitação específica e, uma vez que as Selenastraceae são assexuadas, o conceito biológico de espécies não é aplicável. Assim, estudos recentes propõem uma abordagem taxonômica integrativa, unindo diversos conceitos de espécies (ex. morfológico, filogenético, fisiológico) para uma classificação mais natural. A análise morfológica, embora muito útil e bastante utilizada, deve considerar a plasticidade fenotípica frente às variações ambientais. Neste estudo, avaliamos a plasticidade morfológica de 7 cepas de três espécies morfológicas de *Ankistrodesmus*, *A. densus*, *A. stipitatus* e *A. fusiformis*, submetidas a diferentes condições de temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$ e $30\pm 1^\circ\text{C}$), pH (7,0 e 8,5) e concentração de nitrogênio (1000 e 200 μM de nitrato). Utilizamos comprimento, largura e biovolume celulares como parâmetros morfométricos. A condição controle foi cultivo a $23\pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,0 e 1000 μM de nitrato. As cepas responderam de forma variada aos diferentes tratamentos, sendo o comprimento o parâmetro com menor variação. O aumento de pH aumentou significativamente (em até 27%) a largura celular de todas as cepas de *A. fusiformis*, refletindo um aumento de até 53% no biovolume, enquanto reduziu a largura da cepa de *A. densus* em 6%. O aumento de temperatura reduziu a largura celular em 3 cepas de *A. fusiformis*, mas uma delas comportou-se semelhantemente a *A. densus*, aumentando sua largura e biovolume. Por outro lado, a comparação entre espécies demonstrou que comprimento celular foi significativamente maior em *A. densus*, mesmo considerando toda a variação abiótica. Desta forma, as variações ambientais alteraram a faixa de valores morfométricos utilizados para a identificação das espécies, mas para as cepas utilizadas, apesar da plasticidade, o comprimento celular diferenciou as espécies.

Palavras-chave: *Ankistrodesmus*. Microalgas. Plasticidade fenotípica. Taxonomia.

ABSTRACT

The coccoid green algae have simple morphology, morphological convergence and phenotypic plasticity, characteristics that hinders their correct identification. Molecular data have been insufficient for specific delimitation, and since Selenastraceae are asexual, the biological concept of species is not applicable. Thus, recent studies propose an integrative taxonomic approach, uniting several species concepts (eg. morphological, phylogenetic, physiological) for a more natural classification. Morphological analysis, although very useful and widely used, must consider phenotypic plasticity in the face of environmental variations. In this study, we evaluated the morphological plasticity of seven strains of three morphological species of *Ankistrodesmus*, *A. densus*, *A. fusiformis* e *A. stipitatus*, submitted to different conditions of temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$ and $30\pm 1^\circ\text{C}$), pH (7,0 and 8,5) and nitrogen concentration (1000 and 200 μM nitrate). We use cell length, width and biovolume as morphometric parameters. The control treatment was cultivated at $23\pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,0 e 1000 μM nitrate. The strains responded differently to different treatments, with length being the parameter with the least variation. The increase in pH significantly increased the cell width (by up to 27%) of all *A. fusiformis* strains, reflecting an increase up to 53% in the biovolume, while reduced the cellular width of the *A. densus* strain by 6%. The increase in temperature reduced the cell width in three strains of *A. fusiformis*, but one of them responded similarly to *A. densus*, increasing its width and biovolume. On the other hand, the comparison between species showed that cell length was significantly greater in *A. densus*, even considering the entire abiotic variation. In this way, the environmental variations altered the range of morphometric values used to identify the species, but for the selected strains, despite the plasticity, the cell length differed the species.

Keywords: Ankistrodesmus. Microalgae. Phenotypic plasticity. Taxonomy.

SUMÁRIO

1	Introdução	5
2	Objetivos	7
2.1	Objetivos específicos	7
3	Material e métodos	7
3.1	Organismos	7
3.2	Descrição das espécies	8
3.2.1	<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953	8
3.2.2	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda	9
3.2.3	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969	9
3.3	Condições de cultivo	9
3.4	Desenho experimental	10
3.5	Curvas de crescimento	11
3.6	Densidade ótica	11
3.7	Análises morfológicas	11
3.8	Taxa de crescimento	12
3.9	Análises estatísticas	12
4	Resultados	13
4.1	Plasticidade morfológica em <i>Ankistrodesmus</i>	13
4.2	Separação de espécies em <i>Ankistrodesmus</i> sob diferentes condições ambientais	19
4.3	Taxa de crescimento e separação de espécies em <i>Ankistrodesmus</i> sob diferentes condições ambientais	23
5	Discussão	29
6	Conclusão	33
	Referências bibliográficas	34
	ANEXO A – Curvas de crescimento.	39

1 Introdução

A taxonomia de microalgas se mostra essencial para propostas de conservação de biodiversidade, aplicações na indústria e também para pesquisa (BOROWITZKA, 2016), e para tanto fazemos uso principalmente de caracteres morfológicos, como tipo de talo e forma de reprodução, e dados moleculares, como o 18S rDNA (FAWLEY *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2017). A morfologia simples das microalgas verdes cocoides torna sua classificação uma tarefa complexa, fornecendo poucos caracteres para sua identificação, assim como a plasticidade fenotípica pode levar a uma interpretação errônea de cepas coletadas em habitats diversos (MALAVASI *et al.*, 2016). Estudos filogenéticos demonstram que a morfologia dessas algas muitas vezes não condiz com sua posição filogenética (KRIENITZ; BOCK, 2012). Além disso, para diversas espécies a reprodução sexuada não foi observada, ou não ocorre, impossibilitando o uso do conceito de espécie biológica proposto por Mayr em 1942 (KRIENITZ; BOCK, 2012). Quanto às análises moleculares, embora essenciais para estudos taxonômicos, quando utilizadas sozinhas podem fornecer dados contraditórios, excluindo características ecológicas e fisiológicas relevantes, homogeneizando assim a diversidade (DARIENKO *et al.*, 2015; MALAVASI *et al.*, 2016), além de não fornecerem dados informativos sobre a evolução morfológica dos grupos.

Como alternativa a essas formas de classificação temos a abordagem integrativa, apontando para a transição de uma sistemática artificial para uma mais natural em algas, que fortalece a interdisciplinaridade (KRIENITZ; BOCK, 2012) entre dados moleculares, morfologia, fisiologia, bioquímica e ecologia. Desta forma, utilizam-se outros conceitos de espécies para uma taxonomia mais robusta. Entre os conceitos que podem ser aplicados às espécies assexuadas, além do morfológico e filogenético, está o conceito de espécie fisiológica, que nas palavras de Stauber (1950, p. 109) define “grupos de organismos que, em termos morfológicos, se encaixam em uma designação de espécie aceita atualmente, mas que são funcionalmente diferentes em certos aspectos, um do outro”. O conceito de espécie fisiológica é uma importante ferramenta de

pesquisa no campo da variabilidade biológica, incluindo as microalgas (BAKER, 1966), e por considerar a funcionalidade, confunde-se também com o conceito ecológico de espécie. Embora a plasticidade fenotípica, incluindo alterações fisiológicas, ocorra em respostas a fatores bióticos e abióticos do ambiente em diferentes organismos da mesma espécie (MINER *et al.*, 2005), se essas alterações para uma cepa estiverem fora da variabilidade encontrada para a população estudada, podem nos auxiliar, juntamente com dados filogenéticos, a revelar a ocorrência de espécies crípticas. Essa abordagem ainda é pouco utilizada, mas estudos concordam e recomendam associar dados ecológicos, morfológicos, fisiológicos (e.g. DARIENKO *et al.*, 2015; MALAVASI *et al.*, 2016; ŠKALOUD & RINDI, 2013) a uma maior variedade de marcadores moleculares (MALAVASI *et al.*, 2016) para a obtenção de dados mais robustos e precisos.

Entre as microalgas de difícil taxonomia, estão as microalgas verdes cocoides da família Selenastraceae, cujos membros são frequentemente encontrados em ambientes de água doce, apresentam grande diversidade morfológica e são assexuados (KRIENITZ; BOCK, 2012). Os organismos dessa família podem ser encontrados em células solitárias ou em colônias e apresentam formatos fusiforme ou cilíndrico, retas ou em leve espiral, cuja classificação tem como base a divisão celular e a formação de autósporos (KRIENITZ *et al.*, 2001).

A taxonomia baseada em morfologia e em marcadores moleculares têm esclarecido algumas relações filogenéticas dentro da família e separado morfotipos iguais em diferentes gêneros (GARCIA *et al.*, 2017). Diversos gêneros diferem entre si por apenas uma característica, por exemplo, *Ankistrodemus*, formando colônias mucilaginosas, e *Monoraphidium*, com células solitárias (KRIENITZ *et al.*, 2001; KRIENITZ & BOCK, 2012). No entanto, a delimitação específica ainda é difícil dentro da maioria dos gêneros, com espécies morfológicas distribuídas em diferentes clados de gênero ou sem delimitação clara dos clados (GARCIA *et al.*, 2017). Um dos gêneros que apresenta problemas na delimitação específica por meio dos dados morfológicos e moleculares é o gênero *Ankistrodesmus* (GARCIA *et al.*, 2017), caracterizado

por células em forma de agulha dispostas em colônias, cujos autósporos estão em paralelo (KRIENITZ & BOCK, 2012).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a presença de plasticidade fenotípica no gênero *Ankistrodesmus* induzida por diferentes condições ambientais. Além disso, as variações fisiológicas (incluindo morfológicas) interespecíficas, considerando a plasticidade fenotípica, refletiram a delimitação de espécies obtida até o momento através da morfologia, e através de dados moleculares, com exceção da cepa CCMA - UFSCar 578.

2 Objetivos

Os objetivos desse estudo foram: 1) analisar se variações abióticas promovem variações fisiológicas, resultando em variações morfológicas e na taxa de crescimento em cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Ankistrodesmus* e 2) verificar se tais variações são congruentes com a delimitação específica dentro do gênero, comparando-as com estudos anteriores.

2.1 Objetivos específicos

1) verificar variação em comprimento, largura e biovolume celular, além da taxa de crescimento em sete cepas de *Ankistrodesmus* em diferentes condições de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $30^{\circ}\text{C} \pm 1$), pH (7.0 e 8.5) e nitrato ($1000 \mu\text{M}$ e $200 \mu\text{M}$);

2) utilizar os dados de plasticidade fenotípica para delimitar “espécies fisiológicas” comparando-as à delimitação específica contida em estudos anteriores.

3 Material e métodos

3.1 Organismos

Os organismos utilizados neste estudo, pertencentes ao gênero *Ankistrodesmus* (Tabela 1) e mantidos em condições axênicas na Coleção de

Culturas de Microalgas de Água Doce na Universidade Federal de São Carlos (CCMA – UFSCar), foram identificados de acordo com Garcia *et al.* (2017).

Tabela 1. Cepas do gênero *Ankistrodesmus* utilizadas neste estudo.

