

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM MICROALGAS
VERDES DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE: UMA ABORDAGEM FISIOLÓGICA**

Naiara Carolina Pereira Archanjo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte de requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini

SÃO CARLOS - SP

JULHO 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Naiara Carolina Pereira Archanjo, realizada em 13/07/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini (UFSCar)

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi (UNIFESP)

Profa. Dra. Thais Beraldo Bittar (NEU)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

“Precisamos ter consciência de que muitas mulheres morreram para que pudéssemos ficar
vivas, termos liberdade de escolher e fazer o que quisermos.”

Elza Soares

Agradecimentos

Com muito carinho agradeço à Dra Inessa Lacativa Bagatini por acreditar em mim, e me presentear com ensinamentos diários, estar sempre presente, me orientar e corrigir em todos os momentos de trabalho no Laboratório de Ficologia. Agradeço também pela amizade, por todos os sentimentos que dividimos principalmente de amor e cumplicidade. Indignamo-nos juntas com uma série de acontecimentos que vivemos. Agradeço também por ser ela uma mulher forte e corajosa e levantar a bandeira da Ciência e muitas outras das quais me orgulho muito.

Agradeço também, com muito carinho, ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira por estar presente e me inspirar na vida acadêmica, por ser meu orientador durante o mestrado e ter me iniciado ao doutorado. Agradeço pelos conselhos, broncas, risadas e conversas que variam desde ciências à simples coisas cotidianas. Ele é realmente inspirador!

Agradeço aos amigos e colegas do laboratório de Ficologia pelas conversas, discussões, ajuda e apoio: Luiz Sartori, Letícia Tessarolli, Helena Vieira, Thaís Garcia, Guilherme de Moraes, Ingritt Moreira, Nathan Eugeni, Marcelo Malisano, Rodrigo Mello, Ana Beatriz Janduzzo, Suzana Fernandez, Jéssica Perboni e Ana Martins.

À Professora Dra. Odete Rocha pelas contribuições durante a qualificação, disponibilidade, e contribuições para a minha formação.

Agradecimento especial a Thaís Garcia por auxiliar diversas vezes sobre as dúvidas taxonômicas complicadíssimas da Família Selenastraceae e pelas contribuições durante a qualificação, disponibilidade, contribuindo para a minha formação. Ao Rodrigo Mello, vulgo Chico, por me ensinar os caminhos da espectrometria de massa MALDI TOF; a Ana Beatriz Janduzzo que me auxiliou nas imagens de microscopia óptica. E por fim, a Letícia Tessaroli por auxiliar em alguns experimentos genéticos e pelas maravilhosas e esclarecedoras conversas sobre Ciências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro por meio da bolsa de doutorado.

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela infraestrutura fornecida e pela formação acadêmica.

A todos os meus amigos do PPGERN pelas conversas, palavras de estímulo e apoio de sempre, especialmente a Helena Henriques Vieira, que no meio da loucura em que vivemos a encontrei, agradeço profundamente por sua amizade, confidências e por saber dividir momentos de alegrias, conquistas, tensões, enfim ela sabe dividir qualquer momento. Amo te!

Aos meus amigos de São Carlos, que me acompanharam desde a graduação (em Ilha Solteira). Aline e Fernando obrigado por me conhecerem tão bem. Ainda sobre os amigos, quero agradecer a Maricota, que sempre esteve presente em “muitos e poucos” momentos da vida acadêmica, todos os momentos ao seu lado foram bem aproveitados e amáveis.

Agradeço com muito amor a minha avó Ivanilde que sempre esteve presente, sonhando junto comigo. Com sábias palavras sempre me encorajou a prosseguir! E imensa gratidão aos meus pais Amauri e Solange, que sempre estão dispostos a ajudar e lutar junto comigo em cada batalha. Pelo amor e cuidado, não tenho palavras para agradecer-los, sem eles não chegaria até aqui, a eles todo o amor do mundo.

Agradeço também aos meus irmãos, em especial a Ane minha irmã mais velha, que sempre me apoiou e nunca me deixou desistir, junto ao seu esposo Daniel, que para mim é um irmão.

Agradeço a minha sobrinha Anna Luísa que com sua alegria de viver me faz feliz!

Ao Rafael meu esposo, que esteve comigo tanto nos momentos mais felizes quanto nos mais tristes, a vida tem nos ensinado muito sobre o que é o amor! Encerro com um trecho de Oswaldo Montenegro, que sempre fará sentido para nossa relação.

“Quando a gente ama, simplesmente ama! E é impossível explicar.”

E por fim agradeço a Deus, que ainda que me faltasse fé, me permitiu chegar até aqui.

RESUMO

Nos últimos anos, discussões sobre políticas de conservação em diferentes níveis geopolíticos têm sido amplamente debatidas. As espécies são os principais indicadores para estimar os parâmetros de biodiversidade, exercendo um papel fundamental nos registros da biodiversidade. Entretanto, a delimitação de espécies não é uma tarefa simples. Para alguns organismos, como microalgas verdes que apresentam uma morfologia simples e reprodução assexuada, a delimitação de espécie tem sido um grande desafio. A princípio, a taxonomia foi baseada em características morfológicas como a organização do talo e tipo de reprodução. No entanto, para os grupos como da família *Selenastraceae*, as características morfológicas são ambíguas em nível de gênero e não refletem as relações filogenéticas. Outros tipos de abordagens taxonômicas têm sido propostos para os grupos mais complexos, entre elas a abordagem integrativa, a qual leva em consideração características morfológicas, moleculares, ecológicas, fisiológicas e bioquímicas. Neste contexto, propusemos o estudo sobre alterações fisiológicas acessadas por variações na morfologia e bioquímica a fim de auxiliar na diferenciação de 10 cepas dos gêneros *Kirchneriella*, *Selenastrum* e *Messastrum*, que possuem espécies crílicas dentro da família *Selenastraceae*. Nesse estudo, empregamos diferentes condições de temperatura, pH e concentrações de nitrato. A partir de nossos resultados, mostramos que as respostas fisiológicas morfológicas (i.e. acessadas por meio das variações morfológicas) não são similares entre cepas da mesma espécie e, portanto, não são adequadas para delimitação de espécie. O tamanho da célula responde às variações ambientais com alterações significativas no volume da célula podendo aumentar ou diminuir para 70% seu biovolume, entre diferentes tratamentos, enquanto o aumento da temperatura tende a diminuir o biovolume celular em todas as cepas estudadas. As respostas fisiológicas bioquímicas foram mais eficientes na separação dos táxons e refletiram os dados filogenéticos disponíveis na literatura. Portanto, as respostas fisiológicas bioquímicas demonstraram ser uma ferramenta taxonômica bastante útil para a delimitação de espécies, podendo separar a níveis de gêneros e espécies, correspondendo aos dados moleculares.

ABSTRACT

Recently, discussions on conservation policies at different geopolitical levels have been widely debated. Species are the main indicators for estimating biodiversity parameters, playing a key role in biodiversity records. However, species delimitation is not an easy task. For some organisms, such as green microalgae that have a simple morphology and asexual reproduction, the species delimitation has been challenging. At first, taxonomy was based on morphological characteristics such as thallus organization and type of reproduction. However, for groups such as the family Selenastraceae, morphological characteristics are ambiguous at the genus level and do not reflect phylogenetic relationships. Other taxonomic approaches have been proposed for these complex groups, including the integrative approach, which considers morphological, molecular, ecological, physiological, and biochemical characteristics. In this context, we proposed the study on physiological changes (accessed by morphological and biochemical variations) to help differentiate 10 strains from the genera *Kirchneriella*, *Selenastrum* and *Messastrum*, which have cryptic species within the family Selenastraceae. Thus, we evaluated the algae response under different conditions such as variations in temperature, pH and nitrate concentrations. We have shown that physiological responses based on morphological results is not enough (or reliable) to delimit species. Cell size undergoes relevant changes in cell volume under environmental variations, in which it can increase or decrease up to 70% between different treatments; whereas as the temperature increases, the cell biovolume tends to decrease in all strains studied. Biochemical physiological responses were more efficient in the separation of taxa and reflected the phylogenetic data available in the literature. Therefore, physiological responses based on biochemical results have been shown to be an extremely useful taxonomic tool for species delimitation and can separate all genera and species, corresponding to molecular data.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Esquema representativo do comportamento de uma população frente às alterações ambientais. Se as alterações são por plasticidade fenotípica (população F2), o retorno ao ambiente original leva ao retorno das características da população F1. Se ocorre seleção natural, após o retorno da população selecionada (população F2') ao ambiente original, esta permanece diferente da população F1. 13
- Figura 1.2 - Esquema representativo de uma população submetida à estresse ambiental. As diferentes respostas no crescimento da população podem sugerir presença de plasticidade fenotípica, quando corre crescimento rápido, sem (curva A) ou após (curva B) fase de latência (fase *lag*), ou seleção natural, quando há queda abrupta dos indivíduos da população após a fase de latência (curva C). 14
- Figura 2.1 - Variações no biovolume celular para as espécies (a) *Kirchneriella lunaris* (CCMA 87 e CCMA 443), (b) *Kirchneriella obesa* (CCMA-UFSCAR 345, CCMA-UFSCAR 516 e CB 2012.37), (c) *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCAR 630 e CB 2009.36) e (d) *Messastrum gracile* (CCMA-UFSCAR 5, CCMA-UFSCAR 470 e CCMA-UFSCAR 622). Os *outliers* indicam possíveis valores discrepantes. As médias das medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 58
- Figura 2.2. - Variações de comprimento, largura e biovolume celular para *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 87 e CCMA-UFSCar 443) *Kirchneriella obesa* (CCMA-UFSCar 345, CCMA-UFSCar 516 e CB 2102/37). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH - Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 59
- Figura 2.3 - [1] *Kirchineriella obesa* – CCMA-UFSCar-516 no tratamento Tc; [2] *Kirchineriella obesa* – CCMA-UFSCar-516 no tratamento Tt; [3] *Kirchineriella obesa*-CB2012.37 no tratamento Tc; [4] *Kirchineriella obesa*-CB2012.37 no tratamento no TpH. Barra de escala 10 μm . Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C. 60
- Figura 2.4 - Variações de comprimento, largura e biovolume celular para *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 630 e CB2009.36) e *Messastrum gracile* (CCMA-UFSCar 005, CCMA-UFSCar 470 e CCMA-UFSCar 622). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento

pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* p <0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001).....	61
Figura 2.5 - Variações de curvatura celular para <i>Selenastrum bibraianum</i> (CCMA- UFSCar630 e CB2009.36) e <i>Messastrum gracile</i> (CCMA- UFSCar 005, CCMA- UFSCar 470 e CCMA- UFSCar 622). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* p <0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001).....	62
Figura 3.1 Fluxo de trabalho da geração dos dados morfológicos e bioquímicos.	76
Figura 3.2. - Gráfico de escala multidimensional não-métrica (NMDS) mostrando diferenças nas respostas morfológicas entre os três gêneros estudados: <i>Kirchneriella</i> (linha sólida preta, sendo: linha pontilhada lilás cepa CCMA-UFSCar 443; linha pontilhada laranja cepa CCMA-UFSCar 516 e CCMA-UFSCar 87), <i>Selenastrum</i> (linha sólida cinza, sendo: linha pontilhada azul a cepa CB2009/36; linha pontilhada vermelha cepa CCMA-UFSCar 630) e <i>Messastrum</i> (linha pontilhada preta).	85
Figura 3.3. - Gráfico de escala multidimensional não-métrica (NMDS) mostrando diferenças nas respostas fisiológicas bioquímicas entre os três gêneros estudados: <i>Kirchneriella</i> (linha sólida preta, sendo: linha pontilhada vermelha CCMA-UFSCar 443; linha pontilhada lilás cepa CCMA-UFSCar 345), <i>Selenastrum</i> (linha sólida cinza, sendo linha pontilhada azul CCMA-UFSCar 630) e <i>Messastrum</i> (linha pontilhada preta).	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. - Lista das microalgas utilizadas neste estudo, identificadas de acordo com a morfologia clássica e identificadas de acordo com (Korshikov 1987; Möbius, 1894, West e G.S.West, 1894, Garcia, 2016).	63
Tabela 2.2. - Características morfológicas das linhagens de algas utilizadas neste estudo e dados taxonômicos encontrados na literatura.	64
Tabela 2.3. - Valores médios das medidas celulares e seus respectivos desvios padrão, comp = comprimento (μm), larg = largura (μm), biov = biovolume (μm^3), curv = curvatura (μm) em cada tratamento (Tc, TpH, Tt e Tn) de todas as cepas utilizadas neste estudo. O valor de N=90, exceto para cepa CCMAA-UFSCar 443 (Tc), CB2009.36 (Tn) e CB2012.37 (Tn) que N = 60.	65
Tabela 3.1. - Lista das microalgas utilizadas, identificadas de acordo com a morfologia clássica e classificadas de acordo com (GARCIA DA SILVA, 2016; KORSHIKOV, 1987; MÖBIUS, 1894; WEST; WEST, 1894),.....	75
Tabela 3.2. - Condições físico-químicas dos cultivos nos diferentes tratamentos. A concentração de 1000 μM de nitrato corresponde à concentração padrão do meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).	76
Tabela 3.3. - Análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando variáveis morfológicas e bioquímicas de todos os tratamentos (controle, pH, temperatura e nitrato) para os três gêneros e as duas espécies estudadas. O valor de significância adotado foi de $p < 0,005$. (*) significativa, (**) muito significativa e (***) extremamente significativa.....	82
Tabela 3.4. - Análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando variáveis morfológicas e bioquímicas de cada tratamento (controle, pH, temperatura e nitrato) para os três gêneros e as duas espécies estudadas. O valor de significância adotado foi de $p < 0,005$. (*) significativa, (**) muito significativa e (***) extremamente significativa.....	84

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese será apresentada da seguinte forma: (1) Introdução geral; (2) Hipóteses e Objetivos; (3) Capítulos 1, 2 e 3; (4) Considerações finais.

Cada capítulo será apresentado no formato de artigo científico com resumo, introdução, material e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas. Esse formato foi escolhido para facilitar a publicação dos resultados obtidos, de tal forma que as repetições nos capítulos são inevitáveis.

No primeiro capítulo fizemos uma revisão bibliográfica sobre abordagem integrativa, delimitação de espécie de microalgas verdes e suas dificuldades: plasticidade fenotípica e seleção natural.

O segundo capítulo está formatado de acordo com a revista *Phytotaxa*, à qual será submetido. Nesse capítulo, apresentamos os resultados de uma das hipóteses sobre as diferentes respostas morfológicas de 10 cepas de microalgas dos gêneros *Messastrum*, *Selenastrum* e *Kirchneriella* em diferentes tratamentos, que podem refletir na delimitação de espécie.

No terceiro capítulo apresentamos uma nova abordagem para auxiliar na delimitação de espécies para microalgas, que envolve respostas fisiológicas morfológicas e bioquímicas como ferramentas taxonômicas e considera, portanto, a diversidade funcional das cepas, contribuindo para uma abordagem integrativa.

Ao final, apresentamos uma breve discussão geral e as conclusões com base nos capítulos apresentados.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Diversidade de Microalgas.....	1
Família Selenastraceae.....	2
Referências.....	5
HIPÓTESES.....	1
OBJETIVOS GERAIS.....	2
Objetivos Específicos.....	2
1 A IMPORTÂNCIA DA ABORDAGEM INTEGRATIVA E DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA PARA A DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM MICROALGAS VERDES.....	3
1.1 Introdução.....	4
1.2 O conceito de espécie.....	5
1.3 Dificuldades na delimitação de espécie em microalgas verdes: plasticidade fenotípica e seleção natural.....	7
1.4 Abordagem integrativa: uma possível abordagem para o aprimoramento da delimitação de espécies em microalgas.....	16
1.5 Considerações finais.....	20
1.6 Referências.....	22
2 PLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE ALGAS VERDES COCOIDES DA FAMÍLIA SELENASTRACAE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ABIÓTICAS E SUAS IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS.....	32
2.1 Introdução.....	34
2.2 Materiais e métodos.....	37
2.3 Resultados.....	40
2.4 Discussão.....	44
2.5 Conclusão.....	50
2.6 Referências.....	51
2.7 Figuras e tabelas.....	58
3 DELIMITAÇÃO DE GÊNEROS E ESPÉCIES DE MICROALGAS VERDES POR MEIO DE RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS SOB VARIAÇÕES AMBIENTAIS.....	71
3.1 Introdução.....	72
3.2 Materiais e métodos.....	74
3.3 Resultados.....	80
3.4 Discussão.....	87
3.5 Conclusões.....	91

3.6	Referências.....	92
4	Considerações finais.....	99

INTRODUÇÃO GERAL

Diversidade de Microalgas

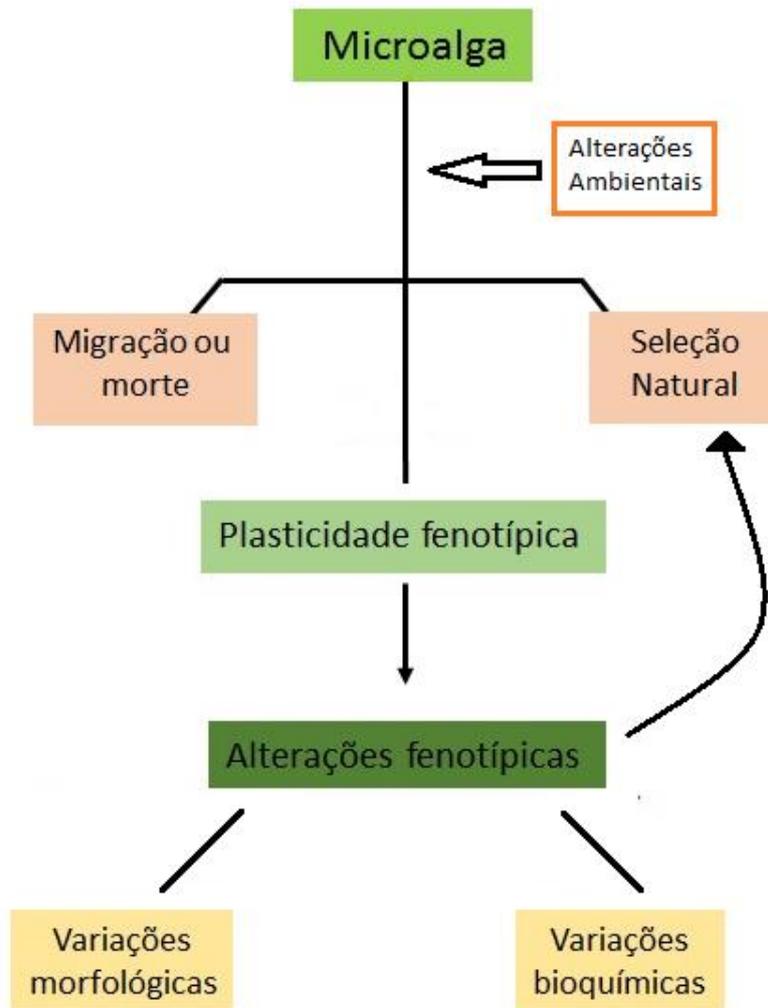
As microalgas são consideradas cosmopolitas podendo habitar diferentes ambientes, desde marinhos à terra firme e consistem em organismos autótrofos, heterótrofos, mixotrofos e predadores que possuem grandes variações morfológicas e fisiológicas que as permitem adaptar-se aos mais diversos parâmetros ambientais (RAVEN; GEIDER, 2003). A diversidade biológica das microalgas ainda é algo a ser discutido. Atualmente, existem cerca de 40.000 espécies descritas em ambientes aquáticos, mas é estimado que existam cerca de 800.000 espécies (CHENG; OGDEN, 2011; COPLIN, 2012). Além dos poucos estudos disponíveis, outra razão para a subestimação drástica da diversidade de espécies descritas está relacionada aos métodos de classificação e delimitação de espécies.