Cepa	Espécie	Local de coleta	GPS	Ano de isolamento	Cidade	País
CCMA-UFSCar 003	<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953	Represa do Broa	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W	1979	Itirapina - SP	Brasil
CCMA-UFSCar 277	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969	Lagoa Vitória	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W	2011	São João Batista da Glória - MG	Brasil
CCMA-UFSCar 278	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969	Lagoa Vitória	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W	2011	São João Batista da Glória - MG	Brasil
CCMA-UFSCar 333	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953	Rio Madeira	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W	2011	Rondônia - RO	Brasil
CCMA-UFSCar 578	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953	Fazenda Bisturi	21°28'13.9"S 47°02'11.5"W	2013	Vargem Grande do Sul - SP	Brasil
CCMA-UFSCar 605	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953	Sítio Ypê	23°15'25.7"S 47°18'18.6"W	2013	Itu - SP	Brasil
CCMA-UFSCar CB 2009_30	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953	Bebedouro de gado Kenia 2009	0°20'39.6"S 36°11'02.5"E	2009	Nakuru	Quênia

3.2 Descrição das espécies

3.2.1 *Ankistrodesmus densus* Korshikov 1953

As células podem ser curvadas, fusiformes ou sigmoides, com as extremidades afiladas. Formam colônias densas com 16 ou mais células agrupadas em feixes (KORSHIKOV, 1953 - ver Fig. 262). As dimensões celulares de acordo com a descrição original são: 40-60 µm de comprimento e 2.5 µm de largura (KORSHIKOV, 1953).

Os tamanhos celulares variam na literatura mais recente, e.g. 50-65 µm de comprimento e 1.25-3.5 µm de largura em RAMOS *et al.* (2012).

3.2.2 *Ankistrodesmus fusiformis* Corda

As células alongadas fusiformes, retas ou levemente curvadas, com as extremidades gradualmente afiladas. Formam colônias radiais ou cruciadas com 2, 4 ou 8 células (CORDA, 1938; KOMÁREK & FOTT, 1983). As dimensões celulares são (19,2) 22-57 x 1 - 3,6 (-5,8) μm (KOMÁREK & FOTT, 1983). O trabalho original de Corda (1838) não traz as dimensões.

Trabalhos mais recentes, relatam comprimentos de até 60 μm (HENTSCHKE *et al.*, 2010).

3.2.3 *Ankistrodesmus stipitatus* (Chodat) Komárková-Legnerová 1969

As células podem ser fusiformes e levemente curvadas com extremidades afiladas, às vezes ligeiramente onduladas irregularmente, formando colônias com 2, 4 ou 8 células. As dimensões celulares (43)-68-105 μm de comprimento e 1,4-3,7(-4,6) μm de largura (KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 1969)

3.3 Condições de cultivo

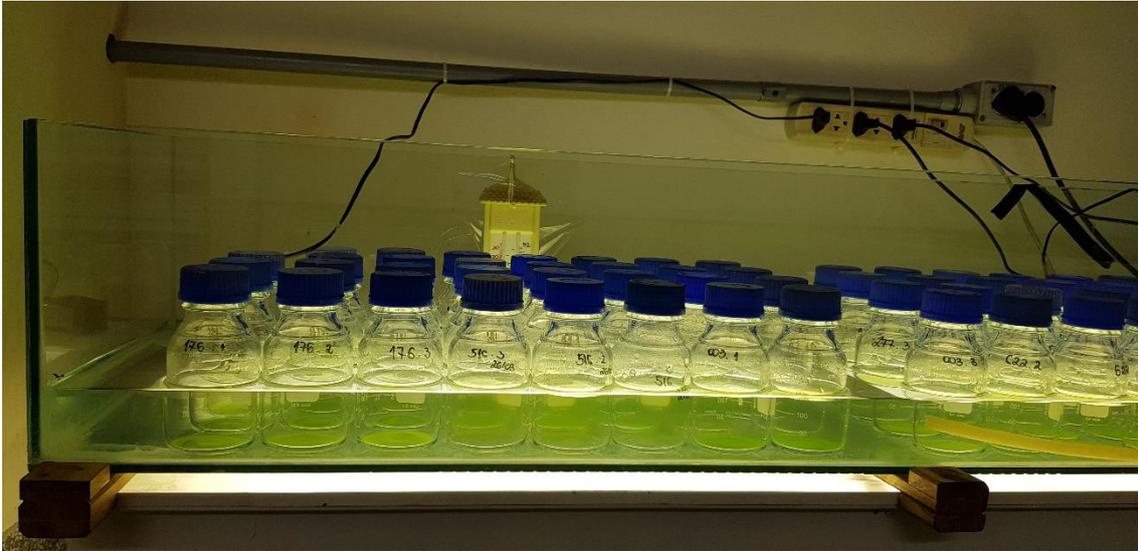
Os inóculos foram realizados em meio WC pH 7,0 (GUILLARD & LORENZEN, 1972) com adição de tampão TRIS (0,5 g/L) a 23°C \pm 2 com intensidade luminosa de 150 \pm 10 μmol fótons m⁻² s⁻¹ com luz LED de 3200K e fotoperíodo 12:12 horas (claro: escuro).

Os cultivos dos controles experimentais foram realizados nas mesmas condições descritas acima. Para os cultivos dos tratamentos, apenas o parâmetro abiótico a ser testado foi alterado em relação às condições controle, como descrito abaixo em “Desenho experimental” (seção 3.3). Todos os cultivos foram realizados em frascos de 250 mL com 150 mL de meio.

Os frascos de cultivos experimentais, tanto controle como tratamentos, foram acondicionados em um aquário com capacidade de 120L com água destilada na altura de 15 cm (Figura 1). O aquário foi necessário para manter a temperatura em 30°C no experimento de temperatura, no entanto os outros

experimentos também foram realizados no aquário, sem aquecimento, evitando possíveis variações em outros parâmetros.

Figura 1. Sistema utilizado para realizar os cultivos nos diferentes tratamentos.



3.4 Desenho experimental

Além da condição controle (Tc) a $23^{\circ}\text{C}\pm 2$, pH 7,0 (com TRIS) e nitrato $1000\ \mu\text{M}$, em frascos com 150 mL de meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972), foram utilizadas outras 3 condições de cultivo (Figura 2), com variações nos parâmetros abióticos.

No tratamento temperatura (Tt), realizamos cultivos com as mesmas condições controle, exceto pela temperatura a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$.

No tratamento de pH (TpH), os parâmetros foram os mesmos do controle, exceto pela alteração do pH para 8,5, utilizando o mesmo tampão (TRIS – 0,5 g/L).

Já o tratamento de nitrogênio (Tn), utilizamos uma concentração de nitrato de $200\ \mu\text{M}$, sendo os demais parâmetros mantidos como no controle.

Todos os cultivos experimentais foram realizados em triplicata. A amostragem para análise morfológica e contagem celular foi realizada no final

da fase de crescimento exponencial, determinado em curvas de crescimento realizadas previamente para cada cepa em cada condição, como descrito abaixo.

Considerando as sete cepas, foram realizados 21 cultivos para cada uma das quatro etapas (controle e 3 tratamentos); sendo que cada etapa foi realizada duas vezes, uma para a curva de crescimento e obtenção da taxa de crescimento e uma para as análises morfológicas (cultivos experimentais). Desta forma, foram realizados 168 cultivos.

3.5 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas previamente aos experimentos e nas mesmas condições dos cultivos experimentais. A fim de analisar o crescimento das cepas, os cultivos foram amostrados para densidade ótica (seção 3.6) até a fase estacionária (confirmada após três amostragens sem crescimento).

3.6 Densidade ótica

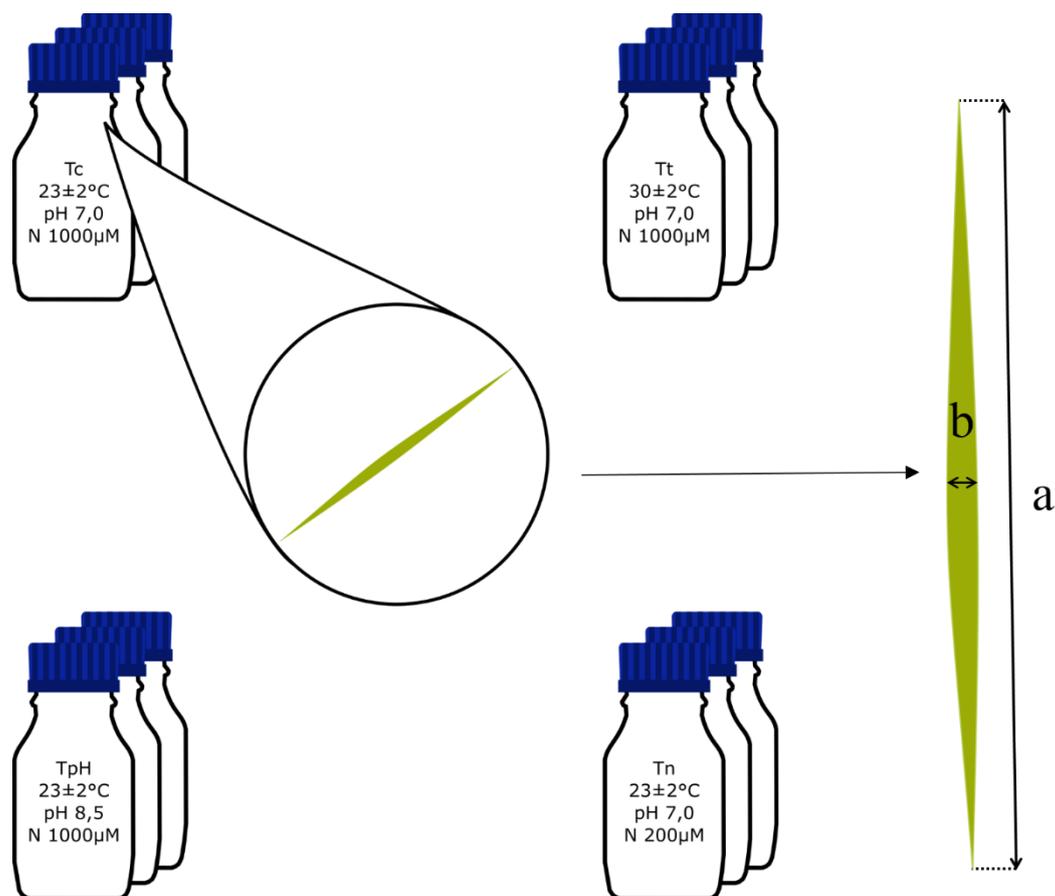
A densidade ótica foi quantificada nos comprimentos de onda de 680 e 750 nm (GRIFFITHS *et al.*, 2011) utilizando o espectrofotômetro HACH DR 5000.

3.7 Análises morfológicas

As análises morfológicas foram realizadas em microscópio óptico Axioplan 2 (Zeiss) equipado com uma câmera AxioCam HRc (Zeiss), com auxílio do software de imagens Axiovision 4.5 (Zeiss).

Foram realizadas medidas de comprimento e largura em 30 células por réplica, totalizando 90 células por cepa, em 5 ou mais campos aleatórios. Essas medidas (Figura 2) foram utilizadas também para o cálculo de biovolume segundo equação sugerida por Hillebrand (1999) e Sun & Liu (2003), adaptadas no Banco de Fórmulas -nExternal Quality Assessment Trial of Phytoplankton: $V = 2/15 \times \pi \times b^2 \times a$, onde a representa o comprimento e b representa a largura.

Figura 2. Desenho experimental e modelo de como as medidas foram realizadas.



3.8 Taxa de crescimento

As taxas de crescimento foram estimadas pelo coeficiente angular da regressão linear dos valores (em log) de absorvância (680-750 nm) da clorofila a durante o crescimento exponencial das algas.

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto a normalidade a partir do teste de Shapiro, e quanto a normalidade da variância pelo método de Levene. As análises dos dados morfométricos e das taxas de crescimento foram realizadas de acordo com a normalidade, de modo que para dados normais, ANOVA e teste Tukey foram empregados, e para dados não-normais, Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Utilizamos PERMANOVA para análise integrada de todos os dados por

meio da função *adonis* (pacote *vegan* no R – OKSANEN et al. 2019) e *pairwise.adonis* (ARBIZU, 2017) com distância euclidiana e correção por “*fdr*”. Todas as análises foram realizadas no software R CORE TEAM (2020). O escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) foi realizado utilizando a função *metaMDS* do pacote *vegan* no R com método de distância euclidean.

Para comparação entre espécies, as 30 medidas obtidas para cada uma das réplicas de cada cepa da mesma espécie foram agrupadas e utilizadas como réplicas de medidas.

4 Resultados

A amostragem das cepas ocorreu no final da fase de crescimento exponencial. Houve pequena variação temporal entre as cepas para um mesmo tratamento. No entanto, o dia de amostragem variou entre os tratamentos, uma vez que as condições experimentais alteraram o crescimento das cepas (Anexo 1 – curvas de crescimento).

4.1 Plasticidade morfológica em *Ankistrodesmus*

Todas as espécies (Figura 3) e todas as cepas analisadas isoladamente (Figura 4) apresentaram variação morfométrica significativa em um dos parâmetros, para pelo menos uma das variações ambientais. Isso demonstra a existência de plasticidade morfológica no gênero *Ankistrodesmus* frente às variações abióticas. No entanto, houve diferenças nas respostas entre espécies (Figura 3) e até mesmo entre cepas de uma mesma espécie (Figura 4).

Em relação às espécies, observamos que o aumento da temperatura para 30°C proporcionou um aumento significativo no comprimento e na largura celular de *Ankistrodesmus densus* (representada apenas pela cepa CCMA 003) (Figura 3; Figura 4). Houve também redução significativa da largura celular para o tratamento com redução de nitrato a 200µm (Figura 3). As alterações nas medidas lineares, levaram a um aumento significativo do biovolume em *A. densus* com o aumento da temperatura e uma diminuição do biovolume com redução de nitrato (Tabela 2; Figura 3).

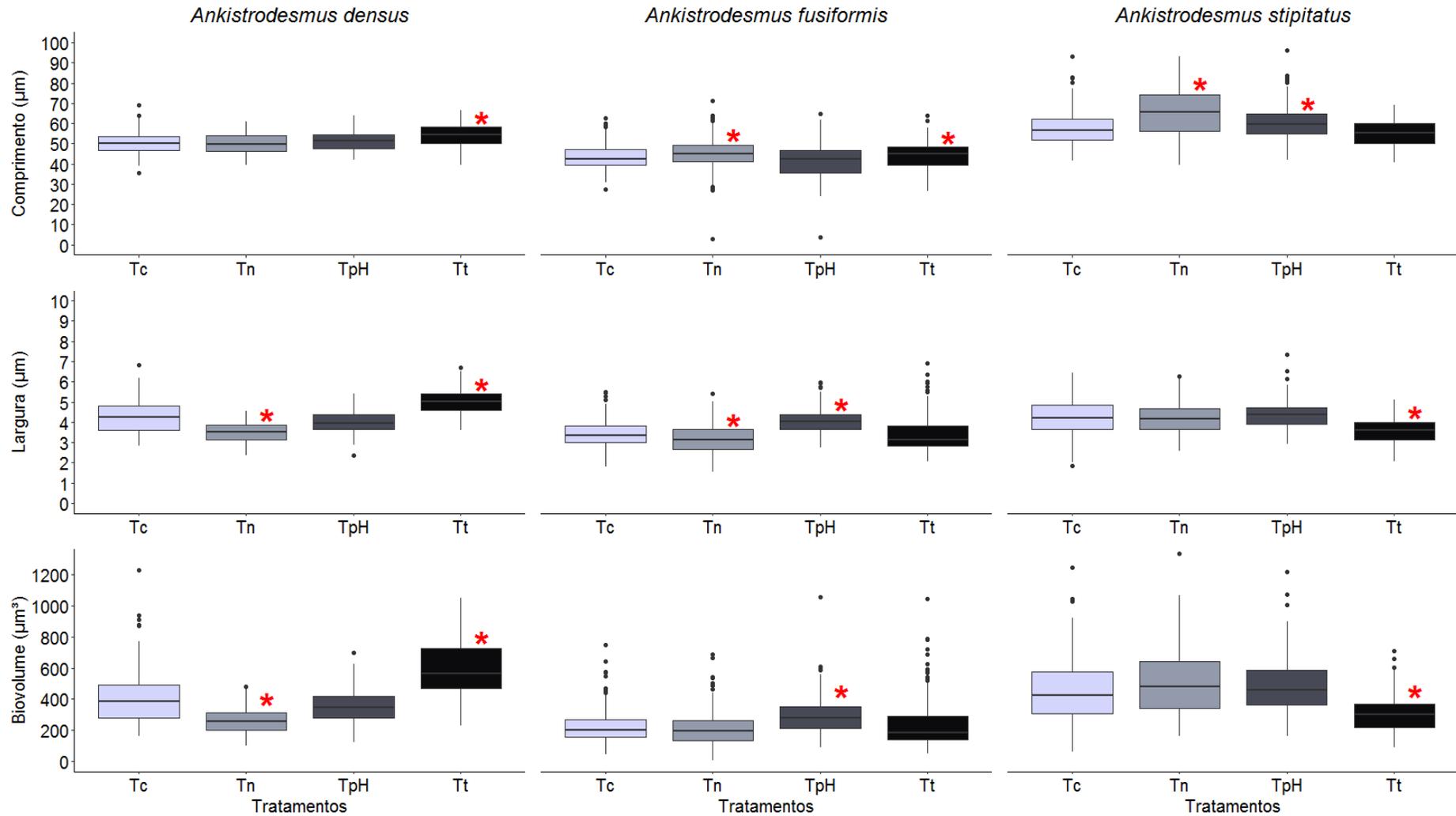
Tabela 2. Valores médios de comprimento, largura e biovolume e variação (porcentagem) em relação ao Tc para as espécies *A. densus*, *A. fusiformis* e *A. stipitatus* no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn).

Espécies	Comprimento médio (μm)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
<i>A. densus</i>	50,67	54,72 (+7,99%)	51,34 (+1,32%)	50,33 (-0,67%)
<i>A. fusiformis</i>	43,06	44,13 (+2,37%)	41,26 (-4,55%)	45,17 (+4,70%)
<i>A. stipitatus</i>	57,69	54,99 (-3,88%)	60,08 (+4,70%)	65,82 (+13,66%)

Espécies	Largura média (μm)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
<i>A. densus</i>	4,29	4,98 (+16,26%)	4,01 (-6,44%)	3,504 (-18,25%)
<i>A. fusiformis</i>	3,41	3,41 (-0,29%)	4,12 (+20,85%)	3,22 (-5,95%)
<i>A. stipitatus</i>	4,23	4,02 (-5,49%)	3,88 (-7,29%)	4,22 (+0,41%)

Espécies	Biovolume médio (μm^3)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
<i>A. densus</i>	411,20	587,8 (+42,95%)	355,1 (-13,64%)	266,3 (-35,24%)
<i>A. fusiformis</i>	221,76	232,56 (+3,37%)	294,64 (+32,83%)	207,32 (-7,52%)
<i>A. stipitatus</i>	461,87	305,35 (-30,94%)	485,95 (+7,83%)	513,30 (+15,02%)

Figura 3. Boxplot do comprimento, largura e biovolume celular de *A. densus* (1 cepa), *A. fusiformis* (4 cepas) e *A. stipitatus* (2 cepas) no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn). O asterisco indica significância estatística com $p < 0,05$ em relação ao Tc; $n=270$ para *A. densus*; $n=1080$ para *A. fusiformis* e $n=540$ para *A. stipitatus*.



Para *Ankistrodesmus fusiformis* (CCMA – UFSCar 333, CCMA – UFSCar 578, CCMA – UFSCar 605, CB 2009_30), foi observado que o aumento da temperatura promoveu um aumento significativo do comprimento celular (Figura 3). Além disso, a mudança de pH promoveu um aumento significativo médio de aproximadamente 20% (Tabela 2) na largura das células da espécie (Figura 3). As medidas de comprimento aumentaram e de largura diminuíram significativamente no tratamento de nitrogênio, levando a uma redução de 7,5%, em média, no biovolume das células. Embora para a redução de nitrato a resposta do biovolume celular tenha seguido um padrão semelhante ao encontrado em *A. densus*, para o aumento de pH a resposta foi inversa. Em *A. fusiformis* o aumento de pH levou a um aumento significativo no biovolume (Figura 3, Tabela 2). O aumento de temperatura também reduziu o biovolume médio das células desta espécie, mas as alterações não foram significativamente diferentes do controle (Figura 3).

Apesar dos resultados para a espécie de *A. fusiformis*, houve diferenças nas respostas das diferentes cepas (CCMA-UFSCar 333, CCMA-UFSCar 578, CCMA-UFSCar 605, CB 2009_30) aos diversos tratamentos. No tratamento de pH, enquanto o comprimento celular das cepas CCMA-UFSCar 333 e CCMA-UFSCar 578 reduziu, houve aumento no comprimento da cepa CCMA-UFSCar 605 (Figura 4). No entanto, a largura celular de todas as cepas apresentou aumento significativo, chegando em média, a 27% (Tabela 3) em relação ao tratamento controle. Com o aumento de temperatura apenas a cepa 605 apresentou alteração significativa do comprimento celular (aumento de 11% em relação ao controle; Tabela 3); no entanto, a largura foi significativamente alterada nas 4 cepas de *A. fusiformis*, com redução nas cepas 333, 578 e 605, e aumento na cepa CB 2009_30. Já a redução na concentração de nitrato ocasionou um aumento no comprimento celular das cepas 333, 578 e 605; a largura sofreu uma redução nas cepas 333, 578 e 605, e um aumento na cepa 2009_30 (Figura 4). De forma geral, o aumento de pH aumentou o biovolume de todas as cepas desta espécie (Tabela 3), no entanto, o aumento não foi significativo para a cepa CB 2009_30. O biovolume desta cepa aumentou significativamente com aumento de temperatura e com redução de nutrientes, apresentando, portanto, diferença em relação às outras cepas. As cepas CCMA-

UFSCar 333, 578 e 605 tiveram o biovolume reduzido em Tt e Tn (Tabela 3). No entanto, a redução foi significativa apenas para 333 e 578 com aumento de temperatura, e para a 605 com a diminuição de nitrato (Figura 4).