Os fatores ambientais são considerados os “vilões” na delimitação de espécie e “protagonistas” na diversidade biológica em microalgas, sendo estes capazes de alterar características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (CRISPO, 2008). Diante de mudanças ambientais, os organismos podem responder de quatro maneiras: 1) morte; 2) plasticidade fenotípica; 3) seleção natural e 4) migração (Figura 1).(SCHAUM; COLLINS, 2014)

A plasticidade fenotípica é a primeira resposta dos organismos diante de pressões ambientais. Ela é definida pela capacidade de um genótipo produzir mais de um fenótipo como uma resposta plástica (BRADSHAW, 1965; CRISPO, 2008). Toda a alteração nos indivíduos, diante da diversidade ambiental, tem origem fisiológica (BRADSHAW, 1965), a qual pode se manifestar de duas formas: através da plasticidade morfológica ou fisiológica. A plasticidade fenotípica é considerada um combustível que alimenta as

alterações fenotípicas e as mudanças evolutivas nas espécies, além de ser responsável pela manutenção da vida (WEST-EBERHARD, 1989, 2005).

Figura I. - Esquema ilustrando as possíveis respostas das espécies de microalgas diante de alterações ambientais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Família Selenastraceae

A família Selenastraceae pertence à divisão das algas verdes Chlorophyta, que compreende uma enorme variedade morfológica, tendo organismos unicelulares flagelados ou cocoides, filamentosas, podendo ser ramificadas ou não, cenocíticas e

membranosas (HOEK; STAM; OLSEN, 1988). Atualmente, a família Selenastraceae vem passando por uma revisão taxonômica (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ; BOCK, 2012). Por apresentar uma morfologia simples, espécies crípticas e possuírem indivíduos altamente plásticos, elas podem ser identificadas erroneamente em nível de gênero (FAWLEY et al., 2005).

O conhecimento atual da diversidade específica da família Selenastraceae em ecologia é escasso, embora sejam espécies abundantes nos mais diversos habitats. A delimitação das microalgas por muito tempo foi baseada em caracteres morfológicos. A partir de avanços metodológicos, técnicas moleculares têm sido empregadas na tentativa de uma delimitação mais coerente (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001; MCCOURT et al., 1995). No entanto, os estudos moleculares filogenéticos muitas vezes revelam espécies crípticas (espécies morfológicamente indistinguíveis e geneticamente diferentes), mas não definem claramente quais as diferenças nas sequências detectadas são suficientes para delimitar de espécies diferentes (MALAVASI et al., 2016)

A dificuldade na delimitação de espécie na Família Selenastraceae se deve principalmente à reprodução assexuada e a baixa variação morfológica, assim como em outros grupos de microalgas. Durante um tempo, as florações de fitoplâncton foram consideradas monoclonais ou com baixa diversidade genética (LEBRET et al., 2012). No entanto, estudos recentes mostraram alta diversidade genética intraespecífica em espécies marinhas e límnicas dificultando a identificação correta das espécies (LEBRET et al., 2012; LOGARES et al., 2009; RYNEARSON; ARMBRUST, 2005). Além disso, diferenças genéticas nas populações podem levar a variações fenotípicas importantes para as características fisiológicas e ecológicas de uma determinada espécie (LEBRET et al., 2012).

A problemática da delimitação de espécie mostra a necessidade de solucionar o problema. Alguns métodos já foram testados, tais como identificação morfológica, genética e bioquímica, os quais mostraram espécies crípticas. No entanto, a plasticidade fenotípica, que reflete respostas fisiológicas dos organismos, ainda é pouco considerada. O estudo de espécies fisiológicas por meio da plasticidade fenotípica pode auxiliar na taxonomia das espécies por: 1) considerar a variação morfológica frente às variações ambientais, ampliando as faixas de tamanho dos organismos, frequentemente descritas para poucos indivíduos e em uma condição ambiental, e 2) incluir além da diversidade genética, a diversidade funcional das microalgas para uma taxonomia mais robusta e que reflita a real diversidade das microalgas.

Referências

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: CASPARI, E. W.; THODAY, J. M. (Eds.). **Advances in genetics**. [s.l.] Academic Press, 1965. p. 115–155.

CHENG, K. C.; OGDEN, K. L. Algal biofuels: the research. **Chemical Engineering Progress**, v. 107, n. 3, p. 42–47, 2011.

COPLIN, L. G. (EDITOR). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2012.

CRISPO, E. Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, n. 6, p. 1460–1469, nov. 2008.

DAVIS, M. A.; THOMPSON, K.; GRIME, J. P. Invasibility: the local mechanism driving community assembly and species diversity. **Ecography**, v. 28, n. 5, p. 696–704, out. 2005.

FAWLEY, M. W. et al. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142–154, fev. 2005.

GARCIA DA SILVA, T. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 1 abr. 2017.

HOEK, C.; STAM, W. T.; OLSEN, J. L. The emergence of a new chlorophytan system, and Dr. Kornmann's contribution thereto. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 42, n. 3–4, p. 339–383, set. 1988.

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.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295–326, 2012.

LEBRET, K. et al. Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2395–2404, 9 set. 2012.

LOGARES, R. et al. Genetic diversity patterns in five protist species occurring in lakes. **Protist**, v. 160, n. 2, p. 301–317, 2009.

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. e0151137, 30 mar. 2016.

MCCOURT, R. M. et al. Using *rbcL* sequences to test hypothesis of chloroplast and thallus evolution in conjugating green algae (Zygnematales, Charophyceae). v. 995, p. 989–995, 1995.

RAVEN, J. A.; GEIDER, R. J. Adaptation, acclimation and regulation in algal photosynthesis. In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. (Eds.). . **Photosynthesis in algae**. Dordrecht: Springer, 2003. p. 385–412.

RYNEARSON, T. A.; ARMBRUST, E. V. Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 6, p. 1631–1640, maio 2005.

SCHAUM, C. E.; COLLINS, S. Plasticity predicts evolution in a marine alga. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1793, p. 20141486, 22 out. 2014.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249–278, nov. 1989.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 304B, n. 6, p. 610–618, 15 nov. 2005.

HIPÓTESES

(A) Por meio da plasticidade fenotípica, supõe-se que **fatores abióticos** possam alterar a fisiologia de microalgas da família Selenastraceae causando **alterações morfológicas** que podem ser importantes para a taxonomia morfológica desses organismos.

(B) Diante da plasticidade fenotípica (como respostas as variações ambientais), supomos que cepas da mesma espécie adotem estratégias semelhantes. Sendo assim, elas se agrupam através das diversas respostas fisiológicas acessadas por meio da morfologia e/ou bioquímica.

(C) Dados fisiológicos (morfológicos e bioquímicos) auxiliam na delimitação de espécie, através de uma abordagem mais robusta.

OBJETIVOS GERAIS

Investigar como os fatores ambientais (temperatura, pH e nutrientes) atuam na fisiologia das espécies da família Selenastraceae, através das respostas plásticas, e como podem influenciar na taxonomia do grupo. Além disso, discutir se as respostas fisiológicas auxiliam para uma taxonomia mais robusta e que reflita a real diversidade das microalgas.

Objetivos Específicos

- 1- Analisar a plasticidade morfológica das espécies em diferentes condições ambientais para conhecer as possíveis implicações taxonômicas.
- 2- Verificar se as respostas fisiológicas (respostas plásticas morfológicas e bioquímicas) diante das variações de pH, temperatura e nutrientes, podem assemelhar ou diferenciar os gêneros morfológicamente mais semelhantes (*Selenastrum* Reinsche *Messastrum* TS. Garcia) e espécies do gênero *Kirchneriella* Schmidl.
- 3- Usar as espécies fisiológicas para delimitar espécies, associadas a uma abordagem integrativa, que unirá dados do comportamento fisiológicos: características bioquímicas e morfológicas.

1 A IMPORTÂNCIA DA ABORDAGEM INTEGRATIVA E DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA PARA A DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM MICROALGAS VERDES

Abstract

Species delimitation is not an easy task due to divergences and major issues regarding the concept of species. In this context, some green microalgae from the Chlorophyceae class pose a great challenge as they present predominant asexual reproduction, morphological plasticity, and a simple morphology that enables the occurrence of many cryptic morphological species. Owing to technological and methodological advances, new tools are now being used for species delimitation, such as molecular, biochemical, and phylogenetic data. However, it is often the case that they are not always sufficient when used alone. This is especially true because microalgae can undergo constant morphological, physiological, and behavioral changes in the face of environmental variations, due to phenotypic plasticity. However, these changes can also be promoted by natural selection on genetic differences of these asexual populations. Therefore, an integrative approach, including the phylogenetic diversity and phenotypic plasticity on morphological, physiological and ecological traits, is important to propose more robust species delimitation that also preserves the functional diversity within microalgae species.

1.1 Introdução

Nos últimos anos, discussões sobre políticas de conservação, em diferentes níveis geopolíticos, têm sido recorrentes a fim de estimar os parâmetros de biodiversidade desde o nível populacional até a escala de biomas inteiros. A espécie é a unidade fundamental para esta análise, no entanto existem divergências e grandes questões que envolvem tal conceito. Apesar do papel central que as espécies desempenham como principais indicadores de biodiversidade, a definição técnica em torno deste termo continua paradoxalmente controversa entre os biólogos. Na prática, a definição de limites da espécie está, muitas vezes, longe de ser simples (DE QUEIROZ, 2007). Esta definição é complicada devido à aplicação de diferentes conceitos de espécie e tem sido fortemente influenciada por novos tipos de dados, os quais se tornaram disponíveis ao longo do tempo com os avanços tecnológicos e metodológicos (MALAVASI et al., 2016).

Nesta revisão, abordaremos as principais dificuldades relacionadas à delimitação de espécies considerando o caso das microalgas verdes. Retomaremos os problemas gerais para determinação de espécies na biologia, passando pelos principais problemas encontrados nas microalgas verdes, finalizando com sugestões para que possamos avançar na delimitação específica das microalgas, além de considerar sua diversidade funcional. Para tanto, abordaremos os seguintes tópicos: (1) o conceito de espécie; (2) delimitação de espécie em microalgas verdes e suas dificuldades: plasticidade fenotípica e seleção natural; e (3) abordagem integrativa: uma possível abordagem para o aprimoramento da delimitação de espécies em microalgas.

1.2 O conceito de espécie

A taxonomia é a ciência que nomeia, classifica e organiza os seres vivos em diferentes grupos de acordo com características compartilhadas, tendo sido desenvolvida pelo cientista (botanista) sueco Carolus Linnaeus no século XVIII. Dentro da taxonomia temos diversas divisões desde domínio até subespécie. Embora muitos grupos sejam artificiais, a definição de “espécie” é fundamental, uma vez que é a unidade taxonômica básica para determinar a diversidade dos organismos. Questões acerca da correta definição desse termo surgem naturalmente, uma vez que podem ser observadas variações contínuas dentro de uma mesma “espécie” (MAYR, 2006).

A dificuldade em definir o termo espécie, associada à sua complexidade, tem permeado e gerado debates na comunidade científica por séculos, fato conhecido como o “problema das espécies” (AGAPOW et al., 2004; CLARIDGE; DAWAH, 1997; DARWIN, 1859; KIMBEL; MARTIN, 1993; WILSON, 1999). Por exemplo, Darwin em 1859 já havia percebido que a definição de espécie dificilmente iria satisfazer a todos os naturalistas (BARBEROUSSE; SAMADI, 2010). O conceito mais utilizado, o de espécie biológica de Mayr (MAYR, 1942), que avalia o intercruzamento entre indivíduos, não pode ser aplicado a todos os grupos de organismos, tais como os de reprodução assexuada.

Ao longo dos anos, surgiram outros conceitos para delimitação de espécie, tais como: (1) conceito de coesão – proposto por Templeton (TEMPLETON, 1989) - esse conceito combina isolamento reprodutivo, seleção ecológica e compatibilidade reprodutiva; está relacionado com a coesão fenotípica, que se constitui em agrupar indivíduos com a mesma essência, no qual a população é mais inclusiva; (2) conceito evolutivo – proposto por Simpson (SIMPSON, 1990) - os indivíduos possuem um papel evolutivo único, tendências e destino histórico; considera-se uma espécie sendo uma linhagem única, nas quais os descendentes mantêm as características do ancestral. (3)

conceito ecológico – proposto por Van Valen (VAN VALEN, 1976) - implica que as espécies pertencem ao mesmo nicho ecológico e dividem os mesmos recursos em suas zonas adaptativas. (4) Filogenético – proposto por Cracraft (CRACRAFT, 1974) - o “conceito filogenético” está relacionado com as diferenças de caractere fixo, no caso os organismos apresentam um grupo de caracteres diagnosticável. Uma revisão mais detalhada desses conceitos foi elaborada por De Queiroz (DE QUEIROZ, 2007).

Além desses conceitos, temos o “conceito morfológico” (DU RIETZ, 1930), em que uma classe de organismos com características morfológicas similares compõe uma população de indivíduos da mesma espécie. Embora muito utilizado e ainda útil, as análises moleculares têm mostrado que não fornecem delimitação correta para muitas espécies. Existem problemas na delimitação de espécies crípticas (espécies morfolologicamente semelhantes e geneticamente diferentes), morfoespécies (morfolologicamente distintas e geneticamente iguais) e espécies que apresentam plasticidade fenotípica em ambientes diversificados.

Todos os conceitos propostos têm fundamentos, mas geram vários questionamentos sobre suas eficiências na delimitação de espécie. No entanto, a delimitação correta de espécie é importante para levantamentos de diversidade e esclarecimento das relações biológicas (processos de evolução, especiação e ecologia) (DAYRAT, 2005; ŠKALOUD; RINDI, 2013). Além disso, para grupos de interesse comercial, como é o caso das microalgas, a delimitação de espécies é importante para a correta obtenção de bioprodutos de interesse, tendo papel fundamental para questões comerciais e de saúde pública (BOROWITZKA, 2016). Em relação às microalgas e demais microrganismos, uma delimitação específica eficiente pode ainda auxiliar em projetos futuros para definição de bioindicadores utilizando dados de sequenciamento

massivo e análise de nutrientes, metais e pesticidas nos ambientes aquáticos (PAWLOWSKI et al., 2016).

1.3 Dificuldades na delimitação de espécie em microalgas verdes: plasticidade fenotípica e seleção natural

Um dos grupos que se apresentam como grande desafio para a delimitação de espécie são as microalgas verdes da classe Chlorophyceae. Esses organismos ocupam diversos habitats, desde águas doces, salobras e salgadas a ambientes terrestres, e possuem diversas organizações celulares (LEWIS; MCCOURT, 2004; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Compreendem algas unicelulares, cenobiais e filamentosas, cujas características como imobilidade na fase vegetativa, reprodução assexuada predominante e formas com variações dentro de uma morfologia limitada (HOEK; STAM; OLSEN, 1988; KRIENITZ; BOCK, 2012), prejudicam a identificação das espécies (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

Muitas das microalgas verdes descritas são morfoespécies que são consideradas espécies distintas por apresentarem fenótipos diferentes, embora, geneticamente sejam iguais (MCCOURT et al., 1995), mas o contrário também é comum. A variação morfológica, de certo modo restrita para alguns grupos, facilita a ocorrência de muitas espécies crípticas (FAWLEY et al., 2005). Frequentemente, para alguns táxons encontramos vários morfotipos para um único filotipo, o que dificulta sua identificação em levantamentos de diversidade fitoplanctônica (KRIENITZ et al., 2001). Por exemplo, Lewis e Flechtner (2004) analisaram 9 cepas da clorofícea *Scenedesmus* de locais diferentes na América do Norte. Por meio de análises genéticas, foi possível separar as cepas em três grupos distintos, apesar das células serem morfologicamente semelhantes.

Müller (2005) em trabalho similar com 29 cepas de microalgas verdes, identificadas como *Chlorella vulgaris*, observou que a variação genética entre as cepas estudadas compreendia 11 genótipos diferentes. Desses genótipos diferentes, 5 espécies eram crípticas, ou seja, morfologicamente idênticas. É interessante ressaltar que para este estudo as cepas utilizadas tiveram todas a mesma origem, foram isoladas da mesma cepa, porém foram distribuídas em diferentes bancos de cultivos de vários países, cada qual com seus métodos de cultivos. Ele alertou sobre a necessidade de armazenar e registrar corretamente as cepas, uma vez que variações fisiológicas e bioquímicas também podem corresponder a diferenças genômicas. Nesse mesmo estudo, ficou claro que as variações fisiológicas e bioquímicas podem ocasionar variações genômicas, demonstrando a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a delimitação de espécie, levando em consideração as variações de cultivos.

As alterações no ambiente de determinada espécie, de origem biótica ou abiótica, naturais ou não, são sempre uma fonte em potencial para seleção direcional de uma população (HOUGHTON et al., 2001), podendo impulsionar respostas evolutivas (genéticas) e plásticas (GIENAPP et al., 2008). Quando uma espécie sofre pressões ambientais incomuns, ela pode responder de quatro formas: 1) migração; 2) aclimação; 3) adaptação; 4) morte (SCHAUM; COLLINS, 2014). Segundo Gienapp *et al.* (2008) e Davis *et al.* (2005), quando uma espécie se aclimata, ela sobrevive às novas condições ambientais impostas através da plasticidade fenotípica, sem, contudo, alterar sua constituição genética. Por outro lado, quando ocorre adaptação às novas condições no ambiente, essa se dá por meio de mudanças genéticas através do processo de seleção natural.

Sabendo que as microalgas podem passar por constantes variações morfológicas, genéticas e fisiológicas diante das variações ambientais, é necessário entender os

processos que causam essas variações para entender como elas podem afetar a delimitação específica em microalgas. Dessa forma, a seguir trataremos duas causas principais destas variações em microalgas: plasticidade fenotípica e seleção natural.

A plasticidade fenotípica é vital para a sobrevivência das espécies diante de perturbações ambientais, de tal forma que a capacidade dos organismos expressarem variações fenotípicas é uma característica básica da vida (KRISMER et al., 2017). Em geral, plasticidade fenotípica ocorre quando um genótipo individual assume características particulares em um ambiente diferente do de origem. Assim, essas alterações das características do indivíduo associadas à plasticidade fenotípica em uma população não têm origens genéticas, mas sim ambientais, de tal forma que a variabilidade é intragenotípica (BRADSHAW, 1965).

Para Bradshaw (1965), a plasticidade fenotípica pode se manifestar de duas formas: a morfológica e a fisiológica; uma vez que todas as mudanças nas características do indivíduo são de origem fisiológica, logo, toda plasticidade é fisiológica. Quando o fenótipo é alterado devido a uma mudança ambiental, trata-se de uma resposta plástica, que pode ser desenvolvimental ou lábil (adaptável). A plasticidade desenvolvimental ocorre durante a formação do indivíduo, estas alterações estão ligadas as características não reversíveis (ex. características morfológicas permanentes). Esse conceito serve para qualquer alteração fenotípica observada no ambiente, que tem como resposta uma adaptação genética a alterações ambientais. Sendo assim, se um caractere for variável, a seleção deve manter essa variabilidade (SMITH-GILL, 1983). Por outro lado, na plasticidade lábil as mudanças fenotípicas ocorrem durante toda a vida útil do indivíduo e podem ser reversíveis (*e.g.*, alterações fisiológicas, comportamentais e morfológicas não permanentes), podendo futuramente a população apresentar adaptações genéticas e fluxo gênico (CRISPO, 2008).

Identificar quando a plasticidade é desenvolvimental (seleção natural) ou lábil não é uma tarefa simples. Por exemplo, Reboloso-Fuentes et al. (2001) observou que microalgas *Phaeodactylum tricornutum*, quando submetidas a quantidades diferentes de luz, apresentaram como respostas plásticas aumento de biomassa e diminuição de lipídios. Peña-Castro et al. (2004) observaram que a espécie do gênero *Scenedesmus* alteram sua morfologia quando são submetidas a diferentes concentrações de metais pesado. Hessen e Van Donk, (1993) perceberam mudanças morfológicas em espécies de *Scenedesmus* na presença de predadores. Estes casos podem ser identificados tanto como plasticidade desenvolvimental quanto lábil. A forma de saber o tipo de plasticidade baseia-se em avaliar se as alterações são reversíveis quando as células são submetidas ao ambiente inicial ou se houve mudança genética quando comparado com a população inicial.

A plasticidade fenotípica desempenhou um papel central nos estudos de respostas evolutivas às mudanças ambientais, incluindo a evolução da diversidade (WEST-EBERHARD, 2005). A plasticidade fenotípica e as variações genéticas são consideradas as únicas respostas viáveis para as mudanças ambientais repentinas, drásticas ou até mesmo lentas (PIGLIUCCI, 2005) e ambas podem caminhar juntas em alguns casos. Dentro de uma visão tradicional, a plasticidade pode promover ou retardar futuras divergências genéticas, prevendo assim a ação da seleção natural (CRISPO, 2008; SCHLICHTING; PIGLIUCCI, 1998; WRIGHT, 1931).

Para Crispo (2008), uma visão alternativa é a de que as respostas plásticas permitem a colonização e a persistência diante de alterações ambientais ou a novos ambientes, mas aumentam as possibilidades para divergência genéticas futuras. Existem várias evidências de que a plasticidade fenotípica pode ser um trampolim para a seleção

natural e levar à diversificação taxonômica (CONOVER; SCHULTZ, 1995; CRISPO, 2008; WEST-EBERHARD, 1989, 2005).

Schaum e Collins (2014) testaram várias linhagens de *Ostreococcus* da coleção “Roscoff Culture Collection and the Plymouth Marine Laboratory” sob quatro concentrações de CO₂, variando de 430 ppm a 1000 ppm. As linhagens vinham de vários ambientes que foram classificados como mais ou menos flutuantes (variações ambientais). Com base nos resultados, eles demonstraram que uma linhagem de *Ostreococcus*, advinda de um ambiente flutuante de ancestrais mais plásticos, se desenvolvia melhor em altas concentrações de CO₂ do que linhagens de ancestrais menos plásticos. Logo, podemos considerar que a plasticidade do ancestral é um bom indicador de respostas evolutivas, uma vez que a plasticidade pode facilitar a evolução (LANDE, 2009). Além disso, foi possível observar que as linhagens com maior plasticidade ancestral diminuem sua plasticidade ao longo do tempo. De fato, eles observaram que após 400 gerações de seleção no maior nível de concentração de CO₂, as linhagens selecionadas não conseguiram sucesso no ambiente ancestral. A perda de plasticidade de algumas linhagens quando submetidas a diferentes pressões ambientais pode ser justificada pelo fato de que algumas delas diminuem sua plasticidade para limitar seu custo, enquanto permanece plástica o suficiente para sobreviver em um ambiente flutuante (BRADSHAW, 1965).

Segundo Draghi e Whitlock (2012), as populações com mais indivíduos plásticos têm mais chances de se adaptar a novos ambientes e mudanças ambientais. Nesse caso, a população se mantém com altos níveis de plasticidade individual, geneticamente, para manter e produzir variações fenotípicas (GOMEZ-MESTRE; JOVANI, 2013). De maneira geral, é mais benéfico que os organismos se mantenham plásticos ao invés de se adaptarem geneticamente a um local diante das variações ambientais. A plasticidade é

benéfica nas situações em que: (a) os ambientes são espacialmente ou temporariamente heterogêneos; (b) as variações ambientais são previsíveis; (c) e pelo fato de as respostas plásticas serem tão rápidas quanto as mudanças ambientais (ALPERT; SIMMS, 2002; PADILLA; ADOLPH, 1996).

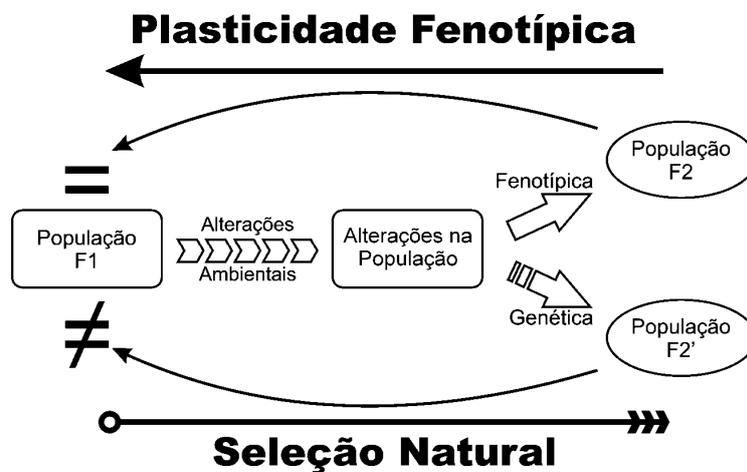
Mas quando e como saber se as respostas de uma população são plásticas ou são frutos de seleção natural diante de variações ambientais? Podemos observar isso por três meios: 1) análises genéticas; 2) teste de reversibilidade; 3) curva de crescimento.

1) As análises genéticas podem apontar se houve modificações genéticas nas gerações após o estresse ambiental. O AFLP (do inglês, Amplified Fragment Length Polymorphism), técnica descrita por Vos et al. (1995), tem sido bastante utilizado para essa finalidade. Ele permite a análise simultânea de muitos locais amplamente espalhados por todo o genoma, sem conhecimento prévio da sequência dos organismos em estudo (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999; MÜLLER et al., 2005, 2007). É uma técnica sensível e confiável para resolver diferenças entre isolados da mesma espécie em uma variedade de táxons. Essa técnica é usada para avaliar seleção em microalgas (DAY et al., 2005; MÜLLER et al., 2005, 2007) e em outros grupos de microrganismos como fungos (MAJER et al., 1996; MUELLER; LIPARI; MILGROOM, 1996; ROSENDAHL; TAYLOR, 1997; WANG et al., 2010).

2) O teste de reversibilidade consiste em analisar se o comportamento, a morfologia e a fisiologia de uma população diante das variações ambientais são resultado de respostas plásticas ou seleção natural. Quando uma população F1 (ver Figura 1) é submetida a um estresse ambiental, ela pode responder de duas maneiras: aclimatando-se ao ambiente (resposta plástica, F2) ou adaptando-se a este (resposta genética, F2'). Para saber qual a resposta da geração (F2 ou F2') é necessário retornar essa população aclimatada ou

adaptada ao ambiente de origem. Se a população tiver as mesmas características da geração F1, temos uma resposta de plasticidade fenotípica (F2), se for diferente, ou até mesmo não conseguir sobreviver o resultado é uma seleção natural (F2') (Figura 1.2).

Figura 1.1 - Esquema representativo do comportamento de uma população frente às alterações ambientais. Se as alterações são por plasticidade fenotípica (população F2), o retorno ao ambiente original leva ao retorno das características da população F1. Se ocorre seleção natural, após o retorno da população selecionada (população F2') ao ambiente original, esta permanece diferente da população F1.

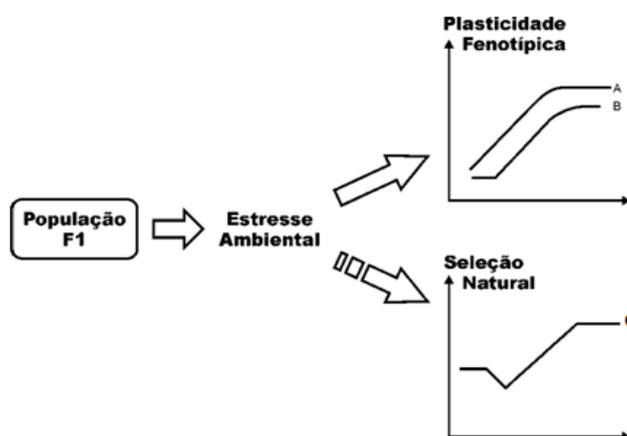


Fonte: Elaborada pelo autor.

3) O sucesso de sobrevivência da população ao novo ambiente depende mais das respostas plásticas do que da seleção natural. Isso porque a plasticidade permite que os indivíduos de uma população tenham respostas simultâneas e rápidas, enquanto a seleção natural depende da variação genética entre os indivíduos ou possíveis mutações que podem surgir (CRISPO, 2008). O crescimento de microalgas segue o modelo exponencial, o qual pode ser dividido em três fases: aclimação, exponencial e estacionária. Quando uma população é submetida a uma alteração ambiental e a resposta é plástica, os indivíduos tendem a um crescimento lento na fase de aclimação, sem queda abrupta no número de indivíduos ou com pequenas oscilações de crescimento. Sem plasticidade, as células que não estão aptas ao novo ambiente podem permanecer vivas por um tempo, mas morrem

posteriormente. Se a maior parte da população é afetada, ocorre uma queda acentuada na curva de crescimento, seguida de crescimento mais lento (Figura 1.2). Assim, propomos aqui a observação diária da curva de crescimento para as microalgas, que pode indicar se está ocorrendo plasticidade fenotípica ou seleção natural (Discutido no Capítulo 2).

Figura 1.2 - Esquema representativo de uma população submetida à estresse ambiental. As diferentes respostas no crescimento da população podem sugerir presença de plasticidade fenotípica, quando corre crescimento rápido, sem (curva A) ou após (curva B) fase de latência (fase *lag*), ou seleção natural, quando há queda abrupta dos indivíduos da população após a fase de latência (curva C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Alguns estudos biotecnológicos se propõem a produzir novas cepas de microalgas para fins comerciais utilizando vários estresses ambientais para a seleção de cepas geneticamente distintas. Por exemplo, na coleção de microalgas do Instituto de Pesquisa Pesqueira de Taiwan (Tung-Kang, Ping-Tung, Taiwan), uma cepa de *Chlorella sp.* foi submetida por várias vezes a altas temperaturas, por várias gerações, obtendo uma nova cepa da espécie nomeada *Chlorella sp* MTF-7 (*Chlorella* mutante) (CHIU et al., 2011). Esse experimento nos ajuda a entender duas situações: a) provavelmente na população das células de *Chlorella sp* havia células plásticas, com potencial para sobreviver a altas temperaturas. O processo de seleção natural ocorreu gradualmente quando as células

foram submetidas a temperaturas cada vez maiores. Quando submetidas novamente a temperaturas variáveis, incluindo a temperatura do ambiente original, estas não retornaram as suas características antigas, sendo assim considerada uma nova cepa, por meio da seleção natural; b) existe um custo, portanto a plasticidade se mantém quando é mais benéfico para os organismos. Neste caso, é caro manter a plasticidade (PRICE, 2006), por estar a várias gerações sob o mesmo tipo de estresse e ser um ambiente homogêneo.

Krismer et al. (2017) avaliou até que ponto os mecanismos genéticos em *Chlamydomonas reinhardtii* são capazes de produzir variação fenotípica a nível celular, em casos de redução de nitrogênio, e observaram as variações fisiológicas e morfológicas. Os autores utilizaram uma cepa selvagem de *C. reinhardtii* (CC-1690) e duas populações isoclonais (ANC3 e ANC5) isoladas a partir da CC-1690. As três cepas foram mantidas sob diferentes regimes de limitação de nitrogênio por nove dias. Krismer et al. (2017) mostraram que a população selvagem CC-1690 apresentou uma maior variação fenotípica que as populações isoclonais. Entretanto, as culturas isoclonais mostraram maior sincronidade em sua resposta fenotípica. Esse resultado demonstra que a diversidade genética tende a manter ou aumentar sua variação fenotípica entre as células de uma população sob estresse, enquanto a variação fenotípica não genética (plasticidade) tende a ser mais limitada, quando comparada com a variação de origem genética.

Por outro lado, Chandler et al. (2019) realizaram estudos com dez cepas da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de vários bancos de cultivo do mundo. Eles mostraram que 95% dos genes eram idênticos para todas as cepas e sugeriram que as diferenças fenotípicas não estão relacionadas com as diferenças genômicas, e que, portanto, outras diferenças potenciais na transcrição e tradução podem ser responsáveis pela variação fenotípica observada. Análises de genes reguladores não revelaram

nenhuma alteração no genótipo correlacionada com as variações observadas no fenótipo. Em conclusão, os autores sugerem que as cepas de *P. aeruginosa*, mantidas individualmente, podem passar por microevolução contínua, o que pode influenciar tanto as análises genóticas quanto fenotípicas. Embora esse estudo não seja com microalgas, o conceito se aplica.

Conhecendo melhor os processos que envolvem as mudanças morfológicas, genéticas, fisiológicas e comportamentais, podemos aprimorar os trabalhos taxonômicos que não levam em consideração as variações ambientais. Tanto ampliando as faixas de tamanhos e morfotipos dos indivíduos ou perfis quimiotaxonômicos em delimitações genéticas, como utilizando os dados de plasticidade fenotípica para verificar potenciais sobreposições ou separações de nichos em espécies filogenéticas. Dessa forma, compreendemos que as ferramentas utilizadas para delimitação de espécie precisam levar em consideração as respostas da população diante de mudanças ambientais.

1.4 Abordagem integrativa: uma possível abordagem para o aprimoramento da delimitação de espécies em microalgas

A dificuldade para a delimitação de espécies de microalgas verdes tem estimulado revisões taxonômicas para este grupo, principalmente pelo fato de as espécies mudarem seu fenótipo ou sofrerem mudanças genéticas e muitas serem espécies crípticas. O sistema de classificação morfológico com critérios fenotípicos tem sido substituído por uma nova classificação filogenética (KRIENITZ; BOCK, 2012), sendo, em alguns casos, auxiliados por características morfológicas e genéticas (KRIENITZ; BOCK, 2012; LELIAERT et al., 2012; LINDELL, 2014). Carstens *et al.* (2013) observaram que inferências a respeito da delimitação de espécies baseadas em dados genéticos, por si só, são insuficientes e

inadequadas. Por outro lado, essas inferências devem considerar a história de vida, distribuição geográfica, morfologia e comportamento. Em um contexto taxonômico, informações de sequências de DNA não devem ser utilizadas como indicadores de delimitação de espécie sem que haja o apoio de evidências baseadas em outras técnicas (MALAVASI et al., 2016).

Diante da complexidade em delimitar espécies de microalgas verdes (KRIENITZ et al., 2001), devido às diferentes formas e respostas fisiológicas, é preciso construir uma ligação entre os diversos campos de conhecimento que forneçam dados sobre diferentes caracteres de determinada espécie. No caso de microalgas, durante muito tempo somente o critério morfológico fora utilizado. No entanto, hoje sabemos que muitas espécies possuem plasticidade fenotípica e que ocorrem espécies crípticas. Desse modo, para a delimitação de espécie de microalgas propomos o uso de uma abordagem integrativa, em que diferentes ferramentas podem ser utilizadas para delimitar espécies (Figura 3) de um modo mais robusto. Além disso, a abordagem integrativa considerando a plasticidade fenotípica permite o conhecimento e preservação de uma diversidade funcional muitas vezes não observada pelo estudo de marcadores moleculares.

A abordagem integrativa foi proposta inicialmente por Dayrat (2005) e Will et al. (2005), os quais propuseram o uso de diferentes fontes de evidências para delimitar uma espécie. Essa prática taxonômica implica na utilização de vários conceitos de espécie, tais como morfológico, genético, fisiológico e ecológico (CARON; HU, 2019), sendo, portanto, mais abrangente do que a taxonomia polifásica.

No caso das microalgas, além de usar esses caracteres é necessário compreender os fatores que possam influenciá-los. Os fatores (a)bióticos causam as principais interferências, uma vez que afetam a fisiologia das microalgas, a qual está relacionada

com todos os outros caracteres. As mudanças causadas na fisiologia podem gerar respostas plásticas (BRADSHAW, 1965), interferindo na morfologia, alterando a composição bioquímica e o metabolismo celular.

Para Schlick-Steiner (2010) existem três situações que impulsionam a taxonomia integrativa: 1) quando há falhas nos dados morfológicos, e se torna necessária a aplicação de outros conceitos taxonômicos; 2) em situações que, embora os dados morfológicos estejam coerentes, outras ferramentas tornem o processo de identificação mais rápido; e 3) a junção de várias disciplinas para identificação de uma espécie ajuda a taxonomia ir além de nomeações de espécies, permite a compreensão dos processos que envolvem uma “espécie”.

A taxonomia integrativa não substitui a taxonomia tradicional (AGNARSSON; KUNTNER, 2007; HEY et al., 2003), ela permite que a junção de várias disciplinas na delimitação de espécies forneça melhores dados para compreender a biodiversidade, podendo esta diminuir ou aumentar o número de espécies descritas (DAYRAT, 2005). Por exemplo, Bendif et al. (2011) estudaram quatro gêneros da família Pavlovophyceae (que compreende treze espécies) utilizando uma abordagem integrativa de dados morfológicos, moleculares e bioquímicos. Os dados moleculares agruparam espécies que antes eram identificadas como distintas (*Pavlovagyrens* e *Pavlovapinguis*), e identificou quatro clados distintos. Com os dados das características morfológicas e bioquímicas criou-se uma assinatura específica para cada um dos grupos que estavam associadas aos dados moleculares. Esse estudo, além de conseguir separar as espécies e associar com as características moleculares, morfológicas e bioquímicas, permitiu uma compreensão sobre a ecologia do grupo.