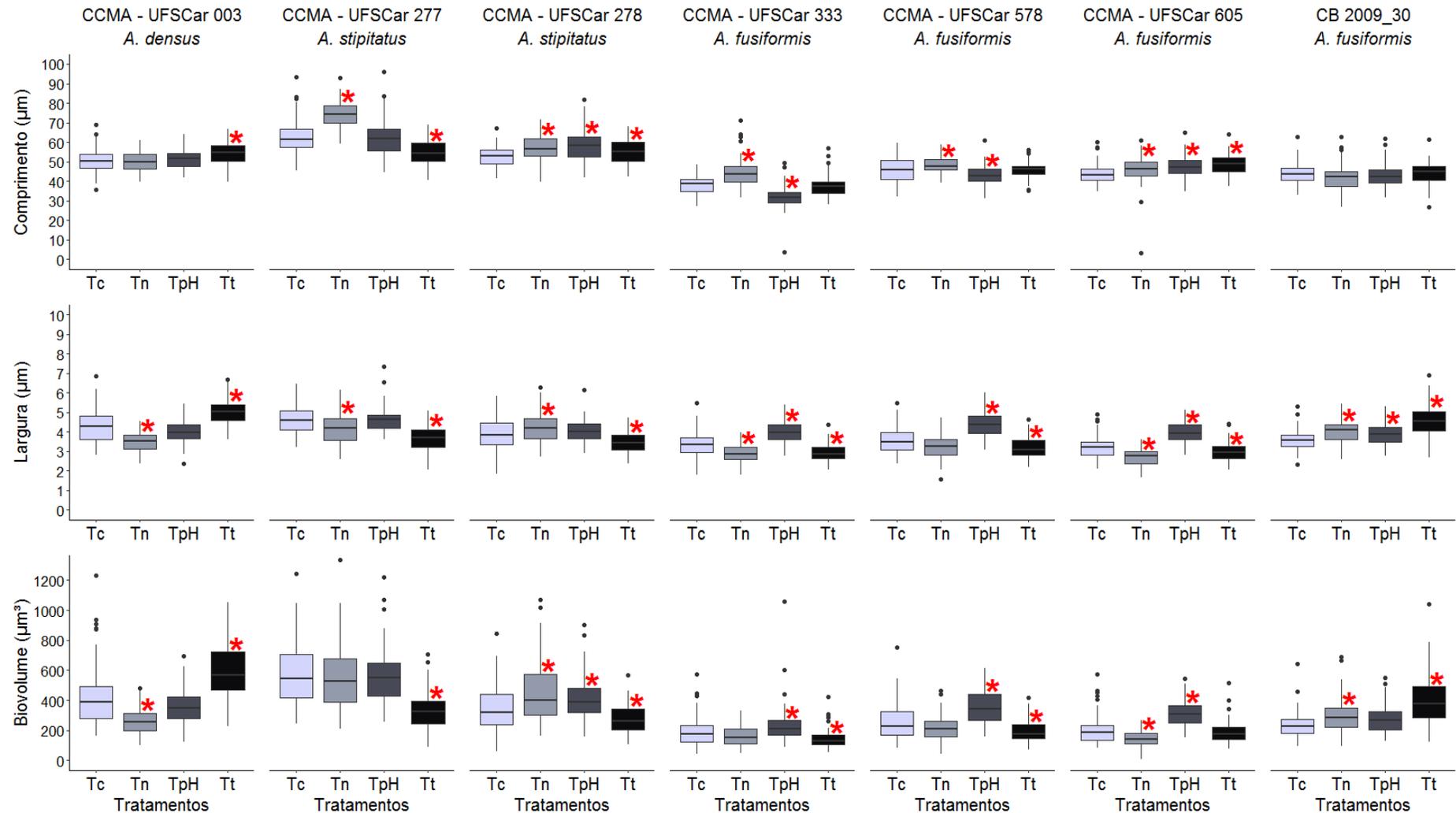
Tabela 3. Valores médios de comprimento, largura e biovolume e variação (porcentagem) em relação ao Tc para as cepas CCMA – UFSCar 003, CCMA – UFSCar 277, CCMA – UFSCar 278, CCMA – UFSCar 333, CCMA – UFSCar 578, CCMA – UFSCar 605 e CB 2009_30 no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn).

Cepas	Comprimento médio (μm)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
CCMA-UFSCar 003	50,67	54,72 (+7,99%)	51,34 (+1,32%)	50,33 (-0,67%)
CCMA-UFSCar 277	62,86	54,8 (-12,82%)	61,89 (-1,54%)	74,45 (+18,44%)
CCMA-UFSCar 278	52,52	55,18 (+5,06%)	58,27 (+10,95%)	57,19 (+8,89%)
CCMA-UFSCar 333	38,49	37,72 (-2%)	31,94 (-17,02%)	44,39 (+15,33%)
CCMA-UFSCar 578	46,1	45,78 (+0,69%)	43,06 (-6,59%)	48,24 (+4,64%)
CCMA-UFSCar 605	43,92	48,85 (+11,22%)	47,43 (+7,99%)	45,78 (+4,23%)
CB 2009_30	43,74	44,16 (+0,96%)	42,62 (-2,56%)	42,25 (-3,41%)

Cepas	Largura média (μm)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
CCMA-UFSCar 003	4,29	4,98 (+16,26%)	4,01 (-6,44%)	3,504 (-18,25%)
CCMA-UFSCar 277	4,59	4,60 (+0,20%)	3,70 (-19,32%)	4,18 (-9,02%)
CCMA-UFSCar 278	3,88	3,44 (-11,17%)	4,10 (+4,75%)	4,26 (+9,83%)
CCMA-UFSCar 333	3,34	2,96 (-11,27%)	4,24 (+27,24%)	2,91 (-12,80%)
CCMA-UFSCar 578	3,51	3,17 (-9,63%)	4,40 (+25,44%)	3,236 (-7,81%)
CCMA-UFSCar 605	3,24	2,97 (-8,17%)	3,93 (+21,31%)	2,704 (-16,62%)
CB 2009_30	3,55	4,54 (+27,91%)	3,88 (+9,41%)	4,027 (+13,40%)

Cepas	Biovolume médio (μm^3)			
	Tc	Tt	TpH	Tn
CCMA-UFSCar 003	411,2	587,8 (+42,95%)	355,1 (-13,64%)	266,3 (-35,24%)
CCMA-UFSCar 277	575,4	328,3 (-42,94%)	559,2 (-2,82%)	571 (-0,76%)
CCMA - UFSCar 278	348,33	282,4 (-18,93%)	412,7 (+18,48%)	455,6 (+30,80%)
CCMA-UFSCar 333	192,33	144,1 (-25,08%)	231,17 (+20,19%)	166,55 (-13,40%)
CCMA-UFSCar 578	252,37	201,26 (-20,25%)	357,1 (+41,50%)	220,32 (-12,70%)
CCMA-UFSCar 605	204,7	187,37 (-8,47%)	313,5 (+53,15%)	145,51 (-28,92%)
CB 2009_30	237,64	397,5 (+67,27%)	276,8 (+16,48%)	296,9 (+24,94%)

Figura 4. Boxplot de comprimento, largura e biovolume celular das cepas CCMA – UFSCar 003, CCMA – UFSCar 277, CCMA – UFSCar 278, CCMA – UFSCar 333, CCMA – UFSCar 578, CCMA – UFSCar 605 e CB 2009_30 no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrito (Tn). O asterisco indica significância estatística com $p < 0,05$ em relação ao Tc; $n = 90$ para cada cepa em cada tratamento.



Apenas a medida de comprimento foi significativamente afetada (aumentou) pelo tratamento de pH quando analisamos a espécie *Ankistrodesmus stipitatus* (CCMA – UFSCar 277 e CCMA – UFSCar 278). Para o tratamento de temperatura tanto largura quanto biovolume tiveram redução significativa de tamanho (Figura 3). O tratamento de nitrogênio aumentou significativamente apenas o comprimento celular da espécie. Os tratamentos alteraram as medidas de comprimento e/ou largura, porém apenas o aumento da temperatura resultou em redução significativa (média de 30%) para o biovolume.

As cepas CCMA – UFSCar 277 e CCMA – UFSCar 278 responderam de forma variada aos tratamentos. O tratamento de pH promoveu um aumento no comprimento celular na cepa 278. Enquanto o aumento de temperatura reduziu o comprimento e aumentou a largura na cepa 277, e o contrário foi observado na cepa 278, com aumento do comprimento e redução da largura. Para o tratamento de nitrogênio a cepa 277 teve seu comprimento aumentado e sua largura diminuída, enquanto para a cepa 278 tanto comprimento quanto largura tiveram aumento significativo (Figura 4). A medida de biovolume teve alteração significativa apenas no tratamento de temperatura para espécie *A. stipitatus* (Figura 3), pois as duas cepas tiveram o seu biovolume reduzido em Tt. No entanto, os tratamentos de pH e nitrato também reduziram o biovolume da cepa 277 (Figura 4), enquanto aumentaram o biovolume da 278 (Figura 4).

4.2 Separação de espécies em *Ankistrodesmus* sob diferentes condições ambientais

Os resultados indicam que usando as várias medidas de comprimento e largura foi possível diferenciar *A. densus* de *A. fusiformis* (Figura 5), uma vez que estas tiveram diferenças estatísticas significativas em todos os tratamentos, exceto para largura com aumento de pH.

Usando as medidas de comprimento e largura foi possível diferenciar *A. fusiformis* de *A. stipitatus* para todos os tratamentos. Para *A. stipitatus* e *A. densus* a diferença no comprimento foi significativa para os tratamentos controle,

pH e nitrogênio; os tratamentos de temperatura, pH e nitrogênio modificaram significativamente a largura entre as espécies, diferenciando-as (Figura 5).

Usando as várias medidas de biovolume foi possível diferenciar as três espécies (*A. densus*, *A. fusiformis* e *A. stipitatus*) em todos os tratamentos, exceto no Tc, onde o biovolume não apresentou diferença significativa entre *A. densus* e *A. stipitatus* (Figura 5).

Para as cepas, o tratamento de pH foi o que mais modificou significativamente o comprimento, exceto quando comparadas as cepas CCMA – UFSCar 003 e CCMA – UFSCar 605, CCMA – UFSCar 277 e CCMA – UFSCar 278, CCMA – UFSCar 578 e CB 2009_30, separando-as (Figura 6); para largura, os tratamentos de temperatura e redução de nitrato foram os que mais alteraram significativamente a medida, com exceções mostradas na Figura 6. Para a análise de biovolume, novamente os tratamentos de temperatura e nitrato foram os que melhor separaram as cepas, com exceções para ambos os tratamentos, apresentadas na Figura 6.

Figura 5. Comparação das medidas de comprimento, largura e biovolume entre *A. densus* (1 cepa), *A. fusiformis* (4 cepas) e *A. stipitatus* (2 cepas) em cada um dos tratamentos. As letras entre parênteses indicam significância estatística com $p < 0,05$; $n=270$ para *A. densus*; $n=1080$ para *A. fusiformis* e $n=540$ para *A. stipitatus*.