Embora a abordagem integrativa seja uma ferramenta aparentemente descomplicada, é necessário seguir algumas práticas para sua aplicação: a) não identificar as espécies que serão estudadas, para que não haja nenhuma hipótese prévia; b) trabalhar com cluster de agrupamentos, seja por dados morfológicos, bioquímicos ou genéticos, que por sua vez serão usados para testar as hipóteses; c) sempre que possível utilizar dados de genética de população; d) por fim, depois da junção dos diferentes caracteres obtém-se uma hipótese, sendo significativa se 95% dos dados forem correspondentes (SCHLICK-STEINER et al., 2010). Esse tipo de abordagem pode ser aplicado em diferentes grupos, como de bactérias e fungos (DAS et al., 2014; SHARMA; POLKADE; SHOUCHE, 2015), espécies de invertebrados (KRUG et al., 2013) e vertebrados (BHULLAR et al., 2015).

Em relação à eficiência das diferentes ferramentas para aplicação da abordagem integrativa em microalgas, é possível notar que nos últimos anos a utilização de dados genéticos, como sequências de DNA, tem sido vista como uma solução bastante conveniente para os problemas de definição de espécie, sendo utilizada na última década como uma ferramenta segura para esse fim (MALAVASI et al., 2016). No entanto, a delimitação filogenética também tem seus problemas, por exemplo, resultados diferentes emergem com diferentes métodos de bioinformática, ou diferentes marcadores podem ser discordantes (DARIENKO et al., 2015; MALAVASI et al., 2016).

A diversidade filogenética em microalgas é muito ampla e reflete em uma gama igualmente ampla de metabolismos e propriedades bioquímicas (FINKEL et al., 2016). Outro campo que pode auxiliar na delimitação de espécie é o bioquímico, a diversidade genética resulta em diversidade bioquímica (KIM; CHOJNACKA, 2015). Para Borowitzka (2016), os avanços em metabolômica e proteômica também impactarão nosso entendimento sobre o que é uma espécie em microalgas. Alguns dados

quimiotaxonômicos têm sido utilizados para taxonomia de algas, por exemplo, os espectros de FTIR-ATR (do inglês, Attenuated Total Reflectance) (DE MORAES; VIEIRA, 2014), proteínas caracterizadas por MALDI-TOF (LEE et al., 2015; MELLO et al., 2017), ou ácidos graxos por GC-MS (LANG et al., 2011).

A abordagem integrativa permite a aplicação de um conceito de espécies mais robusto para as diferentes áreas da biologia (BITTNER et al., 2010). Por exemplo, a diversidade ecológica pode ser mais importante para planos de conservação do que a diversidade genética de um marcador específico; as diversidades fisiológica e bioquímica podem ser importantes para decisões sobre manutenção de diferentes cepas em bancos de cultivo. Por exemplo, Borowitzka (2016) cita vários trabalhos que reportaram variações fisiológicas e bioquímicas importantes em isolados ou cepas “da mesma espécie” de diatomáceas, dinoflagelados e haptófitas. Para Brodie et al. (2017), nos próximos anos será fundamental que ficologistas utilizem novos métodos científicos para identificar as variedades e as variações na delimitação de espécie.

1.5 Considerações finais

As microalgas têm uma diversidade de espécies incalculável. Por terem, na maioria das vezes, reprodução assexuada, muitas espécies crípticas e serem altamente plásticas são um desafio para a delimitação de espécie. As alterações ambientais exercem um papel fundamental nas alterações morfológicas, genéticas, bioquímicas e em suas relações ecológicas. É de extrema importância compreender o papel da plasticidade fenotípica e da seleção natural na delimitação de espécie, uma vez que estes podem levar a uma identificação errônea, podendo superestimar ou subestimar a biodiversidade deste grupo. Além disso, os interesses comerciais e farmacêuticos por microalgas têm sido

crescente, de tal forma que sua identificação correta passa a ser uma questão de saúde pública. Em relação às questões taxonômicas, acreditamos que seja mais vantajoso ter conhecimento sobre as relações que envolvem a delimitação de espécie do que um levantamento numérico de diversidade deste grupo. Para tanto uma abordagem integrativa permite um conhecimento amplo sobre a delimitação de espécies de microalgas.

1.6 Referências

AGAPOW, P. M. et al. The impact of species concept on biodiversity studies. **Quarterly Review of Biology**, v. 79, n. 2, p. 161–179, 2004.

AGNARSSON, I.; KUNTNER, M. Taxonomy in a changing world: seeking solutions for a science in crisis. **Systematic Biology**, v. 56, n. 3, p. 531–539, 2007.

ALPERT, P.; SIMMS, E. L. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? **Evolutionary Ecology**, v. 16, n. 3, p. 285–297, 2002.

BARBEROUSSE, A.; SAMADI, S. Species from Darwin onward. **Integrative Zoology**, v. 5, n. 3, p. 187–197, 2010.

BENDIF, E. M. et al. Integrative taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): a reassessment. **Protist**, v. 162, n. 5, p. 738–761, 2011.

BHULLAR, B. A. S. et al. A molecular mechanism for the origin of a key evolutionary innovation, the bird beak and palate, revealed by an integrative approach to major transitions in vertebrate history. **Evolution**, v. 69, n. 7, p. 1665–1677, 2015.

BITTNER, L. et al. Some considerations for analyzing biodiversity using integrative metagenomics and gene networks. **Biology Direct**, v. 5, p. 1–17, 2010.

BOROWITZKA, M. A. Systematics, taxonomy and species names: do they matter? In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). . **The physiology of microalgae**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 655–681.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: CASPARI, E. W.; THODAY, J. M. (Eds.). **Advances in genetics**. [s.l.] Academic Press,

1965. p. 115–155.

BRODIE, J. et al. The algal revolution. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 8, p. 726–738, 2017.

CARON, D. A.; HU, S. K. Are we overestimating protistan diversity in nature? **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 197–205, 2019.

CARSTENS, B. C. et al. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.

CHANDLER, C. E. et al. Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 5, p. 1–18, 10 dez. 2019.

CHIU, S. Y. et al. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9135–9142, 2011.

CLARIDGE, M. R.; DAWAH, H. A. **Species: the units of biodiversity**. 1. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 1997.

CONOVER, D. O.; SCHULTZ, E. T. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 6, p. 248–252, 1995.

CRACRAFT, J. Phylogenetic models and classification. **Systematic Zoology**, v. 23, n. 1, p. 71–90, mar. 1974.

CRISPO, E. Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, n. 6, p.

1460–1469, nov. 2008.

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.

DARWIN, C. On the origin of species. **published on**, v. 24, 1859.

DAS, S. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80–100, 2014.

DAVIS, M. A.; THOMPSON, K.; GRIME, J. P. Invasibility: the local mechanism driving community assembly and species diversity. **Ecography**, v. 28, n. 5, p. 696–704, out. 2005.

DAY, J. G. et al. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a Pan-European scientific and biotechnological resource (the COBRA project). **Cryo-Letters**, v. 26, n. 4, p. 231–238, 2005.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407–415, 2005.

DE MORAES, G. P.; VIEIRA, A. A. H. Fourier transform infrared with attenuated total reflectance applied to the discrimination of freshwater planktonic coccoid green microalgae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.

DRAGHI, J. A.; WHITLOCK, M. C. Phenotypic plasticity facilitates mutational variance, genetic variance, and evolvability along the major axis of environmental variation. **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2891–2902, 2012.

DU RIETZ, G. E. **The fundamental units of biological taxonomy**. [s.l.] Svensk Botaniska Foreningen, 1930.

FAWLEY, M. W. et al. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142–154, fev. 2005.

FINKEL, Z. V. et al. Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

GARCIA DA SILVA, T. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 1 abr. 2017.

GIENAPP, P. et al. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 167–178, 2008.

GOMEZ-MESTRE, I.; JOVANI, R. A heuristic model on the role of plasticity in adaptive evolution: plasticity increases adaptation, population viability and genetic variation. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1771, 2013.

HESSEN, D. O.; VAN DONK, E. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 127, n. 2, p. 129–140, 1993.

HEY, J. et al. Understanding and confronting species uncertainty in biology and

- conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 11, p. 597–603, 2003.
- HOEK, C.; STAM, W. T.; OLSEN, J. L. The emergence of a new chlorophytan system, and Dr. Kornmann's contribution thereto. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 42, n. 3–4, p. 339–383, set. 1988.
- HOUGHTON, J. T. et al. **Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. New York, USA: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 2001.
- KIM, S.-K.; CHOJNACKA, K. **Marine algae extracts**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- KIMBEL, W. H.; MARTIN, L. B. (EDS.). **Species, species concepts and primate evolution**. 1. ed. Boston, MA: Springer US, 1993.
- 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.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295–326, 2012.
- KRISMER, J. et al. Single-cell mass spectrometry reveals the importance of genetic diversity and plasticity for phenotypic variation in nitrogen-limited *Chlamydomonas*. **ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 988–998, 2017.
- KRUG, P. J. et al. Integrative species delimitation in photosynthetic sea slugs reveals twenty candidate species in three nominal taxa studied for drug discovery, plastid

symbiosis or biological control. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 1101–1119, 2013.

LANDE, R. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1435–1446, 2009.

LANG, I. et al. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

LEE, H. W. et al. Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 630–634, 2015.

LELIAERT, F. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LEWIS, L. A.; FLECHTNER, V. R. Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of Western North America. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 6, p. 1127–1137, 2004.

LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1535–1556, 2004.

LINDELL, D. The genus *Prochlorococcus*, Phylum Cyanobacteria. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 829–845.

MAJER, D. et al. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, v. 100, n. 9, p. 1107–1111, 1996.

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. e0151137, 30 mar. 2016.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. New York: Columbia University Press, 1942.

MAYR, E. **Uma ampla discussão: Charles Darwin e a gênese do pensamento evolutivo moderno**. [s.l.] Editora FUNPEC. Tradução, 2006.

MCCOURT, R. M. et al. Using *rbcL* sequences to test hypothesis of chloroplast and thallus evolution in conjugating green algae (Zygnematales, Charophyceae). v. 995, p. 989–995, 1995.

MELLO, R. V. et al. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, n. September, p. 151–160, 2017.

MUELLER, U. G.; LIPARI, S. E.; MILGROOM, M. G. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 1, p. 119–122, 1996.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. R. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 10, p. 389–394, 1999.

MÜLLER, J. et al. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and ITS rDNA sequences. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 6, p. 1236–1247, 2005.

MÜLLER, J. et al. Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after

cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 799–808, 2007.

PADILLA, D. K.; ADOLPH, S. C. Plastic inducible morphologies are not always adaptive: The importance of time delays in a stochastic environment. **Evolutionary Ecology**, v. 10, n. 1, p. 105–117, jan. 1996.

PAWLOWSKI, J. et al. Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: time for change. **European Journal of Protistology**, v. 55, p. 12–25, 2016.

PEÑA-CASTRO, J. M. et al. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. **Chemosphere**, v. 57, n. 11, p. 1629–1636, 2004.

PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 481–486, 2005.

PRICE, T. D. Phenotypic plasticity, sexual selection and the evolution of colour patterns. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2368–2376, 2006.

REBOLLOSO-FUENTES, M. M. et al. Biomass nutrient profiles of the microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 57–76, fev. 2001.

ROSENDAHL, S.; TAYLOR, J. W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP(TM). **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 821–829, 1997.

SCHAUM, C. E.; COLLINS, S. Plasticity predicts evolution in a marine alga. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1793, p. 20141486,

22 out. 2014.

SCHLICHTING, C. D.; PIGLIUCCI, M. **Phenotypic evolution: a reaction norm perspective**. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1998.

SCHLICK-STEINER, B. C. et al. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 421–438, 2010.

SHARMA, R.; POLKADE, A. V.; SHOUCHE, Y. S. “Species concept” in microbial taxonomy and systematics. **Current Science**, v. 108, n. 10, p. 1804–1814, 2015.

SIMPSON, G. G. **Principles of animal taxonomy**. New York: Columbia University Press, 1990.

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, jul. 2013.

SMITH-GILL, S. J. Developmental plasticity: developmental conversion versus phenotypic modulation. **American Zoologist**, v. 23, n. 1, p. 47–55, 1 fev. 1983.

TEMPLETON, A. R. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: ERESHEFSKY, M. (Ed.). **The units of evolution: essays on the nature of species**. [s.l.] MIT Press, 1989. p. 158–183.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

VAN VALEN, L. Ecological species, multispecies, and oaks. **Taxon**, v. 25, n. 2–3, p. 233–239, 26 maio 1976.

VOS, P. et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**,

v. 23, n. 21, p. 4407–4414, 1995.

WANG, X. et al. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **BMC Plant Biology**, v. 10, 2010.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249–278, nov. 1989.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 304B, n. 6, p. 610–618, 15 nov. 2005.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 844–851, 2005.

WILSON, R. A. **Species: new interdisciplinary essays**. [s.l.] The MIT Press, 1999.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97–159, jan. 1931.

2 PLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE ALGAS VERDES COCOIDES DA FAMÍLIA SELENASTRACAE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ABIÓTICAS E SUAS IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS

Abstract

The Selenastraceae is a family of green, coccoid, and asexual microalgae widely spread around the world and mainly found in freshwaters. However, the identification at species level in this family has been challenging, once there are many cryptic species as consequence of their simple morphology. The traditional taxonomy based only in morphological features has, in most cases, led to misleading results, as revealed by molecular studies. In fact, the genetic diversity found is by far greater than the morphologic one. Besides the cryptic morphology, phenotypic plasticity can also be misleading for species identification, but have been frequently disregarded in taxonomic studies of Selenastraceae. In this study, we first propose to evaluate the occurrence of morphological plasticity in 10 strains from 3 Selenastraceae genera which have similar semi-lunate cell morphology, namely: *Kirchneriella*, *Selenastrum*, and *Messastrum*, under different temperature, pH, and nitrate concentrations. Furthermore, we aimed to analyze if, despite the morphological plasticity, we could still use cell size (length, width, curvature or biovolume) as a diacritical tool for genera and species. Our results have shown that cell size responds to environmental conditions, and cell volume can increase or decrease up to 70% between different treatments. The response to each changing condition varied even between strains of the same species, revealing intraspecific

variation. However, with increasing temperature there was a tendency to decreased cell biovolume in all strains, possibly facilitating cell buoyancy. Finally, we found that, at least for two species *Kirchneriella lunaris* e *Kirchneriella obesa*, the morphometric characteristics (cell length, width and biovolume) could not be used as a diacritical tool.

2.1 Introdução

A definição de espécie nas microalgas verdes de água doce é uma tarefa complexa por se tratar de microrganismos com grande similaridade morfológica. Entre as microalgas verdes, a família Selenastraceae é considerada uma das que apresentam maior complexidade taxonômica devido à simplicidade de sua morfologia (KRIENITZ; BOCK, 2012). As Selenastraceae são microalgas cocoides exclusivamente assexuadas, encontradas em vários tipos de ambientes de água doce, sendo mais comuns e diversificadas em ambientes lacustres (KRIENITZ; BOCK, 2012). Essas microalgas possuem morfologia simples com formas fusiformes a cilíndricas, lunadas, retas ou sigmóides, sendo encontradas como células isoladas ou formando colônias (BICUDO; MENEZES, 2006; GARCIA DA SILVA et al., 2017; KOMÁREK; FOTT, 1983; KRIENITZ; BOCK, 2012).

A identificação morfológica do grupo é realizada pela combinação de diversas características como o tamanho e formato celulares, estilo de vida solitário ou colonial, o processo de liberação dos autósporos (células originadas através do processo de divisão mitótica e, conseqüentemente, reprodução assexuada) e preferências especiais de habitat (HINDÁK, 1984; KOMÁREK; FOTT, 1983). No entanto, devido a sua morfologia simples, as características diacríticas podem ser bastante sutis entre gêneros e espécies (MCCOURT et al., 1995).

Por muito tempo, as características morfológicas foram a principal ferramenta para a classificação e identificação dessas espécies. No entanto, para este grupo de microalgas verdes, as características morfológicas são ambíguas em nível de gênero e não refletem as relações filogenéticas (KRIENITZ; BOCK, 2012). Estudos recentes com marcadores moleculares tais como *rbcL*, ITS2 e 18S rDNA mostraram as dificuldades para a identificação de gêneros e espécies por meio da morfologia e revelaram que a

diversidade genética é bem maior do que morfológica e que, portanto, um mesmo morfotipo pode resultar em diferentes filotipos (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001; MCCOURT et al., 1995). Isso dificulta os levantamentos de diversidade fitoplanctônica e, conseqüentemente, o conhecimento da real distribuição das espécies.

Embora os trabalhos envolvendo a filogenia de Selenastraceae citados anteriormente tenham demonstrado a frequente ocorrência de convergência morfológica, trabalhos mais detalhados (e.g. (GARCIA DA SILVA, 2016; GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2011) demonstram a validade da identificação morfológica, pois há coesão filogenética para a maioria dos indivíduos de morfotipos de gêneros como *Chlorolobion*, *Raphidocelis*, *Kirchneriella*, *Ankistrodesmus*, *Tetranephis*. Contudo, alguns desses trabalhos demonstraram também a necessidade de estudo do ciclo de vida para obtenção de variações na morfologia e tamanho celular para cada espécie, uma vez que há variabilidade dos organismos em culturas dependendo da idade celular (FAWLEY et al., 2005; GARCIA DA SILVA, 2016; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 1969). Um exemplo é a *Selenastrum bibraianum* Reinsch que sofre alteração celular de semilunado a fusiforme durante o ciclo de vida, podendo aumentar ou diminuir seu volume celular (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

Além da convergência morfológica e da variação morfológica com a idade celular, outro complicador para a identificação das Selenastraceae é a plasticidade fenotípica. A plasticidade fenotípica refere-se a qualquer variação fisiológica ou morfológica induzida por variações ambientais, sejam bióticas ou abióticas (MORALES; TRAINOR, 1997; STEARNS, 1989). Embora variações morfológicas em microalgas cocoides de outros grupos tenham sido demonstradas (e.g., LUO et al., 2005; VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999), os estudos com Selenastraceae são escassos. Entretanto, o estudo

disponível na literatura mostrou que as características utilizadas para identificação podem variar substancialmente sob diferentes condições ambientais (WANG; LIU; CHEN, 2005), podendo levar a identificações erradas em amostras de diferentes habitats ou em organismos cultivados sob condições diferentes.

Apesar de esforços na tentativa de obtenção de características diacríticas para gêneros e espécies de Selenastraceae (KRIENITZ; BOCK, 2012), a plasticidade fenotípica é ainda pouco explorada em estudos taxonômicos, possivelmente pela grande complexidade taxonômica do grupo. No entanto, esses estudos podem mostrar se existem características menos variáveis intratáxons (espécies ou gêneros) e com maior variação intertáxons e, portanto, mais apropriadas como características diacríticas para identificação morfológica. Adicionalmente, podem demonstrar se determinada condição ambiental pode acentuar a diferença entre os táxons e facilitar a identificação morfológica. Além disso, ainda que não seja possível a definição de características diacríticas com trabalhos sobre plasticidade fenotípica, o conjunto de dados sobre variações fenotípicas pode ajudar a compor uma abordagem integrativa (ou seja, utilizando morfologia, marcadores moleculares, bioquímica, fisiologia e ecologia) para a taxonomia desses microrganismos (DARIENKO et al., 2015; DAS et al., 2014; MALAVASI et al., 2016).

Para além da taxonomia, os estudos sobre plasticidade podem fornecer também informações importantes para o entendimento da ecologia das espécies nos diversos ambientes, uma vez que tamanho e formato celular podem interferir, por exemplo, na taxa de predação por consumidores e aquisição de recursos (e.g., LITCHMAN; KLAUSMEIER, 2008; LÜRLING, 2003), além de trazer luz à compreensão dos processos de seleção natural, evolução e especiação (LANDE, 2009).

Neste contexto, nesse estudo propusemos analisar as variações morfométricas e a plasticidade fenotípica morfológica de 10 cepas de quatro espécies da família Selenastraceae: *Kirchneriella lunaris* (Kirchner) Möbius, *Kirchneriella obesa* (West) West & G.S.West, *Selenastrum bibraianum* Reinsch e *Messastrum gracile* T.S.Garcia, que possuem morfologia semelhante, mas compõem clados filogeneticamente diferentes (GARCIA DA SILVA, 2016; GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001). Em condições de cultivo semelhantes, as espécies de *Kirchneriella* possuem formatos celulares com pequena diferença na curvatura e sobreposição parcial da variação de tamanho (comprimento e largura) (GARCIA DA SILVA, 2016). A espécie *Messastrum gracile* foi recentemente reposicionada (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001), sendo anteriormente identificada morfológicamente como pertencente ao gênero *Selenastrum* (*S. gracile* Reinsch) e diferindo morfológicamente de *S. bibraianum* por ligeira variação na faixa de tamanhos e organização das células na colônia (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

Para o estudo da plasticidade fenotípica morfológica nessas microalgas, utilizamos cultivos experimentais com variações na temperatura, pH, e concentrações de nutrientes (nitrato) dos cultivos.

2.2 Materiais e métodos

Microalgas e cultivo

As dez cepas de microalgas investigadas (Tabela 2.1) foram axenizadas e são mantidas na Coleção de Culturas da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar, WDCM 835). Parte dessas cepas são provenientes da Coleção de Culturas pessoal da Dra. Christina Bock (CB), da Universidade Duisburg-Essen (Renânia do

Norte-Vestefália, Alemanha). Dessa forma, para algumas espécies foram analisadas cepas provenientes de diferentes continentes (Tabela 2.1).

As espécies foram escolhidas a partir de estudos anteriores com microalgas da família Selenastraceae para os gêneros *Kirchneriella* Schmidle, *Selenastrum* Reinsch e *Messastrum* T.S. Garcia, que são espécies com morfologias muito semelhantes. Embora o gênero *Kirchneriella* seja morfologicamente mais distinto de *Selenastrum* e *Messastrum*, este último gênero apresenta-se mais distante filogeneticamente dos dois primeiros (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

As cepas foram cultivadas em sistemas tipo *batch* (fechadas), em frascos Boeco® (250 mL), com 150 mL de meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), com adição de TRIS (0,5 g/L), pH 7,0, com intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação PAR oriunda de lâmpadas LED (3200 K) em fotoper\u00edodo de 12:12 horas e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. A aus\u00eancia de bact\u00e9rias foi testada em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) com adição de peptona (2%) e glicose (2%) no in\u00f3culo antes do in\u00edcio dos experimentos.

Desenho experimental

As cepas foram submetidas a cultivos em diferentes condi\u00e7\u00f5es de temperatura (23°C e 30°C), pH (7,0 e 8,5) e concentra\u00e7\u00e3o inicial de nitrog\u00eanio (1000 e 200 μM de nitrato). Ao todo, foram quatro tratamentos (tr\u00e9plicas de cultivos): Controle – Tc ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,0 e 1000 μM de nitrato); pH 8,5 - TpH ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 8,5 e 1000 μM de nitrato); Temperatura - Tt (30°C , pH 7,0 e 1000 μM de nitrato); e Nutrientes - Tn ($23^\circ\text{C} \pm 2$, pH 7,0 e 200 μM de nitrato). A concentra\u00e7\u00e3o de 1000 μM de nitrato \u00e9 a concentra\u00e7\u00e3o padr\u00e3o do meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972). As tr\u00e9plicas de cultivos das 10 cepas nas diferentes condi\u00e7\u00f5es de cultivo totalizaram 120 cultivos experimentais.

Anteriormente ao experimento, foram obtidas curvas de crescimento para cada alga em cada tratamento. As densidades foram determinadas por espectrofotometria de absorvância de acordo com Griffiths et al. (2011) (espectro Hach DR 5000, Canadá) e pela fluorescência da clorofila *a in vivo* utilizando o fluorímetro Turner Designs (Sunnyvale, CA) após 30 minutos de aclimatação ao escuro (PARKHILL; MAILLET; CULLEN, 2001). Durante os experimentos, o dia de amostragem variou entre os tratamentos de acordo com a curva de crescimento. No entanto, em cada tratamento todas as cepas foram amostradas no mesmo dia, enquanto estavam entre a metade e o fim do crescimento exponencial.

Análises morfológicas e estatísticas

As análises morfológicas foram feitas usando um microscópio Zeiss Axio plan 2 (Jena, Alemanha). As imagens foram obtidas com uma câmera Zeiss Axio CamHRc utilizando software Axiovision 4.5 (Zeiss), por meio do qual foram obtidos os valores de comprimento, largura e curvatura celular de 30 indivíduos para a réplica de cada cepa. O comprimento foi a medida de ponta a ponta da célula, acompanhando a curvatura celular, enquanto para a curvatura celular, considerou-se a medida em linha reta de ponta a ponta da célula. O biovolume foi obtido para cada indivíduo conforme a equação sugerida por Hillebrand et al. (1999) e Sun e Liu (2003), adaptadas no Banco de Fórmulas – External Quality Assessment Trial do Phytoplankton: ($V = \frac{2}{15}\pi b^2 a$), sendo *a* e *b* o comprimento e a largura celular, respectivamente. As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.3 Resultados

Os três gêneros estudados (*Kirchneriella*, *Selenastrum* e *Messastrum*) apresentaram variações morfológicas diferentes para cada tratamento. De forma geral, houve tendência de redução no biovolume celular com o aumento da temperatura, mas não houve um padrão no comportamento para as espécies em relação aos outros tratamentos (Figura 2.1). As demais variações morfológicas entre cepas e espécies são discriminadas abaixo para cada um dos gêneros estudados.

Kirchneriella

As nossas observações, considerando as diferenças abióticas, demonstraram valores de comprimento e largura diferentes aos originalmente descritos para ambas as espécies do gênero *Kirchneriella*. Tanto os comprimentos mínimo (6,7 μm) e máximo (29,6 μm), como largura máxima (10,2 μm) foram maiores do que os descritos por Möbius (1894). No entanto, a largura mínima encontrada em nosso estudo foi ainda menor do que a descrição original (2,3 μm) (Tabela 2.2).

As espécies do gênero *Kirchneriella* tiveram respostas diferentes aos tratamentos TpH e Tn, *K. lunaris* aumentou seu biovolume com o aumento do pH, enquanto o biovolume de *K. obesa* diminuiu. Não houve diferenças significativas para *K. obesa*, exceto no tratamento Tt (Figura 2.1). Já com a redução na concentração de nitrato (tratamento Tn), houve uma diminuição no biovolume das células da *K. lunaris*, enquanto o biovolume das células de *K. obesa* se mantiveram próximos ao controle (Tc). Para o tratamento Tt, como já mencionado, ambas as espécies tiveram diminuições significativas do volume (Figura 2.1 a e b).

As espécies de *K. lunaris* apresentaram um aumento significativo no biovolume com o tratamento de pH e uma diminuição significativa com o tratamento de nutrientes.

Já a *K. obesa* não apresentou diferenças significativas para esses tratamentos. No tratamento Tt, as duas espécies apresentaram reduções significativas no biovolume (Figura 2.1 a e b).

A maior variação entre o controle e os tratamentos ocorreu para cepa de *K. lunaris* CCMA-UFSCar 443 (Figura 2.2), em que o comprimento celular diminuiu em média 34% (5,6 μm) no tratamento Tn e aumentou em média 22% (3,7 μm) no TpH (Tabela 2.3). Já para as medidas de largura, não houve diferenças significativas no tratamento TpH, mas houve redução de 32% (2,1 μm) e 20% (1,3 μm) nos tratamentos Tt e Tn, respectivamente (Tabela 2.3). Em relação ao biovolume, as variações foram consideradas muito significativas chegando à diminuição de 58% (167 μm^3) com a redução da concentração de nitrato (Tn) e 68% (196 μm^3) com o aumento da temperatura (Tt).

Ainda dentro da mesma espécie, a cepa CCMA-UFSCar 87 não apresentou diferença significativa relacionada ao comprimento. Por outro lado, foram observadas uma diminuição de 7% (0,4 μm), 19% (1,1 μm) e 16% (0,9 μm) nas medidas de largura para os tratamentos TpH, Tt e Tn, respectivamente. As variações de biovolume foram consideradas muito significativas apenas para o tratamento Tt, no qual houve uma diminuição de 33% (56,5 μm^3) do volume celular quando comparado ao controle.

Por outro lado, as cepas de *K. obesa* não apresentaram respostas significativas com o aumento de pH (TpH), exceto para largura nas cepas CCMA-UFSCar 345 e CB 2012/37 (Figura 2.2). No entanto, a resposta em relação a Tt e Tn variou dependendo da cepa. Para a cepa de *K. obesa* CCMA-UFSCar 345, houve diminuição significativa do comprimento celular nos tratamentos Tt e Tn, de 10% (1,2 μm) e 15% (1,9 μm), respectivamente. A cepa CCMA-UFSCar 516 apresentou diferença significativa no tratamento Tt com uma diminuição de 23% (3,6 μm) no comprimento, 38% (2,5 μm) na largura e 71% (209,5 μm^3) no biovolume; e para o tratamento TpH houve uma diminuição

de 49% (144 μm) na largura (Tabela 2.2; Figura 2.2 e 2.3[1 e 2]). Nenhum dos tratamentos alterou significativamente o comprimento das células da cepa CB 2012/37. Porém, com o tratamento TpH a largura e o biovolume aumentaram significativamente 16% (0,8 μm) e 37% (67,7 μm^3), respectivamente, (Figura 2.2 - 2.3[3 e 4]) e no tratamento Tn, 33% (1,6 μm) na largura e 67% (121 μm^3) no biovolume.

Em relação à curvatura, todas as linhagens do gênero *Kirchneriella*, aumentaram a distância entre as pontas das células nos tratamentos TpH e Tn e diminuíram com o tratamento Tt quando comparadas ao controle, exceto a cepa CB 2012/37, que aumentou a curvatura nos tratamentos TpH e Tt e diminuiu no tratamento Tn (Figura 2.5).

Selenastrum

As cepas do gênero *S. bibrainum* mantiveram uma faixa de tamanho do biovolume celular próximo para os tratamentos Tc, TpH e Tn. No entanto, os valores dos tamanhos máximos dos biovolumes nos tratamentos TpH e Tn foram inferiores ao Tc, e os valores dos tamanhos mínimos foram superiores ao Tc (Tabela 2.2).

As cepas de *S. bibrainum* também apresentaram variações morfológicas distintas quando submetidas aos diferentes tratamentos. A cepa CCMA-UFSCar 630 apresentou aumento significativo de 9% (2,6 μm) no comprimento para o tratamento TpH, e uma diminuição de 4% (1,2 μm) no comprimento com o tratamento Tt (Figura 2.4) quando comparados ao controle. Os tratamentos Tt e Tn também reduziram significativamente a largura celular em 42% (2,8 μm) e 11% (1,3 μm), respectivamente, quando comparadas ao controle. Consequentemente, o biovolume celular diminuiu significativamente 67% (378,8 μm^3) no tratamento Tt e 39% (224,3 μm^3) no Tn.

Semelhante ao encontrado para a cepa CCMA-UFSCar 630, a cepa CB2009/36 apresentou aumento significativo de 14% (3,5 μm) no comprimento no tratamento TpH.

No entanto, para esta cepa todos os tratamentos alteraram significativamente a largura das células, sendo que para TpH e Tn houve um aumento de 18% (0,7 μm) e 51% (2,16 μm), respectivamente, enquanto ocorreu uma diminuição de 15% (0,6 μm) no Tt.

Para as medidas de curvatura, a cepa CCMA-UFSCar 630 não apresentou nenhuma diferença significativa, já para cepa CB 2009/36 em todos os tratamentos ocorreu um aumento considerado significativo (Figura 2.5).

Messastrum

Todas as cepas do gênero *Messastrum* foram identificadas como pertencentes à uma única espécie *M. gracile* no trabalho de Garcia et al (2017). As cepas de *Messastrum gracile* também mostraram uma diminuição do biovolume celular no tratamento Tt, embora não significativo para a cepa CCMA-UFSCar 5. No entanto, esta cepa foi a única que apresentou aumento significativo do biovolume no TpH (Figura 2.4). Observamos também que os valores máximos e mínimos foram maiores que nos outros tratamentos, no tratamento Tn houve uma diminuição do biovolume celular.

Em relação ao controle, a cepa CCMA-UFSCar 5 teve diminuição significativa de 6,3% (1 μm) no tratamento Tt, e aumento de 24% (0,7 μm) em relação ao comprimento, e 30% (0,9 μm) na largura no TpH 8,5 e Tn. Além disso, a cepa CCMA-UFSCar 470 apresentou diferença significativa no tratamento TpH (Figura 2.4), em que seu biovolume apresentou um aumento extremamente significativo de 57% (109 μm^3). Essa mesma cepa não apresentou nenhuma diferença significativa no comprimento, exceto no tratamento de TpH, enquanto para largura houve uma diminuição de 45% (2 μm) no Tt e 35% (1,3 μm) no Tn. O biovolume se mostrou muito significativo apenas para o tratamento Tt, com uma diminuição de 78% (87 μm^3) do volume celular.

A cepa CCMA-UFSCar 622 apresentou diferença significativa no tratamento TpH, ocorrendo aumentos no comprimento e no biovolume de 16% (3,4 μm) e 15 % (16 μm), respectivamente. No tratamento Tt, ocorreu uma diminuição de 49% (1,9 μm) na largura e 71% (99 μm), enquanto no tratamento Tn ocorreu uma diminuição de 49% (2,7 μm) no comprimento, 25% (1 μm) na largura e 35% (49 μm^3) no biovolume.

Os valores de curvatura variaram em cada cepa de acordo com os tratamentos: para a cepa CCMA-UFSCar 5 e CCMA-UFSCar 470 houve diferenças significativas em todos os tratamentos; a cepa CCMA-UFSCar 622 não apresentou diferença significativa no tratamento Tt, mas houve uma diminuição no TpH e um aumento no Tn considerados significativos.

2.4 Discussão

Ao se comparar o controle com os demais tratamentos, notamos que maioria das cepas apresentou diferenças significativas em resposta às variações abióticas, de acordo com os tratamentos. No entanto, as repostas às variações ambientais foram diferentes nos três gêneros, assim como entre as quatro espécies e as dez cepas estudadas.

Embora não tenham sido observadas repostas padrões no comportamento das cepas de uma mesma espécie em cada tratamento, notamos que em todas as cepas estudadas ocorreu uma diminuição (ainda que não significativa para algumas) no biovolume celular quando submetidas ao aumento de temperatura (Tt). Essas observações não são novidade. Por exemplo, segundo Bergmann (1847), Chisholm, (1992), e Zohary e Sommer, (2021) a temperatura da água afeta o fitoplâncton, tanto diretamente quanto indiretamente, causando mudanças na fisiologia e no metabolismo, que podem impactar suas atividades aquáticas. Zohary e Sommer (2021) notaram que a diminuição do biovolume celular conforme o aumento da temperatura é constantemente relatado em

diversos trabalhos com fitoplâncton, incluindo as microalgas de água doce. Atkinson et al. (2003), também notou esse padrão de comportamento para os protistas planctônicos que tendem a diminuir o biovolume com o aumento da temperatura. Segundo ele, a diminuição do tamanho celular a partir das respostas ao aumento da temperatura está relacionada com a plasticidade fenotípica das espécies.

Existem algumas explicações para a diminuição do biovolume celular em temperaturas mais elevadas, entre elas, duas estão relacionadas as propriedades físicas da água: (1) Densidade – o aumento da temperatura da água faz com que a densidade da água diminua, interferindo diretamente nas taxas de afundamento de pequenas partículas em suspensão, como o fitoplâncton (NASELLI-FLORES; ZOHARY; PADISÁK, 2021). As microalgas, como organismos fotossintéticos, precisam viver em suspensão, e com isso observa-se que a presença de células de menor biovolume se torna dominante, contribuindo para uma menor taxa de afundamento (ZOHARY; FLAIM; SOMMER, 2021). (2) Viscosidade – para reduzir a velocidade de afundamento o fitoplâncton adota alguns tipos de estratégias que estão relacionadas à “resistência à água e à forma das células” que pode ser quantificada pela equação de Stokes (PADISÁK; SORÓCZKI-PINTÉR; REZNER, 2003; ZOHARY; FLAIM; SOMMER, 2021). De acordo com a equação de Stokes, as taxas da velocidade de afundamento das partículas estão inversamente relacionadas à viscosidade e diretamente relacionadas à temperatura da água. Conforme a temperatura aumenta, a viscosidade diminui e a velocidade de afundamento aumenta. Para permanecer na zona fotossintética do corpo d’água as células precisam diminuir a área de contato. Considerando a equação de Stoke, Zohary et al. (2017) observaram que a velocidade de uma célula esférica muda de acordo com variação de temperatura, sendo as células com menor diâmetro as que apresentam menores velocidades de afundamento.

Infelizmente, não existem muitos estudos que relacionam temperatura, metabolismo, energia celular e biovolume. Uma hipótese que propomos é que em temperaturas mais elevadas o teor de clorofila e a quantidade de energia fotossintética aumentam (FANESI et al., 2016). Com o aumento do teor de clorofila, as células podem operar otimamente em termos de suprimento de energia (ANNING; HARRIS; GEIDER, 2001), uma parte dessa energia é absorvida e usada para construir nova biomassa e aumentar sua taxa de crescimento (como observado por Montagnes et al. (2003); Sayegh e Montagnes, (2011)). Com mais divisões celulares, ocorre uma diminuição do biovolume celular. Por outro lado, em baixas temperaturas a maior parte da energia celular é dissipada ou canalizada para manter as células em equilíbrio entre a absorção de energia e o consumo (ENSMINGER; BUSCH; HUNER, 2006; FANESI et al., 2016). Nesses casos, a plasticidade morfológica seria uma consequência da resposta plástica fisiológica.