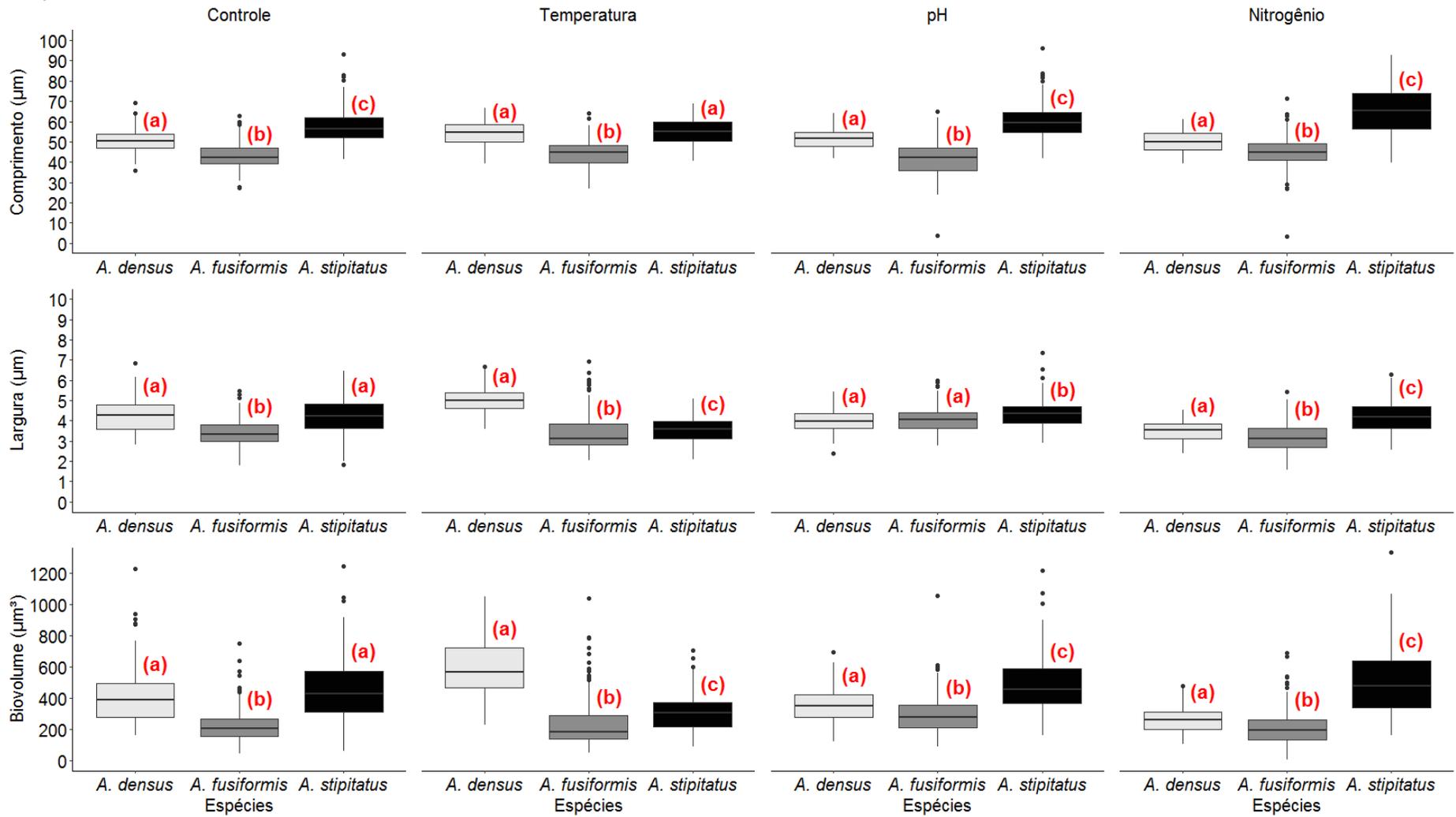
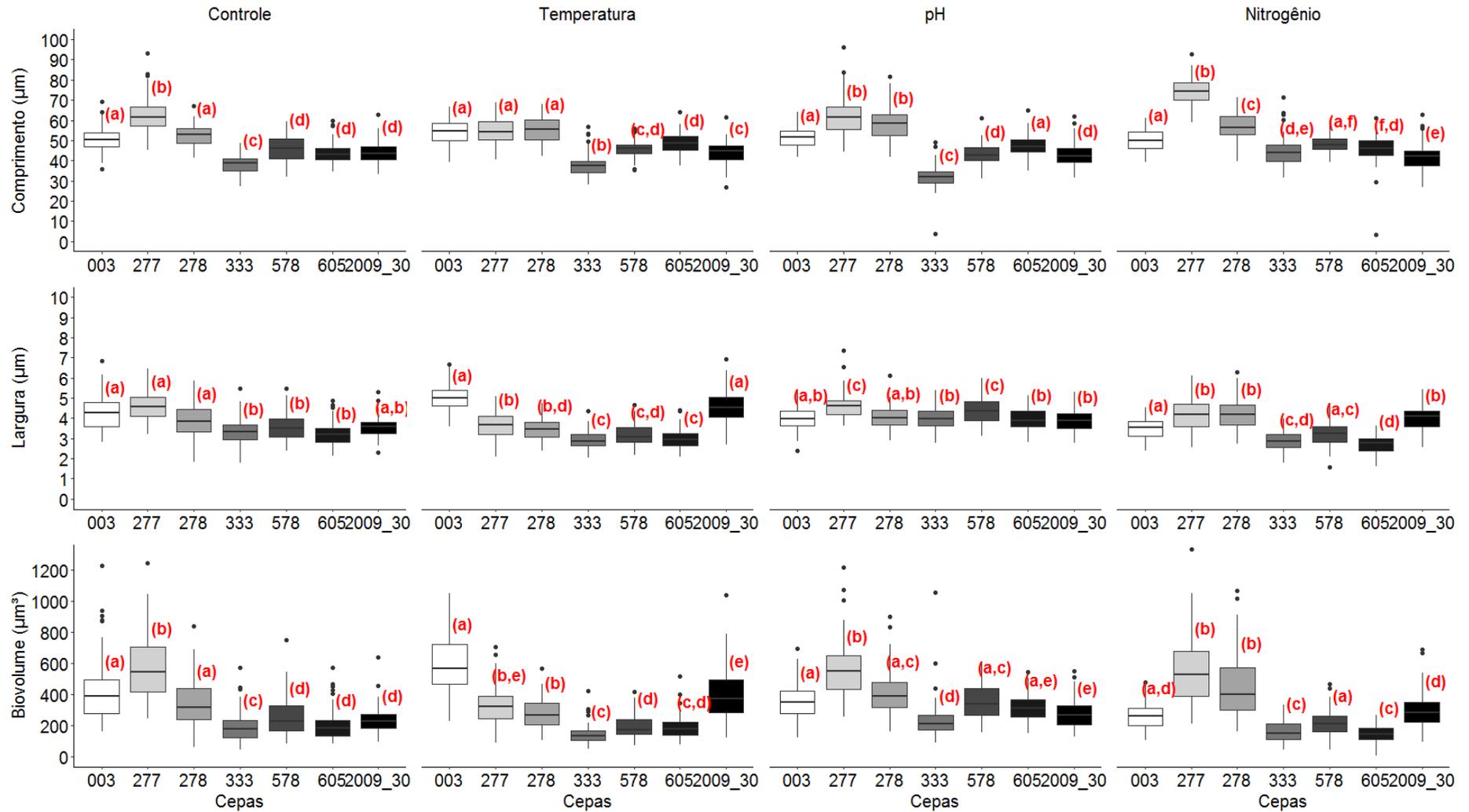


Figura 6. Comparação das medidas de comprimento, largura e biovolume entre as cepas CCMA – UFSCar 003, CCMA – UFSCar 277, CCMA – UFSCar 278, CCMA – UFSCar 333, CCMA – UFSCar 578, CCMA – UFSCar 605 e CB 2009_30 em cada um dos tratamentos. As letras entre parênteses indicam significância estatística com $p < 0,05$; $n = 90$ para cada cepa em cada tratamento.



4.3 Taxa de crescimento e separação de espécies em *Ankistrodesmus* sob diferentes condições ambientais

Analisando as taxas de crescimento foi observado que todas as espécies (Figura 7), bem como todas as cepas (Figura 8) cresceram, independente do tratamento. Quando analisamos as espécies, a taxa de crescimento de *A. fusiformis* foi alterada apenas no tratamento de pH e a de *A. stipitatus* nos tratamentos de pH e temperatura; *A. densus* não teve sua taxa de crescimento alterada em nenhum tratamento (Figura 7).

No tratamento de temperatura, a maioria cepas teve aumento na taxa de crescimento, ainda que significativo apenas para CCMA – UFSCar 278 (Figura 8). No tratamento com aumento de pH, também mostraram aumento na taxa de crescimento apesar de ter sido significativo apenas para CCMA – UFSCar 278, CCMA – UFSCar 333 e CCMA – UFSCar 578 (Figura 8). Apenas a cepa 278 sofreu aumento significativo na taxa de crescimento para o tratamento de nitrogênio (Figura 8) em relação ao controle.

Figura 7. Taxa de crescimento das espécies no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn). O asterisco indica significância estatística com $p < 0,05$ em relação ao Tc; $n=3$ para *A. densus* (1 cepa); $n=12$ para *A. fusiformis* (4 cepas) e $n=6$ para *A. stipitatus* (2 cepas).

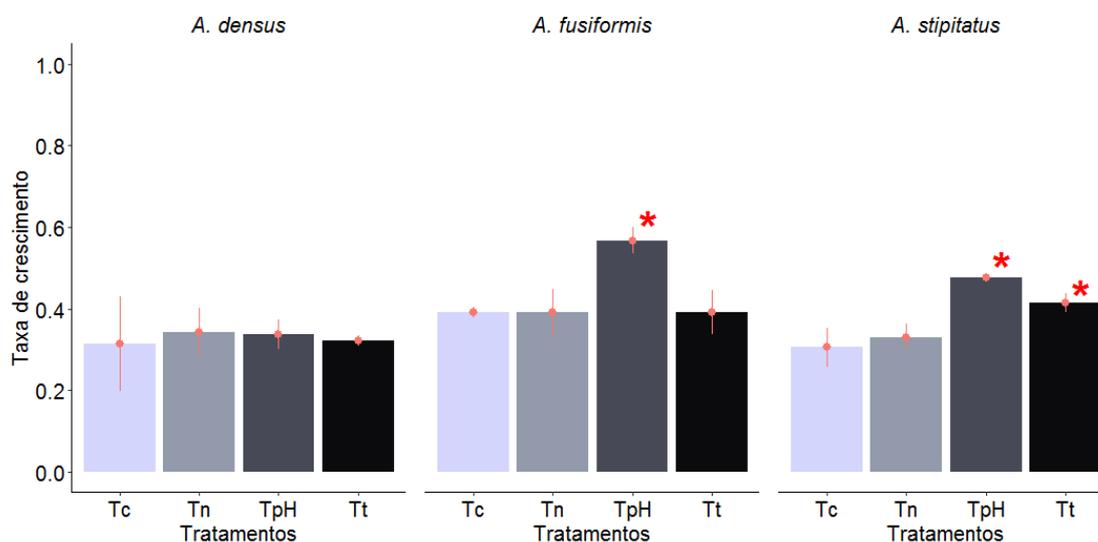
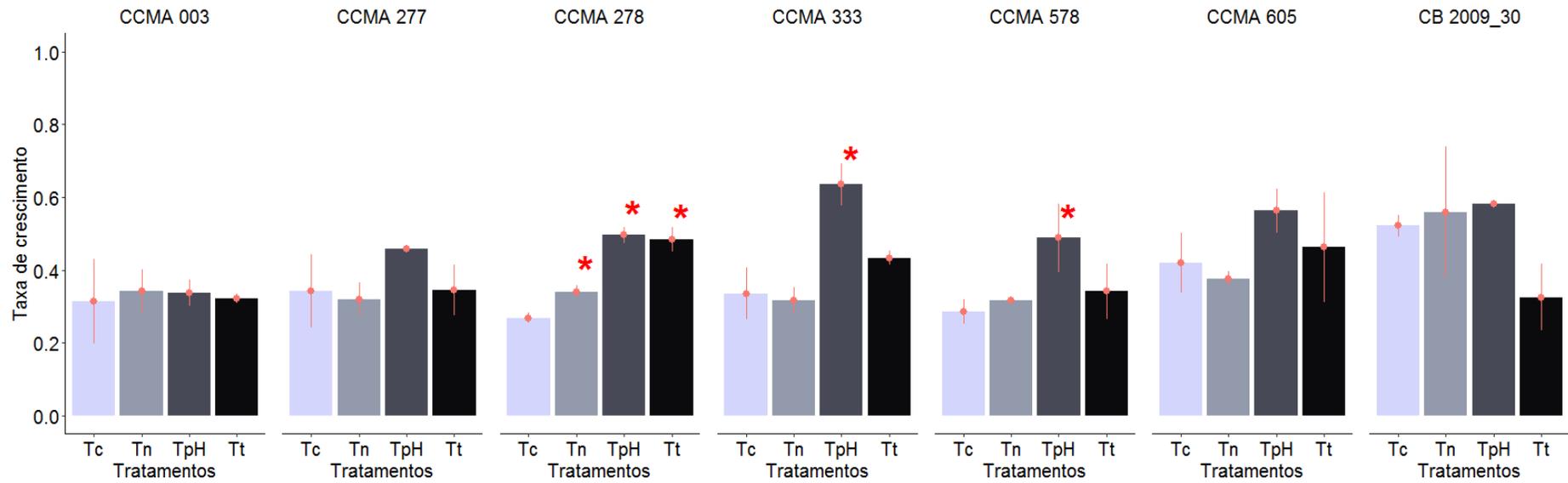


Figura 8. Taxa de crescimento das cepas no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn). O asterisco indica significância estatística com $p < 0,05$ em relação ao Tc; $n=3$ para cada cepa em cada tratamento.



Ao testar a taxa de crescimento como parâmetro para separação interespecífica (Figura 9), apenas o tratamento de pH alterou significativamente a taxa de crescimento entre as espécies de *Ankistrodesmus*.

Em relação aos dados morfométricos, considerando a variação causada por todos os tratamentos (juntando todos os dados por variável, independente do tratamento) tanto comprimento quanto biovolume separaram as três espécies, porém o comprimento é a medida onde há menor sobreposição de valores entre as espécies (Figura 10).

Considerando todos os dados morfométricos (comprimento e largura) e taxa de crescimento em conjunto, a análise integrada (PERMANOVA) mostrou que há diferença significativa ($p = 0,001$; p -ajustado=0,03) entre as espécies apesar da plasticidade fenotípica (Figura 11). Na Figura 11, o eixo NMDS2, aparentemente mais relacionado à variação intraespecífica, mostra que a cepa CB 2009_30 proveniente do Quênia é mais distante das demais cepas de *A. fusiformis*.

Figura 9. Comparação da taxa de crescimento entre as cepas e entre as espécies no controle (Tc) e nos tratamentos com aumento de pH (TpH), temperatura (Tt) e redução de nitrato (Tn). As letras entre parênteses indicam significância estatística entre as cepas e entre as espécies ($p < 0,05$); $n=90$ para cada cepa em cada tratamento; $n=270$ para *A. densus* (1 cepa); $n=1080$ para *A. fusiformis* (4 cepas) e $n=540$ para *A. stipitatus* (2 cepas).

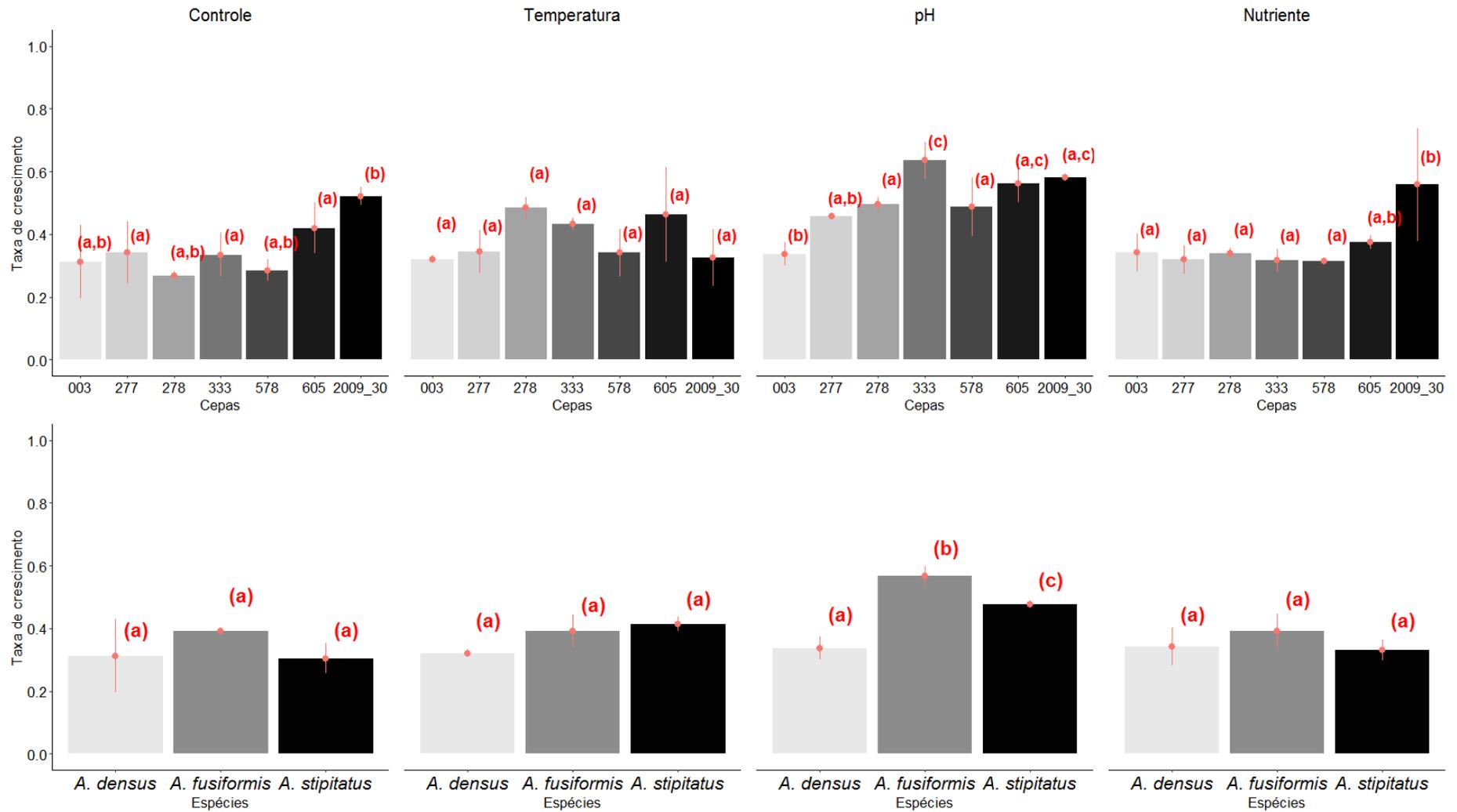


Figura 10. Comparação entre as medidas de comprimento, largura e biovolume para *A. densus* (1 cepa), *A. fusiformis* (4 cepas) e *A. stipitatus* (2 cepas) combinando todos os tratamentos. As letras entre parênteses indicam significância estatística com $p < 0,05$; $n=270$ para *A. densus*; $n=1080$ para *A. fusiformis* e $n=540$ para *A. stipitatus*.