A partir de outros estudos, notamos um registro constante de mudanças fenotípicas no tamanho das células de acordo com as alterações sazonais. Zohary et al. (2017) analisaram dados sobre registro anual do tamanho de espécies fitoplanctônica do lago Kinneret, Israel. Com base nesses dados, observou-se um padrão no comportamento das espécies no qual durante o verão diminuíam o seu tamanho e no inverno aumentavam. Para Miner et al. (2005), a adaptação fenotípica em respostas às mudanças ambientais é uma resposta plástica a qual os organismos aderem para a sua manutenção.

Em nosso estudo, observamos que indivíduos da mesma espécie, mas de cepas diferentes, apresentaram respostas morfológicas diferentes aos mesmos tratamentos, mostrando que além da plasticidade fenotípica de cada cepa para os diferentes tratamentos (Figura 2.2), há também uma variação intraespecífica (BRADSHAW, 1965).

As cepas mostraram diferentes graus de plasticidade, não havendo um padrão de comportamento para espécie diante das variações ambientais. Por exemplo, a cepa de *K.*

obesa (CCMA-UFSCar 516, isolada - Lago das Ninféias, São Paulo, cujo pH de isolamento era 4,6) apresentou volume celular reduzido quando submetidas ao TpH, enquanto a *K. obesa* CB2012/37 (isolada de um lago em Montbel, França, onde o pH de origem era 8,8) aumentou. É possível que essa diferença na resposta seja devido à diferente história de variações do ambiente de origem (local de isolamento). Segundo Lande (2009), a adaptação fenotípica às flutuações ambientais deve ocorrer frequentemente por uma plasticidade preexistente, tais comportamentos deixam claro que cada cepa carrega consigo uma memória plástica ambiental, plasticidade ancestral (NILSSON-EHLE, 1913).

A partir dos dados mostrado nas Figuras 2.2 e 2.3 (histogramas de biovolume celular – Figura S1), pudemos observar uma ampla variação de tamanhos. Além disso, observamos que a frequência de organismos presentes nas faixas de valores mínimos e máximos foi baixa e a maioria está representada como *outliers*. Dessa forma, existem dentro da população vários fenótipos que permanecem em situações adversas, mostrando que a plasticidade individual pode ser mantida parcialmente como subproduto de mais tipos plásticos. Portanto, em uma população quanto mais indivíduos plásticos menos chances de serem extintos (GIENAPP et al., 2008).

A plasticidade morfológica encontrada neste estudo amplia as faixas de tamanho celular (comprimento e largura) relatadas para as espécies utilizadas e ultrapassam os limites utilizados para a descrição dessas espécies (Tabela 2.2). Outros estudos como Couté, (2011); Osti (2013); Fonseca et al. (2014) que analisaram o biovolume de três das espécies aqui estudadas (*K. obesa*, *K. lunaris* e *S. bibraianum*) em diferentes regiões ou condições de cultivo, mostraram uma variação na faixa do volume celular. Para Sommer et al. (2017), o tamanho e outras características morfométricas determinam a capacidade do fitoplâncton para lidar com as pressões ambientais, sendo assim as variações

ambientais deixam marcas nas propriedades morfométricas na comunidade fitoplanctônica. Assim, a variabilidade nos tamanhos dos indivíduos em grande parte seria devido à plasticidade fenotípica.

Embora variações morfológicas resultantes de variações ambientais também possam ser devido à seleção natural sob variações genéticas, em nosso estudo, algumas evidências sugerem ausência de seleção. Por exemplo, as curvas de crescimento diário de três cepas (CCMA-UFSCar 443, CCMA-UFSCar 470 e CCMA-UFSCar 516) que apresentaram uma alteração importante na frequência de traços morfológicos em pelo menos um tratamento (Figura S1), mostram que não houve evidência de redução populacional no tratamento em relação ao controle (Figura S2). O mesmo ocorreu com a cepa CCMA-UFSCar 345, que manteve uma ampla faixa de tamanho celular, parecido ao Tc (Figuras S1 e S2). Os indivíduos tendem a apresentar um crescimento lento na fase de aclimatação sem queda abrupta no número de indivíduos ou com pequenas oscilações de crescimento quando as respostas da população são plásticas. Quando não há plasticidade, as células que não estão aptas ao novo ambiente podem permanecer vivas por um tempo, mas morrem posteriormente, tendo uma queda na curva de crescimento. Em nossas observações da curva de crescimento diária, não houve nenhuma queda abrupta, sugerindo que realmente nossas cepas responderam às mudanças ambientais através de plasticidade fenotípica e não de seleção natural.

Além disso, segundo Noble et al. (2019) a plasticidade fenotípica vem antes da genética adaptativa, quando uma população é submetida a estresse ambiental a primeira resposta é plástica. Embora a maioria dos estudos evolutivos foque nas mutações gênicas e genéticas adaptativas, nos últimos anos houve um crescimento no argumento da importância da plasticidade fenotípica. Mesmo que a plasticidade fenotípica possa servir como uma resposta emergencial, necessária para a sobrevivência, ela não facilita a

expressão gênica; quando há mudanças no ambiente a tendência é que ocorra uma reversão da expressão gênica para a forma anterior (HO; ZHANG, 2018).

Sabendo-se que os tamanhos das células, combinados com outras características morfológicas, fazem parte dos critérios de identificação de acordo com sistemática tradicional clássica da família Selenastraceae, o trabalho mostrou que a variabilidade morfológica, perante as variáveis ambientais, pode confundir a identificação das espécies e gêneros com base nos limites de comprimento, largura, biovolume celular e curvatura descritos na literatura (Tabela 2.2).

Observamos em nossos dados que os valores mínimos e máximos encontrados no comprimento celular e largura de *Selenastrum* em relação a *Messastrum* foram maiores, embora pelos dados originais da espécie, o comprimento celular de *Messastrum* seja maior (Tabela 2.2). Outras diferenças, nem sempre observáveis em amostras de levantamento de diversidade, como autosporia, também podem separar os gêneros *Kirchneriella* de *Messastrum* e *Selenastrum*, uma vez que o posicionamento do autósporo em *Kirchneriella* é paralelo e em *Messastrum* e *Selenastrum* em zig zag (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

De acordo com Garcia et. al. (2017), para identificar espécies do tipo *Kirchneriella*, além do tamanho e forma das células, devemos considerar a curvatura ou a torção celular, uma vez que essas características são cruciais para a identificação. Porém, em nossos resultados existe uma variação ampla na curvatura das células sob diferentes condições no ambiente, podendo assim ocorrer variações consideradas extremamente significativas, como por exemplo, a cepa CCMA-UFSCar 443 no Tt que apresentou uma média de 2,5 µm de curvatura e no TpH 4,9 µm, ou seja, quase o dobro. Logo, consideramos em nosso estudo que a curvatura também é uma característica variável.

Dessa forma, entendemos que a taxonomia morfológica deve considerar a variação de tamanho e formato relacionados às variações de fatores abióticos no meio em que estão inseridos antes da descrição de novas taxas, e para a proposição de faixas de tamanhos para as novas espécies descritas. Além disso, a grande variabilidade que encontramos indica a necessidade inclusão de outras ferramentas como marcadores moleculares e características fisiológicas para descrição de novas espécies em Selenastraceae.

2.5 Conclusão

Nesse trabalho foi analisada a plasticidade morfológica de quatro espécies da família Selenastraceae com morfologias similares sob diferentes condições de cultivos, com variações no pH, temperatura e nutrientes. De acordo com as análises realizadas, podemos elencar quatro comportamentos recorrentes das cepas em questão: (1) as variações ambientais alteram o tamanho dos organismos; (2) entre as cepas de mesma espécie não existem respostas similares frente aos diferentes tratamentos, cada cepa carrega consigo uma plasticidade fenotípica que pode estar relacionada com o seu ambiente de origem; (3) o aumento da temperatura tende a diminuir o biovolume celular em Selenastraceae; (4) não é possível utilizar faixas de tamanhos máximos e mínimos como ferramenta diacrítica entre as duas espécies ou gêneros estudados, embora haja diferenças na média de tamanhos celulares, especialmente, comprimento e biovolume, para os diferentes gêneros. A fim de uma análise e identificação precisas seriam necessários elementos como dados genéticos, morfológicos, fisiológicos e ambientais, compondo, portanto, uma abordagem integrativa.

2.6 Referências

ANNING, T.; HARRIS, G.; GEIDER, R. Thermal acclimation in the marine diatom *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae). **European Journal of Phycology**, v. 36, n. 3, p. 233–241, 2001.

ATKINSON, D.; CIOTTI, B. J.; MONTAGNES, D. J. S. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5%°C⁻¹. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1533, p. 2605–2611, 2003.

BERGMANN, C. **Ueber die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse**. [s.l.: s.n.].

BICUDO, C.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Brazil: Editora Rima, 2006.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: CASPARI, E. W.; THODAY, J. M. (Eds.). **Advances in genetics**. [s.l.] Academic Press, 1965. p. 115–155.

CHISHOLM, S. W. Phytoplankton size. In: P.G., F.; A.D., W.; K., V. (Eds.). . **Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea**. New York: Plenum Press, 1992. p. 213–237.

COUTE, A.; TELL, G. The genus *Kirchneriella* Schm. (Chlorophyceae) in Argentina: taxonomy and geographic distribution. **Cryptogamie, Algologie**, v. 32, n. 1, p. 97–104, 2011.

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.

DAS, S. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80–100, 2014.

ENSMINGER, I.; BUSCH, F.; HUNER, N. P. A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 1, p. 28–44, 2006.

FANESI, A. et al. Temperature affects the partitioning of absorbed light energy in freshwater phytoplankton. **Freshwater Biology**, v. 61, n. 9, p. 1365–1378, 2016.

FAWLEY, M. W. et al. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142–154, fev. 2005.

FONSECA, B. M. et al. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 9–30, 2014.

GARCIA DA SILVA, T. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 1 abr. 2017.

GARCIA DA SILVA, T. **Biodiversidade de Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): características morfológicas e sequenciamento dos marcadores moleculares 18S rDNA, rbcL e ITS como base taxonômica tradicional.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2016.

GIENAPP, P. et al. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 167–178, 2008.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with Chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, v. 35, n. 2, p. 403–424, 1999.

HINDÁK, F. **Studies on the Chlorococcal algae (Chlorophyceae), III**. Slovakia: Bratislava : Veda, 1984.

HO, W. C.; ZHANG, J. Evolutionary adaptations to new environments generally reverse plastic phenotypic changes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Das Phytoplankton des süßwassers. Systematik und biologie teil 7, 1. Hälfte. In: HUBER-PESTALOZZO, G. (Ed.). Stuttgart, Germany: Schweizerbart Science Publishers, 1983. p. 1044.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. **The systematics and ontogenesis of the genera Ankistrodesmus Corda and Monoraphidium gen. nov.** [s.l.] Academia, 1969.

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**, v. 47, n. 4, p. 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.

LANDE, R. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1435–1446, 2009.

LITCHMAN, E.; KLAUSMEIER, C. A. Trait-based community ecology of phytoplankton. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, n. August 2015, p. 615–639, 2008.

LUO, W. et al. Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): genotype versus phenotypical variability under ecosystem conditions. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 29, n. 1, p. 170–173, 2005.

LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie**, v. 39, n. 2, p. 85–101, 2003.

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. e0151137, 30 mar. 2016.

MCCOURT, R. M. et al. Using *rbcL* sequences to test hypothesis of chloroplast and thallus evolution in conjugating green algae (Zygnematales, Charophyceae). v. 995, p. 989–995, 1995.

MINER, B. G. et al. Ecological consequences of phenotypic plasticity. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 12, p. 685–692, 2005.

MÖBIUS, M. Australische Süßwasseralgen. In: [s.l.] Moritz Diesterweg, 1894. p. 310–350.

MONTAGNES, D. J. S.; KIMMANCE, S. A.; ATKINSON, D. Using Q10: can growth rates increase linearly with temperature? **Aquatic Microbial Ecology**, v. 32, n. 3, p. 307–313, 2003.

MORALES, E. A.; TRAINOR, F. R. Algal phenotypic plasticity: its importance in developing new concepts. **Algae**, v. 12, n. 3, p. 147–157, 1997.

NASELLI-FLORES, L.; ZOHARY, T.; PADISÁK, J. Life in suspension and its impact on phytoplankton morphology: an homage to Colin S. Reynolds. **Hydrobiologia**, v. 848, n. 1, p. 7–30, 2021.

NILSSON-EHLE, H. Sur Les Travaux de Sélection du Froment et de l’Avoigne Executés à Svalöf. **Bulletin Mensuel des Renseignements Agricoles et des Maladies des Plantes**, v. 4, p. 961–870, 1913.

NOBLE, D. W. A.; RADERSMA, R.; ULLER, T. Plastic responses to novel environments are biased towards phenotype dimensions with high additive genetic variation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 27, p. 13452–13461, 2019.

OSTI, J. A. S. **Características limnológicas e do fitoplâncton de viveiro de criação de tilápia-do-nilo e de wetlands construídas para o tratamento do efluente**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

PADISÁK, J.; SORÓCZKI-PINTÉR, É.; REZNER, Z. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton - an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 500, p. 243–257, 2003.

PARKHILL, J. P.; MAILLET, G.; CULLEN, J. J. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 4, p. 517–529, 2001.

SAYEGH, F. A. Q.; MONTAGNES, D. J. S. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3007–3013, 2011.

SOMMER, U. et al. Benefits, costs and taxonomic distribution of marine phytoplankton body size. **Journal of Plankton Research**, v. 39, n. 3, p. 494–508, 2017.

STEARNS, S. The evolutionary significance of phenotypic plasticity - phenotypic sources of variation among organisms can be described by developmental switches and reaction norms. **Bioscience**, v. 39, n. 7, p. 436–445, 1989.

SUN, J.; 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.

VAN DONK, E.; LÜRLING, M.; LAMPERT, W. Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits and impact on grazers. In: TOLLRIAN, R.; HARVELL, C. D. (Eds.). . **The ecology and evolution of inducible defenses**. [s.l.] Princeton University Press, 1999.

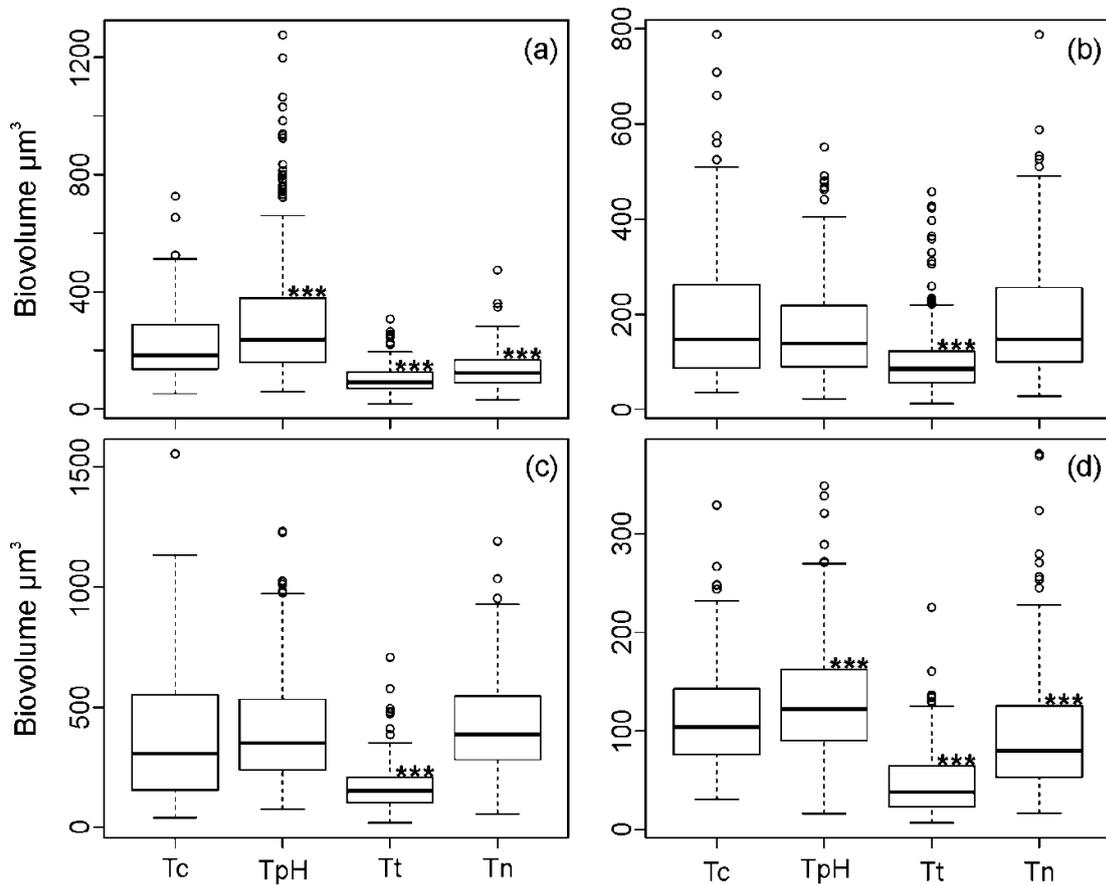
WANG, W. L.; LIU, S. L.; CHEN, P. C. Studies on the morphotype alternation in *Monoraphidium* sp. (Selenastraceae, Chlorophyta). **Cryptogamie, Algologie**, v. 26, n. 3, p. 243–257, 2005.

ZOHARY, T. et al. Larger cell or colony size in winter, smaller in summer—a pattern shared by many species of Lake Kinneret phytoplankton. **Inland Waters**, v. 7, n. 2, p. 200–209, 2017.

ZOHARY, T.; FLAIM, G.; SOMMER, U. Temperature and the size of freshwater phytoplankton. **Hydrobiologia**, v. 848, n. 1, p. 143–155, 2021.