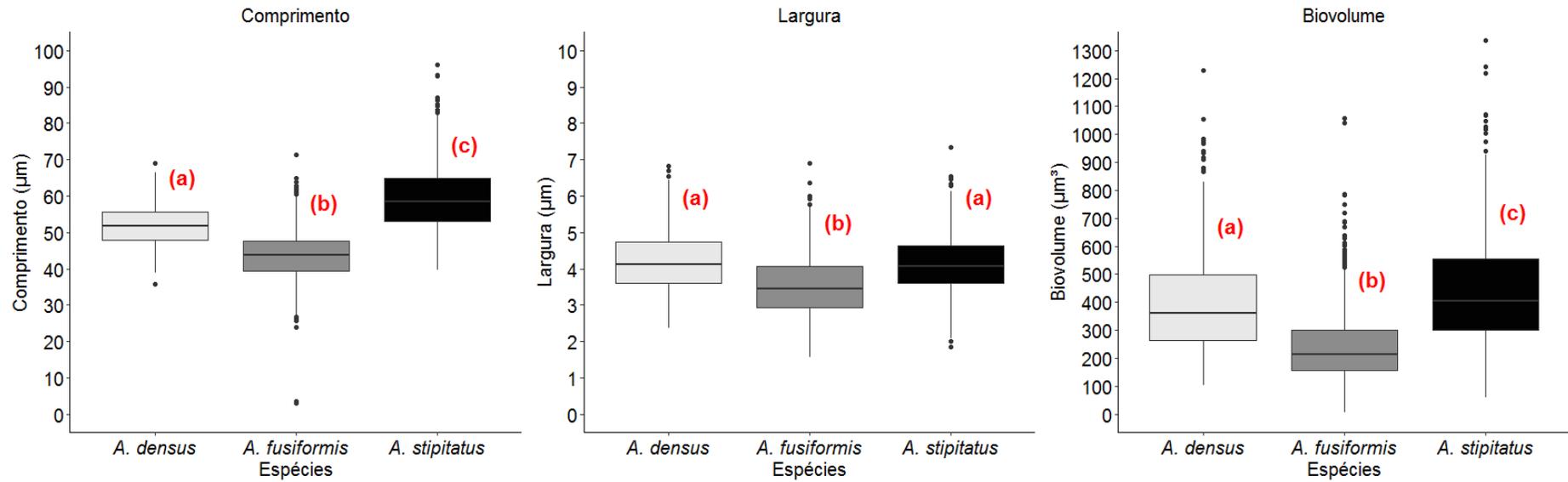
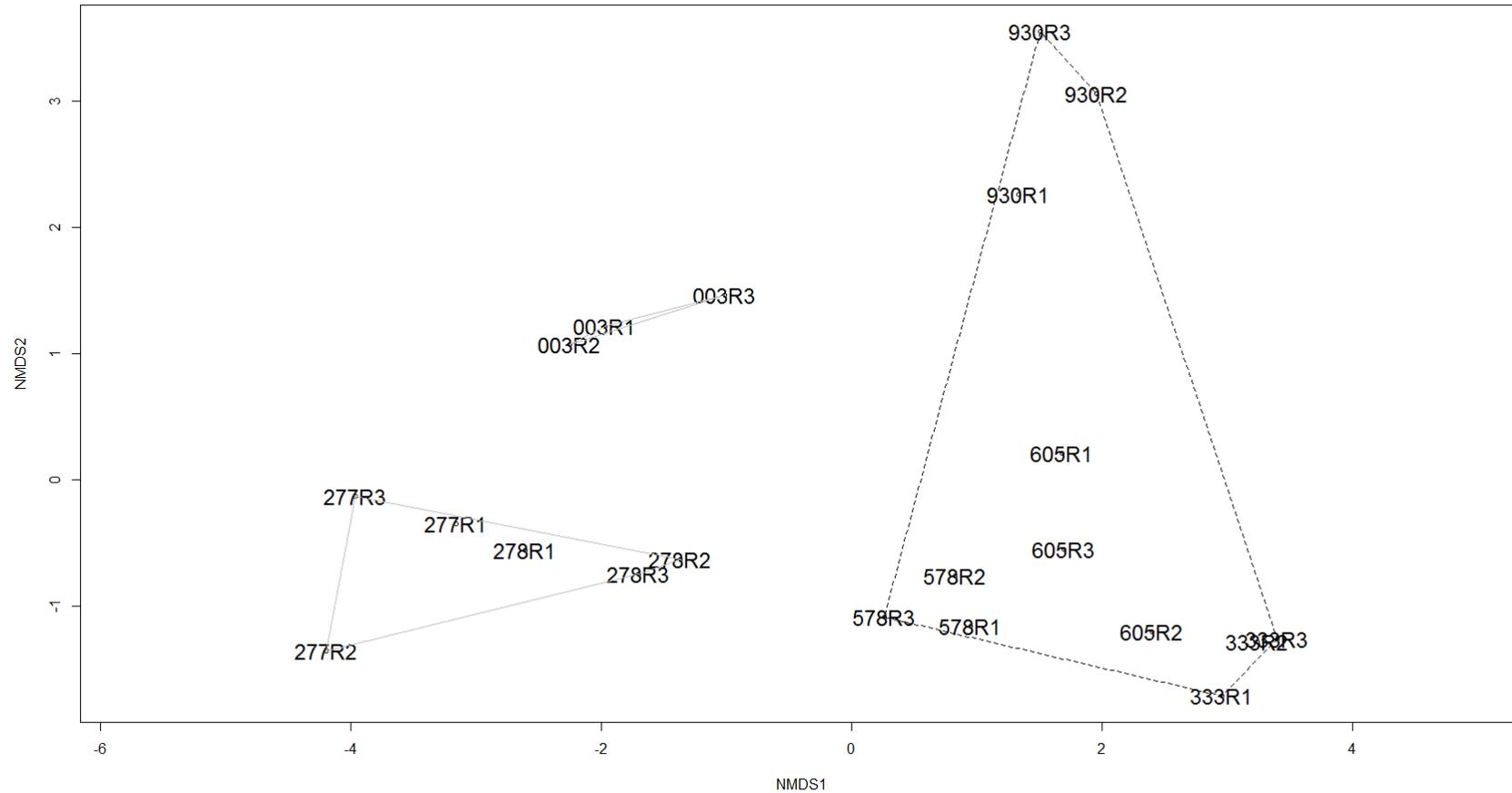


Figura 11. Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das diferentes cepas utilizando comprimento, largura e taxa de crescimento como parâmetros. Os polígonos conectam as diferentes espécies morfológicas e genéticas determinadas em trabalhos anteriores. Stress = 0.065



5 Discussão

As características ecológicas de um habitat emergem a partir da interação dos organismos vivos e dos fatores abióticos presentes. O tamanho celular é um traço de diversidade funcional e está associado à maneira com que o fitoplâncton interage com o ambiente, influenciando na absorção de luz, afundamento, captura de nutrientes e predação (IRWIN *et al.*, 2006; ACEVEDO-TREJOS, 2015). Além disso, o tamanho celular é característica utilizada na taxonomia do fitoplâncton (e.g. BICUDO & MENEZES, 2017) e em muitos estudos ecológicos e limnológicos, a morfologia é a única característica possível de ser avaliada para levantamentos de diversidade, de modo que conhecer a plasticidade fenotípica é muito importante para evitar erros de identificação.

A fim de analisar se o tamanho celular pode ser usado na delimitação das espécies do gênero *Ankistrodesmus*, considerando sua plasticidade morfológica, nós realizamos o crescimento das cepas em diferentes condições de cultivo. Todas as cepas apresentaram alguma resposta significativa às variações abióticas quando comparadas ao controle, apesar de não necessariamente responderem da mesma forma entre si, nem entre tratamentos. Utilizando as medidas morfométricas separadamente (Figura 10) ou de forma integrada (junto com a taxa de crescimento) (Figura 11), foi possível separar as três espécies do gênero. A taxa de crescimento isoladamente não separou espécies, exceto no tratamento de pH (Figura 9). De forma geral, o comprimento foi o parâmetro que melhor diferenciou as espécies. Os dados obtidos podem auxiliar na delimitação de espécies no gênero, pois corroboram a separação entre *A. fusiformis* e *A. stipitatus* que, em análises filogenéticas utilizando as mesmas cepas (dados não publicados), assim como em outros trabalhos com diferentes cepas dessas espécies (Krienitz *et al.* 2011), formam clados muito próximos.

Em relação às principais alterações fenotípicas no gênero, com exceção da CCMA-UFSCar 003 e CB 2009_30, todas as cepas sofreram redução no biovolume celular com o aumento da temperatura, resposta esperada de acordo com a lei de Bergman (BERGMANN, C., 1847 *apud* ZOHARY *et al.*, 2020) e já evidenciada em diversos estudos com fitoplâncton (MARGALEF, 1954; SOARES, LÜRLING, HUSZAR, 2013; PETER, SOMMER, 2015; ZOHARY *et al.*,

2020), incluindo algumas Sphaeropleales, mas sem dados para *Ankistrodesmus* e outras Selenastraceae. Apesar de raras, existem exceções a lei de Bergman (ZOHARY *et al.*, 2020), como encontrado neste estudo. Em recente revisão, ZOHARY *et al.* (2020), mostraram que o efeito da temperatura na plasticidade de tamanho do fitoplâncton pode ser direto, por meio da interferência no metabolismo e na fisiologia, ou indireto, pois em ambiente natural pode afetar a disponibilidade de nutrientes, a predação e a densidade e viscosidade do meio (MORALES, TRAINOR, 1997; ATKINSON *et al.* 2003; ZOHARY *et al.* 2020). Tais efeitos refletem em mudanças na aparência do organismo, uma vez que é necessário se adaptar as novas condições do ambiente para sobreviver e melhor aproveitar os recursos disponíveis (MORALES E TRAINOR, 1997; DURANTE *et al.*, 2019; ZOHARY *et al.* 2020).

Resultado semelhante foi encontrado no tratamento de redução de nitrato, no qual a maioria das espécies teve seu biovolume reduzido, concordantemente com outros estudos realizados com redução de nitrogênio (KILHAM *et al.*, 1997; IRWIN *et al.*, 2006; BONACHELA, RAGHIB, LEVIN, 2011; MARAÑÓN *et al.*, 2012; PETER, SOMMER, 2015). Organismos fitoplanctônicos com menor tamanho celular são geralmente dominantes em ambiente com limitação de nutrientes, porque tanto o transporte de nutrientes do meio para o interior celular quanto a assimilação intracelular desses nutrientes são facilitados em células com maior razão superfície: volume (IRWIN *et al.*, 2006; LITCHMAN *et al.* 2007; BONACHELA, RAGHIB, LEVIN, 2011; MARAÑÓN *et al.*, 2012). Isso se deve à flexibilidade do aparato de absorção de nutrientes, que se adapta a ambientes com baixa concentração de nutrientes aumentando a quantidade de sítios de ligação presentes na superfície da membrana celular, assim como a velocidade com que tais sítios ficam livres, até que a demanda por nutrientes seja suprida (AKSNES, EGGE, 1991; BONACHELA, RAGHIB, LEVIN, 2011;). Nesse caso, quanto maior a área superficial da célula, mais espaço para os receptores e maior a taxa de absorção dos nutrientes.

Diversos estudos mostram que o aumento do pH pode interferir no desenvolvimento do organismo, uma vez que tais alterações promovem mudanças na disponibilidade de carbono inorgânico e na permeabilidade da

membrana (CHEN, DURBIN, 1994; LOCKE, SPRULES, 2000; HANSEN, 2002; UNREIN *et al.*, 2010; CHAKRABORTY *et al.*, 2011; BEARDALL, RAVEN, 2020) e tais efeitos podem ser tanto positivos quanto negativos variando de acordo com a espécie ou cepa estudada (LOCKE, SPRULES, 2000; UNREIN *et al.*, 2010; CHAKRABORTY *et al.*, 2011). Os resultados indicam que *A. fusiformis* e *A. stipitatus* se beneficiaram com o aumento de pH, considerando que para ambas as espécies, houve o aumento no tamanho celular e das taxas de crescimento em comparação ao controle. No entanto, para *A. densus* a alteração do pH utilizada não resultou em alteração fisiológica. É provável que os efeitos do pH no crescimento estejam relacionados com a disponibilidade e assimilação de carbono inorgânico (CHEN, DURBIN, 1994; HANSEN, 2002; CHAKRABORTY *et al.*, 2011), porém tais mecanismos estão além do escopo deste trabalho (para mais informações, consultar a literatura detalhada em GRIFFITHS, MEYER, RICKABY, 2017; BEARDALL, RAVEN, 2020, pg. 141-160).

As cepas 277 e 278 (*A. stipitatus*), apesar de terem sido isoladas do mesmo local e no mesmo ano, apresentaram diferenças nas respostas. Embora pertencentes à mesma espécie filogenética, elas também apresentaram diferenças em relação ao 18S rDNA (Garcia *et al.* 2017). Outros estudos já mostraram resultados semelhantes para microalgas (XIAO, WILLIS, BURFORD, 2017; MESQUITA *et al.*, 2020), evidenciando a variação intraespecífica resultado da plasticidade fenotípica de cada cepa.

Outro exemplo de variação intraespecífica ocorreu em *A. fusiformis*, para a qual entre as 4 cepas estudadas, apenas a cepa 2009_30 teve aumento de biovolume do tratamento de temperatura e de nutrientes. É possível, portanto, que a resposta única da cepa CB 2009_30 seja devido a sua origem (MELLO *et al.*, 2017; MCCAULEY *et al.*, 2009). Esta cepa pode possuir uma plasticidade ancestral diferente das demais (WEST-EBERHARD, 2003; FUKAMI, 2015; VASS, LANGENHEDER, 2017), pois por ter origem em outro continente pode apresentar um histórico de variação ambiental diferente, influenciando sua resposta às condições de cultivo impostas (VASS, LANGENHEDER, 2017). Estudos de diversidade em ambientes naturais baseados em análises

morfológicas e que disponibilizem também as características abióticas podem auxiliar em trabalhos de delimitação de espécies.