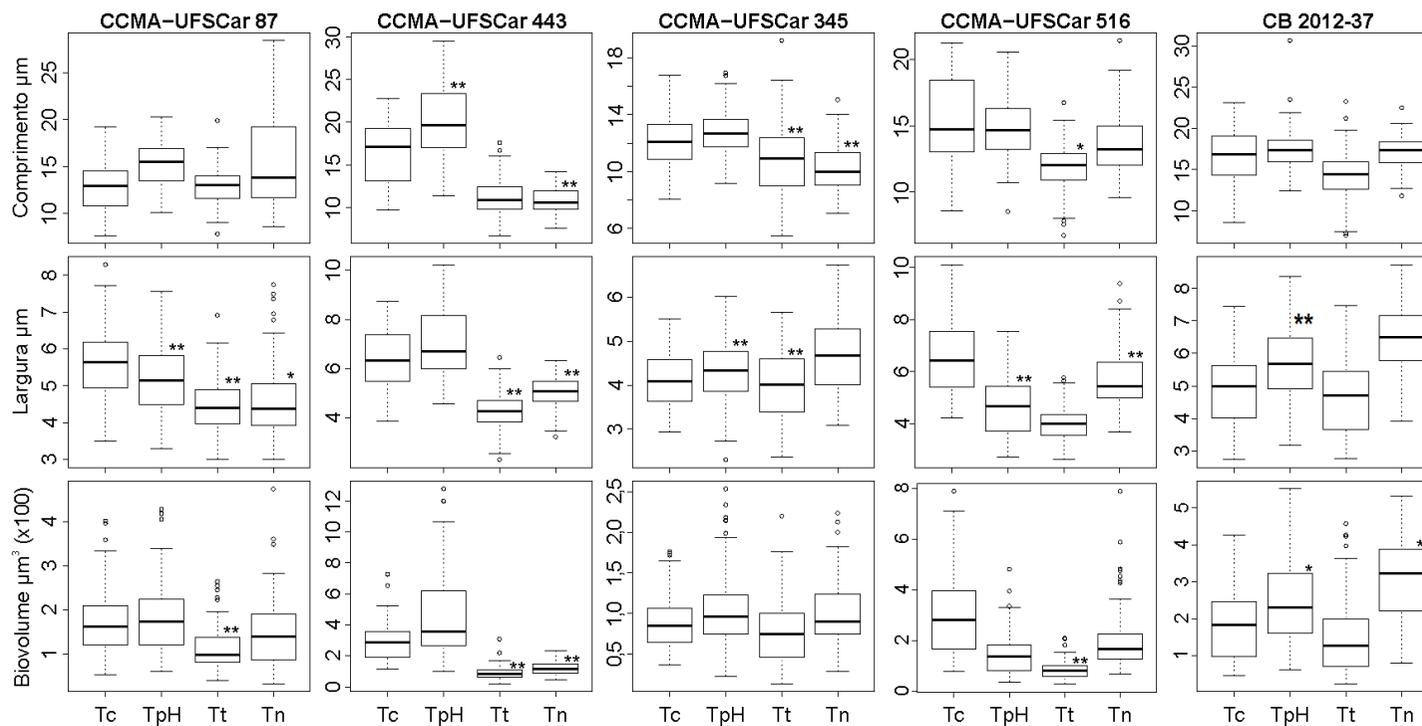
2.7 Figuras e tabelas

Figura 2.1 - Variações no biovolume celular para as espécies (a) *Kirchneriella lunaris* (CCMA 87 e CCMA 443), (b) *Kirchneriella obesa* (CCMA-UFSCAR 345, CCMA-UFSCAR 516 e CB 2012.37), (c) *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCAR 630 e CB 2009.36) e (d) *Messastrum gracile* (CCMA-UFSCAR 5, CCMA-UFSCAR 470 e CCMA-UFSCAR 622). Os *outliers* indicam possíveis valores discrepantes. As médias das medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



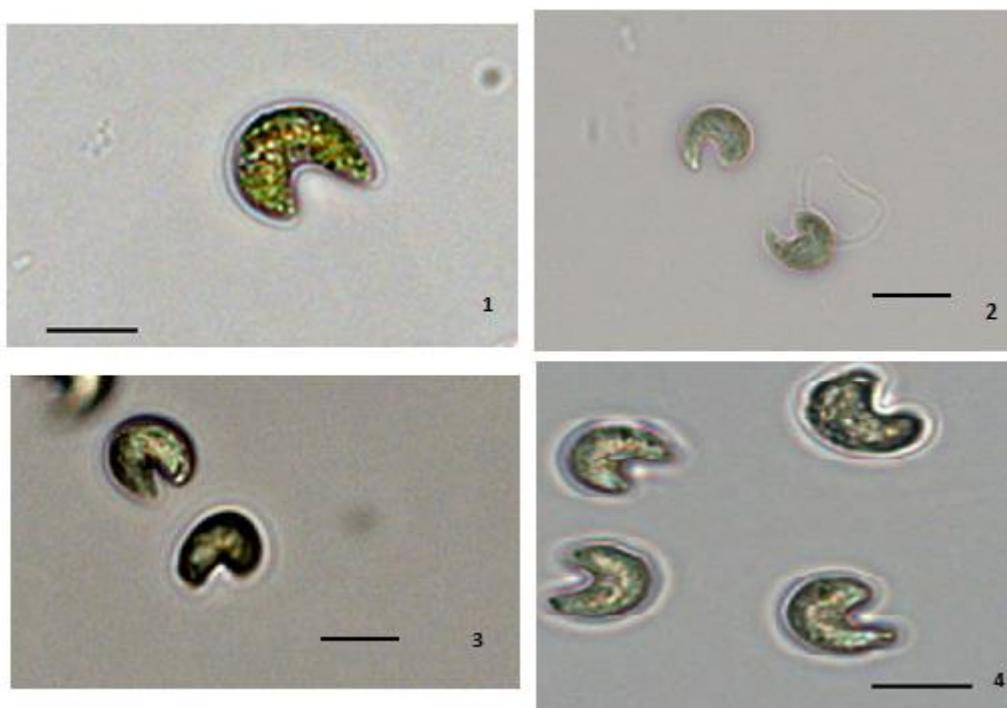
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2.2. - Variações de comprimento, largura e biovolume celular para *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 87 e CCMA-UFSCar 443) *Kirchneriella obesa* (CCMA-UFSCar 345, CCMA-UFSCar 516 e CB 2102/37). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



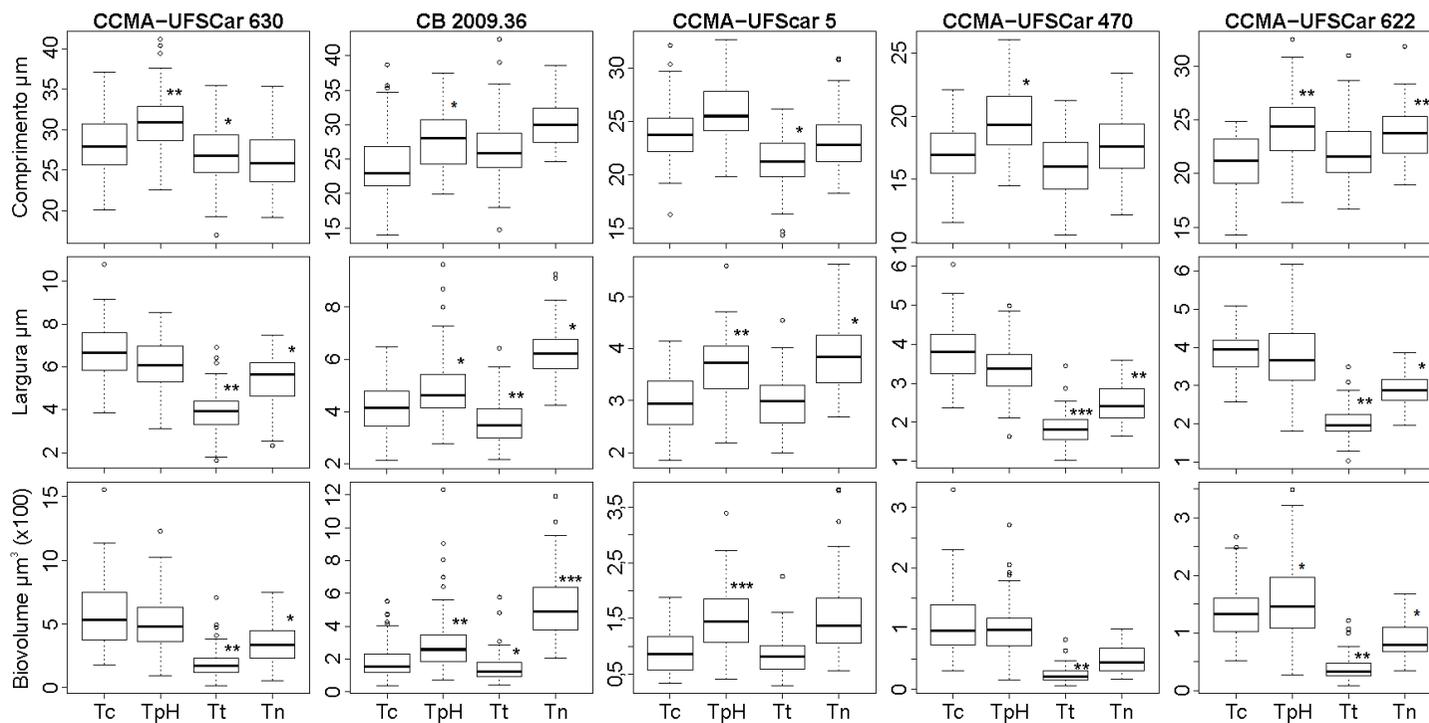
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2.3 - [1] *Kirchineriella obesa* – CCMA-UFSCar-516 no tratamento Tc; [2] *Kirchineriella obesa* – CCMA-UFSCar-516 no tratamento Tt; [3] *Kirchineriella obesa*-CB2012.37 no tratamento Tc; [4] *Kirchineriella obesa*-CB2012.37 no tratamento no TpH. Barra de escala 10 µm. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C.



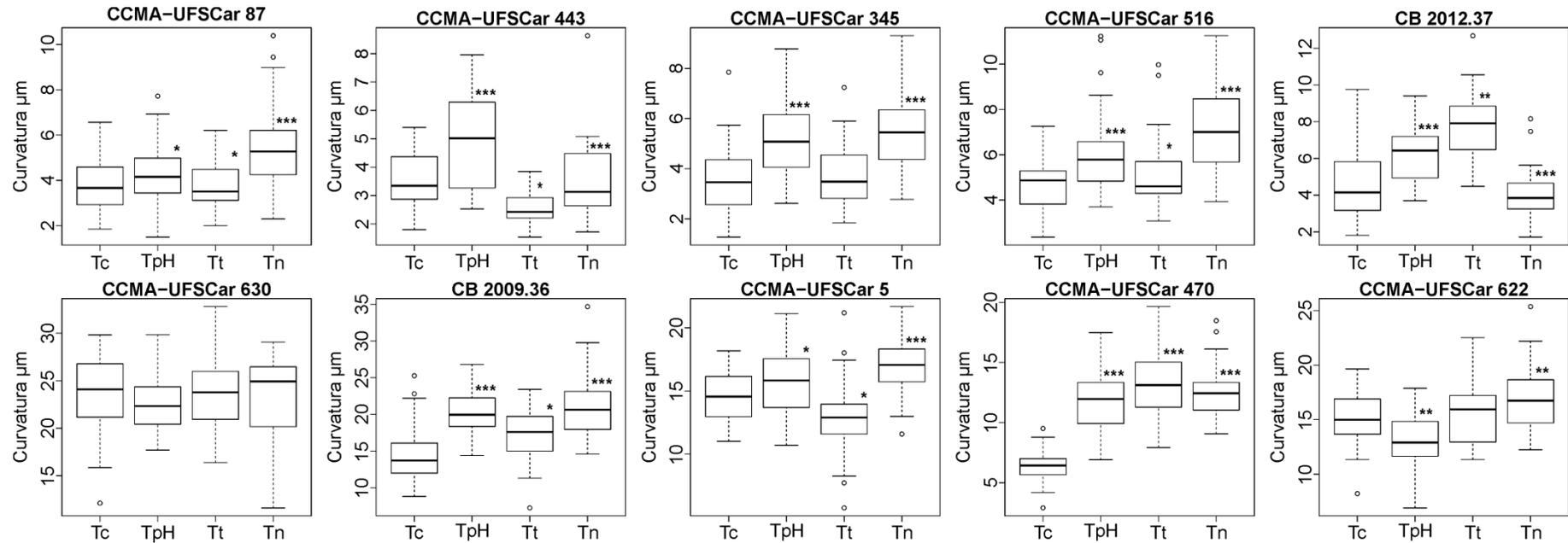
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2.4 - Variações de comprimento, largura e biovolume celular para *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 630 e CB2009.36) e *Messastrum gracile* (CCMA-UFSCar 005, CCMA-UFSCar 470 e CCMA-UFSCar 622). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2.5 - Variações de curvatura celular para *Selenastrum bibraianum* (CCMA- UFSCar630 e CB2009.36) e *Messastrum gracile* (CCMA- UFSCar 005, CCMA- UFSCar 470 e CCMA- UFSCar 622). As medidas celulares foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. Sendo: Tc – Tratamento controle; TpH -Tratamento pH 8,5; Tt – Tratamento temperatura 30 °C; Tn – Tratamento nitrato. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2.1. - Lista das microalgas utilizadas neste estudo, identificadas de acordo com a morfologia clássica e identificadas de acordo com (Korshikov 1987; Möbius, 1894, West e G.S.West, 1894, Garcia, 2016).

Espécie	Cepa	Local e ano de isolamento
<i>Kirchineriella</i>		
<i>Kirchineriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 087	Luis Antônio, São Paulo, Brasil, 1987
<i>Kirchineriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 443	Brotas, São Paulo, Brasil, 2012
<i>Kirchineriella obesa</i>	CB2012/37	Montbel, França*
<i>Kirchineriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 345	Pantanal, Mato Grosso do Sul, 2011
<i>Kirchineriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 516	São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012
<i>Selenastrum</i>		
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CB2009/36	Neuglobsow*, Alemanha, 1986
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CCMA-UFSCar 630	Buri, São Paulo, Brasil, 2013
<i>Messastrum</i>		
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 005	Itirapina, São Paulo, Brasil, 1978
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 470	Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo, 2012
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 622	Conchas, São Paulo, 2013

Tabela 2.2. - Características morfológicas das linhagens de algas utilizadas neste estudo e dados taxonômicos encontrados na literatura.

<i>Taxon</i>	Cepa	Controle (CxL) Biovolume (µm)	Tratamentos (CxL) Biovolume (µm)	Curvatura (µm) (Tc, TpH, Tt e Tn)	Dados Literatura Cellsize (CSz) (µm)		
<i>Kirchneriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 87	7,6 - 19,2 x 3,5 - 8,3	53,14 - 401,83	7,8 - 28,5 x 2,9 - 7,4	32,19 - 474,53	1,5 - 10,5	6 - 10 x 3 -5 (Möbius, 1894)
<i>Kirchneriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 443	9,4 - 22,8 x 3,9 - 8,7	117,35 - 726,27	6,7 - 29,6 x 2,3 - 10,2	64,18 - 1276,5	1,5 - 8,63	
<i>Kirchneriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 345	8,1- 16,8 x 2,9 -5,5	36,31 - 175,75	5,5 - 19,2 x 2,3 - 7,4	50,15 - 190,15	1,3 - 9,3	12-16 x 7-9 (West e G.S.West, 1894)
<i>Kirchneriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 516	8,5 - 21,3 x 4,2 - 10,1	76,52 -787,94	6,7- 21,4 x 2,6 - 9,4	27,19 -787,75	2,4 - 15,5	
<i>Kirchneriella obesa</i>	CB2012/37	8,5 - 23,1 x 4,2 - 10,1	46,29 - 425,93	7 - 31 x 2,8 -8,7	24,59 - 551,25	1,6 - 12,9	
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CCMA-UFSCar 630	20,1 -37,1 x 3,9 -10,8	180,12 - 1554,26	17 - 41,1 x 1,6 - 8,5	19,14 - 1227,55	11,6 - 33,8	10 -23 x 5 - 8 (Korhikov,1953)
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CB2009/36	14 - 38,7 x 2,1 - 6,5	40,19 - 550,68	14,8 - 42,4 x 2,2 - 9,6	90,37 - 598,49	8,1 -34,7	
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 005	16,3 - 32,2 x 1,9 - 4,2	33,99 - 187,57	14,3 - 32,7 x 2 - 5,6	30,14 -381,18	5,7 - 24,6	19 -56 x 1 - 5 (Reinsch, 1866) 19-55 x 1-6 (Garcia, 2016)
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 470	11,5 - 22,1 x 2,4 - 6	30,63 - 329,31	10,6 - 26,1 x 1-5	6,77 -271,03	2,9 -19,6	
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 622	14,3 - 26,7 x 2,6 - 5,3	51,64 - 267	15,1 - 30,9 x 1,8 - 6,2	9,16 - 348,74	6,9 - 25,7	

Tabela 2.3. - Valores médios das medidas celulares e seus respectivos desvios padrão, comp = comprimento (μm), larg = largura (μm), biov = biovolume (μm^3), curv = curvatura (μm) em cada tratamento (Tc, TpH, Tt e Tn) de todas as cepas utilizadas neste estudo. O valor de N=90, exceto para cepa CCMAA-UFSCar 443 (Tc), CB2009.36 (Tn) e CB2012.37 (Tn) que N = 60.