Neste trabalho, pudemos verificar que apenas o uso de dados morfométricos de poucos indivíduos e em condições abióticas diferentes (ou desconhecidas) para espécies muito próximas, pode levar a identificações erradas, pois há sobreposição de tamanhos, especialmente considerando a plasticidade fenotípica (LENARCZYK, SAŁUGA e PIATEK, 2020). Contudo, o conjunto de plasticidade fisiológica (que segundo BRADSHAW, 1965, inclui a plasticidade morfológica) obtido pelo cultivo em diferentes condições, nos forneceu evidência de que a identificação morfológica e genética prévia do gênero *Ankistrodesmus* separa organismos fisiologicamente diferentes. Embora a associação de morfologia e filogenia seja, muitas vezes, suficiente para delimitar espécies, em alguns casos, como em alguns protistas, há dúvidas sobre quanto de variação podemos considerar para representar diferentes espécies (CARON & HU, 2018; MALAVASI *et al.* 2016).

Estudos fisiológicos ou ecológicos podem ajudar a esclarecer problemas taxonômicos, além de fornecerem suporte para uma delimitação de espécies com significado ecológico e funcional. Embora dados moleculares certamente auxiliem na delimitação específica (e.g. LELIAERT *et al.* 2014), a identidade estritamente molecular pode levar à criação de espécies sem nenhuma diferença ecológica ou fisiológica (funcional) significativa como discutido para outros protistas (BOENIGK *et al.*, 2012), ou agrupar cepas com diferenças fisiológicas e ecológicas importantes, homogeneizando uma diversidade importante de uma perspectiva conservacionista. Os dados analisados até o momento para *Ankistrodesmus* apontam para diferenças fisiológicas (incluindo alterações morfológicas em diferentes condições) entre as espécies delimitadas inicialmente.

É importante ressaltar que a interpretação dos dados deve ser cuidadosa, visto que a medição de poucos indivíduos, ou desconhecimento das condições ambientais, poderia levar à confusão entre as espécies utilizando identificação baseada apenas em dimensões celulares, pois há sobreposição de tamanhos entre as populações, especialmente considerando a plasticidade nos diferentes

tratamentos. Trabalhos sobre plasticidade fenotípica como este, podem auxiliar a circunscrever melhor os tamanhos médios, máximos e mínimos para as espécies.

6 Conclusão

1. Os resultados demonstram a existência de plasticidade fenotípica nos organismos estudados. A plasticidade morfológica ocorreu em mais cepas do que alterações na taxa de crescimento;
2. As cepas de uma mesma espécie apresentaram variação intraespecífica, em alguns casos respondendo de forma diferente aos tratamentos. A variação da cepa CB 2009_30 em relação às demais demonstra a necessidade de estudos com cepas de diferentes continentes, bem como a anotação de dados abióticos no momento da coleta para futuras comparações;
3. Apesar das variações intraespecíficas, foi possível diferenciar *A. densus*, *A. fusiformis* e *A. stipitatus* pelos tamanhos celulares em diferentes condições ambientais ao utilizar médias de ao menos 90 células, o que indica diferenças fisiológicas entre as espécies filogenéticas previamente delimitadas (mesmo as mais próximas como *A. fusiformis* e *A. stipitatus*). No entanto, é importante ressaltar que embora as médias sejam diferentes, ainda há sobreposição nos tamanhos entre as espécies.

Referências bibliográficas

- ACEVEDO-TREJOS, E. et al. Mechanisms shaping size structure and functional diversity of phytoplankton communities in the ocean. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8918, 2015.
- AKSNES, D. L.; EGGE, J. K. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**. Oldendorf, v. 70, n. 1, p. 65-72, 1991.
- BAKER, P. T. The biological race concept as a research tool. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 27, p. 21- 25, 1967.
- BEARDALL, J., RAVEN, J. A. Structural and biochemical features of carbon acquisition in algae. In: LARKUM, A. W. D., GROSSMANN, A. R., RAVEN, J. A. (Ed.). *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*. **Springer**, Cham, p. 141-160, 2020.
- BICUDO, C. E., MENEZES, M.. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2ª ed. **Rima**, 2006.
- BOENIGK, J. *et al.* Concepts in protistology: species definitions and boundaries. **European journal of protistology** 48: 96-102. 2012.
- BONACHELA, J. A.; RAGHIB, M.; LEVIN, S. A. Dynamic model of flexible phytoplankton nutrient uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 51, p. 20633-20638, 2011.
- BOROWITZKA, M. A. Systematics, Taxonomy and Species Names: Do They Matter? p. 655-681. **The Physiology of Microalgae**. Springer, 2016.
- BRADSHAW, A. D. "Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants." **Advances in genetics**. v. 13, n. 1, p. 115-155, 1965.
- CARON, D. A., Hu S. K. Are we overestimating protistan diversity in nature? **Trends in Microbiology** 27:197-205. 2019.
- CHAKRABORTY, P. *et al.* Impact of salinity and pH on phytoplankton communities in a tropical freshwater system: An investigation with pigment analysis by HPLC. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 3, p. 614-620, 2011.
- CHEN, C.Y.; DURBIN, E. G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 109, p. 83-83, 1994.
- CORDA, J. A. C.. Nouvelles observations microscopiques. **Almanach de Carlsbad**. v.8, p. 179–198, 1838.

- DARIENKO, T. *et al.* Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. **PLoS ONE** v. 10, n. 6, p. 1–31, 2015.
- DURANTE, G. *et al.* Allometric scaling and morphological variation in sinking rate of phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 55, n. 6, p. 1386-1393, 2019.
- FAWLEY, M. W. *et al.* Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology** v. 42, n. 1, p. 142–154, 2005.
- FUKAMI, T.. Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, p. 1-23, 2015.
- GARCIA, T. S. *et al.* Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, Messastrum gen. nov. and Curvastrum gen. nov. **Fottea**, p. 1-19, 2017.
- GRIFFITHS, H., MEYER, M. T., RICKABY, R. E. M.. Overcoming adversity through diversity: aquatic carbon concentrating mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 14, p. 3689–3695, 2017.
- GRIFFITHS, M. J. *et al.* Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density, **J. Microbiol. Methods** v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.
- GUILLARD R. R. L.; LORENZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **J Phycol.** v. 8, p. 10-14, 1972.
- HANSEN, P. J. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, n. 3, p. 279-288, 2002.
- HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C.. Chlorococcales lato sensu (Chlorophyceae, excl. Desmodesmus e Scenedesmus) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 65, n. 1, p. 87-100, 2010.
- HILLEBRAND, H. *et al.* Cálculo do biovolume para microalgas pelágicas e bênticas. **Journal of Phycology** v. 35, p. 403-424, 1999.
- IRWIN, A. J. *et al.* Scaling-up from nutrient physiology to the size-structure of phytoplankton communities. **Journal of Plankton Research**, v. 28, n. 5, p. 459-471, 2006.

- KILHAM, S. *et al.* Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v. 38, n. 3, p. 591-596, 1997.
- KOMÁREK J. & FOTT, B.. Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7. Teil, 1. Hälfte. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chroococcales. **E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obemiller)**, Stuttgart, p.1043, 1983.
- KOMÁRKOVÁ–LEGNEROVÁ J.. The systematics and ontogenesis of the genera *Ankistrodesmus* Corda and *Monoraphidium* gen. nov. In: FOTT, B. (Ed.). Studies in Phycology, p. 75–122, **Academia**, Praga, 1969.
- KORSHIKOV, A. A.. Viznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]. Kyjv [Kiev]: Akad. **NAUK URSR**. p. 1-439, 1953.
- KRIENITZ, L. *et al.* Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology** v. 37, n. 5, p. 852–865, 2001.
- KRIENITZ, L., *et al.* SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta. **Journal of Phycology** 47:880-893. 2011.
- KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia** v. 698, n. 1, p. 295–326, 2012.
- LELIAERT, F. *et al.* DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v.49, p. 179–196, 2014.
- LENARCZYK, J.; SAŁUGA, M.; PIĄTEK, J. Integrative approach helps clarify confusing taxonomy of the *Pseudopediastrum boryanum* species complex (Chlorophyceae), including recognition of five distinct species. **Journal of Phycology**, v. 56, n. 6, p. 1557-1574, 2020.
- LITCHMAN E, *et al.* The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. **Ecol Lett.** v. 10, n. 12, p. 1170-81, 2007.
- LOCKE, A.; SPRULES, W. G.. Effects of acidic pH and phytoplankton on survival and condition of *Bosmina longirostris* and *Daphnia pulex*. **Hydrobiologia**, v. 437, n. 1, p. 187-196, 2000.
- MALAVASI, V. *et al.* DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: A re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **PLoS ONE** v. 11, n. 3, p. 1–25, 2016.

- MARANÓN, E. *et al.* Temperature, resources, and phytoplankton size structure in the ocean. **Limnology and Oceanography**, v. 57, n. 5, p. 1266-1278, 2012.
- MARGALEF, R.. Modifications induced by different temperatures on the cells of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). 1954.
- MCCAULEY *et al.* Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) based on rRNA gene sequences and microsatellite markers. **J. Phycol.** v. 45, p. 454 – 465, 2009.
- MELLO *et al.* MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green Microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**. v. 28, p. 151-160, 2017.
- MESQUITA, M. C. B. *et al.* Direct effects of temperature on growth of different tropical phytoplankton species. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 1-11, 2020.
- MINER, B. G. *et al.* Ecological consequences of phenotypic plasticity. **Trends in Ecology and Evolution** v. 20, n. 12, p. 685–692, 2005.
- OKSANEN, J. *et al.* Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2019.
- PETER, K. H.; SOMMER, U.. Interactive effect of warming, nitrogen and phosphorus limitation on phytoplankton cell size. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 5, p. 1011-1024, 2015.
- RAMOS, G. J. P. *et al.* Monoraphidium and Ankistrodesmus (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. **Hoehnea**, v. 39, n. 3, p. 421-434, 2012.
- R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- ŠKALOUD, P.; RINDI, F. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: A case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 60, n. 4, p. 350–362, 2013.
- SOARES, M. C. S.; LÜRLING, M.; HUSZAR, V. L. M.. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Phycological Research**, v. 61, n. 1, p. 61-67, 2013.
- STAUBER, L. The problem of physiological species with special reference to oysters and oyster drills. **Ecology**. v. 31, n. 1, p. 109–118, 1950.
- SUN, J. U. N.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research** v. 25, n.11, p. 1331-1346, 2003.

- UNREIN, F. *et al.* Phytoplankton response to pH rise in a N-limited floodplain lake: relevance of N₂-fixing heterocystous cyanobacteria. **Aquatic Sciences**, v. 72, n. 2, p. 179-190, 2010.
- VASS, M.; LANGENHEDER, S. The legacy of the past: effects of historical processes on microbial metacommunities. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 13-19, 2017.
- WEST-EBERHARD, M. J.. Developmental plasticity and evolution. **Oxford University Press**, 2003.
- XIAO, M.; WILLIS, A.; BURFORD, M. A.. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. **Harmful Algae**, v. 62, p. 84-93, 2017.
- ZOHARY, T.; FLAIM, G.; SOMMER, U.. Temperature and the size of freshwater phytoplankton. **Hydrobiologia**, p. 1-13, 2020.

ANEXO A – Curvas de crescimento.