Cepa	Tc				TpH				Tt				Tn			
	Comp	Larg	Biov	Curv												
	\bar{x}/σ															
CCMA-UFSCar 87	12,7/3	5,5/1	170,7/74	3,7/1	15,2/2	5,2/0,8	177,9/75	4,2/1	12,8/2	4,48/0,7	114,2/49	3,7/	15,79/4,6	4,6/	149,1/77	5,9/2
CCMA-UFSCar 443	16,4/4	6,4/1	288,3/129	3,9/1	20,1/4	7/1	456,3/265	4,9/1	11,2/1	4,3/1	91,6/44	2,5/0,5	9/2	4,8/1	120,3/42	3,4/1
CCMA-UFSCar 345	12,1/2	4,1/0,6	88,5/32	3,4/1	12,8/2	4,3/1	106,3/48	5,1/1	10,8/2	4/1	78,1/39	3,7/1	10,2/2	4,7/1	97,9/38	5,4/1
CCMA-UFSCar 516	15,5/3	6,5/1	293,6/151	5/1	14,7/2	4,7/1	149,6/88	6,2/2	11,9/2	4/1	84,1/35	5,1/2	13,6/2	5,7/1	199,7/118	7,4/2
CB2012/37	16,5/3	4,9/1	181,1/94	4,4/2	17,4/2,5	5,7/1	248,9/108	6,2/2	14,3/3	4,7/1	148,4/100	4/1	17,1/2	6,5/1	315,8/114	7,4/2
CCMA-UFSCar 630	28,3/3	6,7/1	568/254	24,2/4	30,9/4	5,3/1	515,9/225	22,7/3	27,1/3	3,9/1	189,1/108	23,7/4	26,1/3	5,4/1	343,7/158	20,1/5
CB2009/36	24,3/5	4,1/1	193/118	16,4/5	27,8/4,3	4,9/1	302,7/184	20,4/3	26,6/4	3,5/1	148,1/82,3	17,1/4	30,3/3	6,3/1	524,5/203	21,9/4
CCMA-UFSCar 005	23,9/3	2,9/0,5	91,6/38	14/3	25,8/3	3,6/1	150,6/55	15,7/3	21,3/2	2,9/0,5	82,1/32	12,7/3	23,1/2,5	3,9/0,6	151,6/65	17,8/3
CCMA-UFSCar 470	17/2	3,8/1	111,5/54	8,5/2	19,6/3	3,7/1	98,2/43	11,4/3	16/2	1,8/0,4	24,3/12	13,3/3	17,6/2	2,5/0,5	48,6/20	12,4/2
CCMA-UFSCar 622	20,9/2	3,9/1	137,9/52	14,8/2	24,3/3	3,8/1	153,9/69	13/2	22/3	1,99/0,4	39,3/21	15,7/3	23,7/2	2,9/0,4	88,8/33	16,9/3

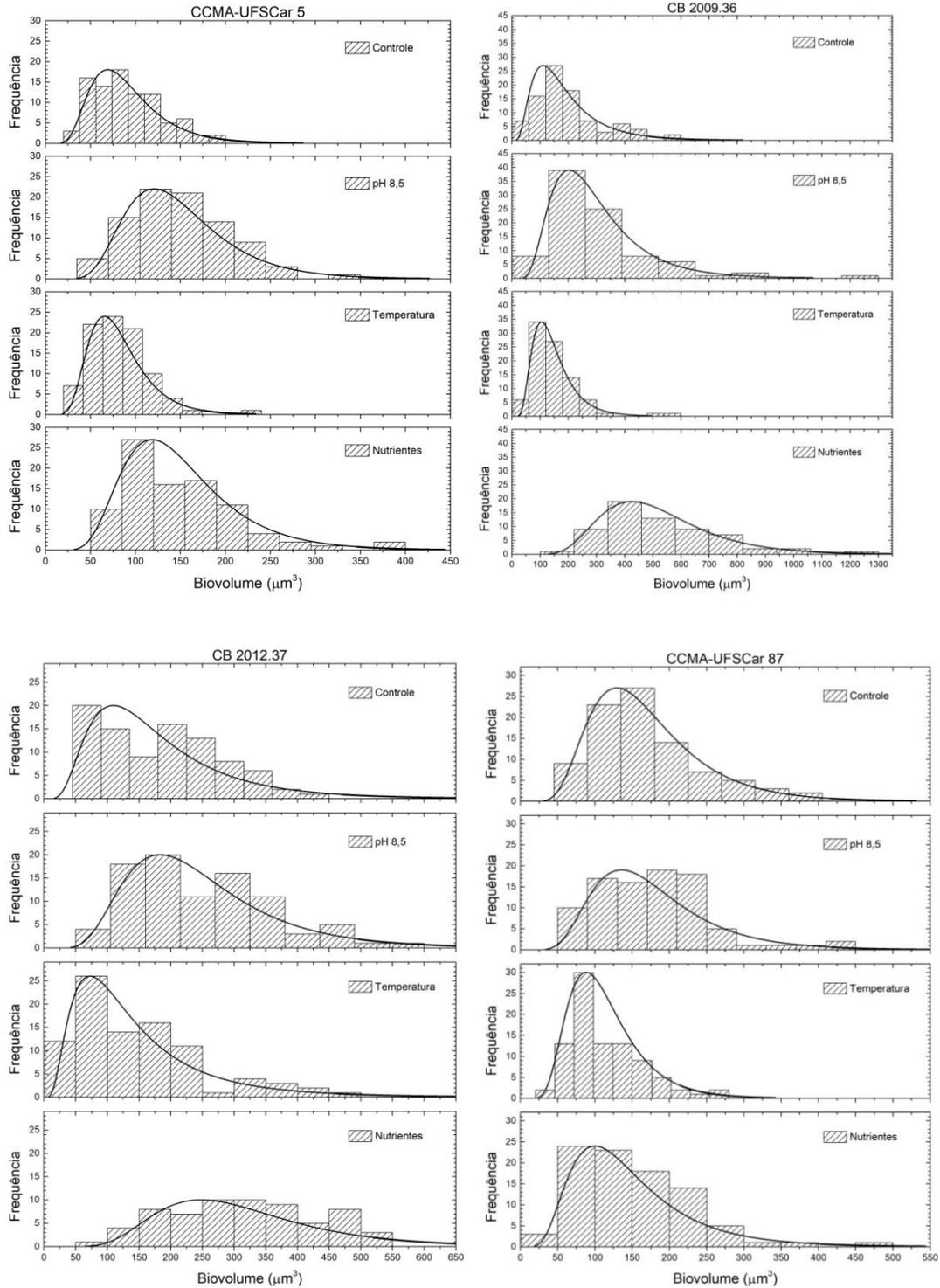
Material-Suplementar

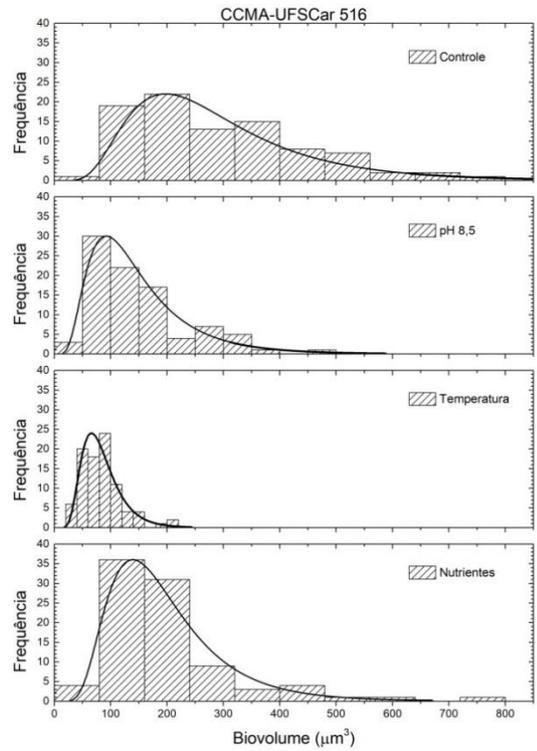
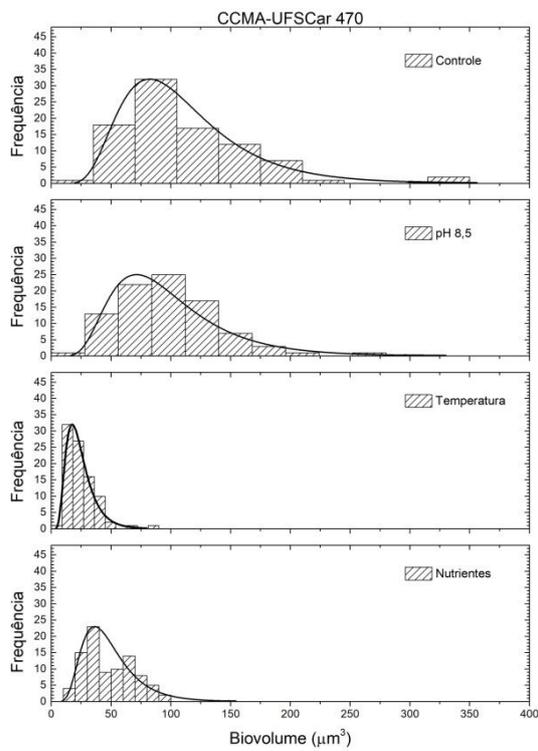
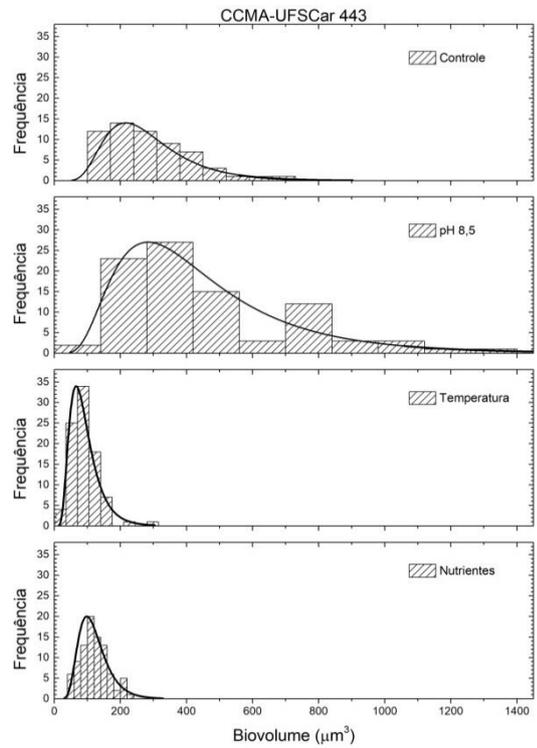
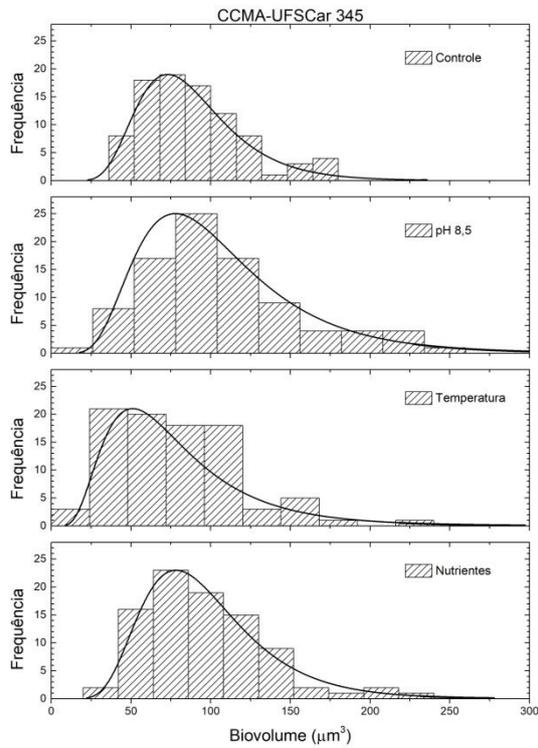
Tabela S1 - Dados com o nível de significância de cada cepa que foram comparadas entre os tratamentos e o controle por meio do teste-t de Student corrigido por Welch. O nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$, (* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001) ns= não significativa.

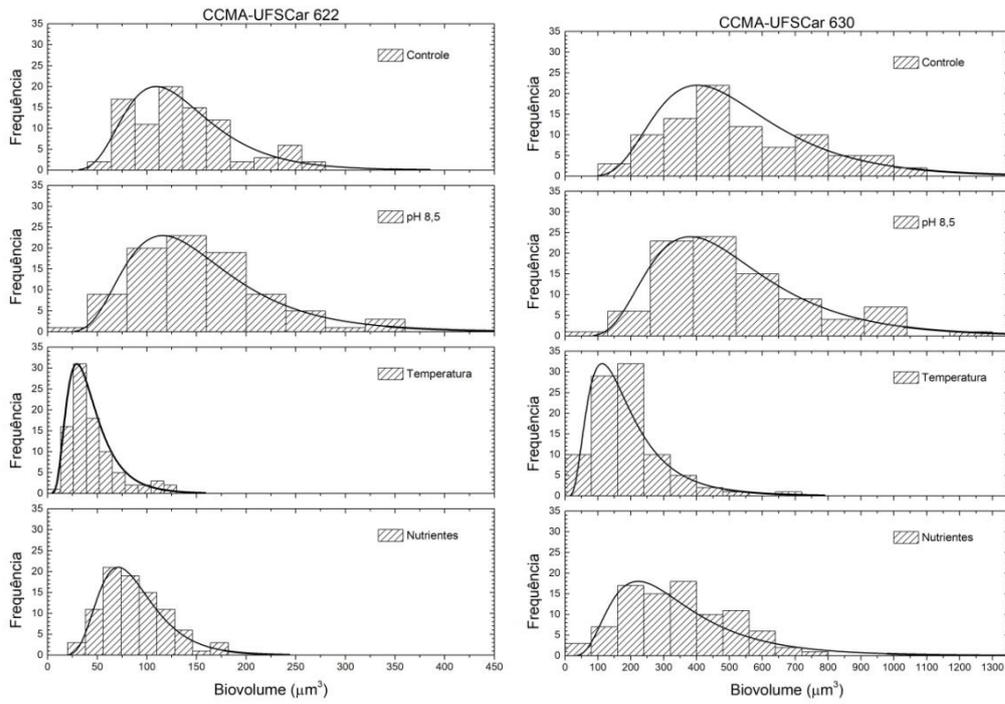
Cepa	TpH			Tt			Tn		
	C	L	B	C	L	B	C	L	B
CCMA-UFSCar 87	NS	**	NS	NS	**	**	NS	*	NS
CCMA-UFSCar 443	**	NS	NS	NS	**	**	**	**	**
CCMA-UFSCar 345	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	NS
CCMA-UFSCar 516	NS	**	NS	*	**	*	NS	NS	NS
CB2012/37	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	*	*
CCMA-UFSCar 630	**	NS	NS	*	***	**	NS	*	*
CB2009/36	*	*	**	NS	**	*	NS	*	***
CCMA-UFSCar 005	NS	**	***	*	NS	NS	NS	*	NS
CCMA-UFSCar 470	*	NS	NS	NS	***	**	NS	**	*
CCMA-UFSCar 622	**	NS	NS	NS	**	**	**	*	*
<i>Kirchneriella lunaris</i>	-	-	***	-	-	***	-	-	***
<i>Kirchneriella obesa</i>	-	-	NS	--	-	***	-	-	NS
<i>Selenastrum bibraianum</i>	-	-	NS	-	-	***	-	-	NS
<i>Messastrum gracile</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Histogramas

Figura S1 - Histogramas das variações e das frequências do biovolume celular para as dez cepas estudadas. N=90, exceto para cepa CCMAA-UFSCar 443 (Tc), CB2009.36 (Tn) e CB2012.37 (Tn) em que N = 60.



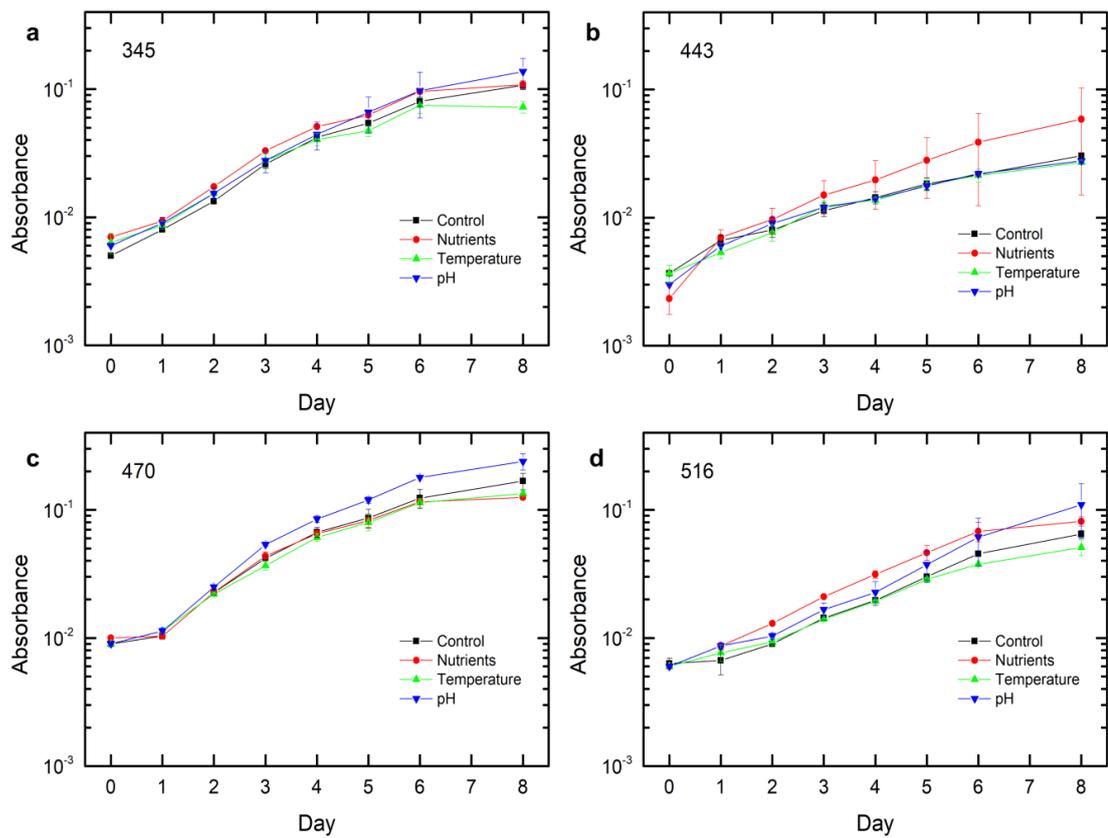




Fonte: Elaborada pelo autor.

Curva de crescimento diária

Figura S2 - Curvas de crescimento diárias obtidas pela diferença entre as absorbâncias em 680 nm e 750 nm e fluorescência da clorofila das cepas utilizadas nos quatros tratamentos: controle, nutrientes, temperatura e pH. [a] *Kirchneriella obesa* - CCMA-UFSCar 345; [b] *Kirchneriella lunaris* - CCMA-UFSCar 443; [c] *Messastrum gracile* - CCMA-UFSCar 470; [d] *Kirchneriella obesa*- CCMA-UFSCar 516).



Fonte: Elaborada pelo autor.

3 DELIMITAÇÃO DE GÊNEROS E ESPÉCIES DE MICROALGAS VERDES POR MEIO DE RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS SOB VARIAÇÕES AMBIENTAIS.

Abstract

The green microalgae of the Family Selenastraceae are a complex group for species delimitation. Initially, the taxonomy was based on morphological characteristics such as the organization level of vegetative state, and type of reproduction. With methodological advances, a phylogenetic approach with molecular markers has been employed attempting to solve the taxonomic problems of this family. However, phylogenetic studies have revealed cryptic species. Besides, the morphology can vary substantially under different environmental conditions, as they present phenotypic plasticity, with the risk of misidentifications in samples from different habitats or cultivated under different conditions. In this work, we tested species and genera delimitation using morphological and biochemical features in 3 genera of the family Selenastraceae (*Kirchneriella*, *Messastrum* and *Selenastrum*) under different environmental conditions such as temperature, pH, and different nitrogen concentrations. Biochemical physiological responses were more efficient in the separation of taxa and reflected the phylogenetic data available in the literature.

3.1 Introdução

A taxonomia é a principal ferramenta para a delimitação de espécie que sustenta o conhecimento da biodiversidade e seu manejo (DESALLE; EGAN; SIDDALL, 2005; FUJITA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2003). Por muito tempo, a delimitação das espécies em microalgas se baseou principalmente em dados morfológicos e de reprodução (LEWIS; MCCOURT, 2004; TOMASELLI, 2004; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1995). No entanto, desenvolvimentos recentes sobre conceitos de espécies e na análise e interpretação de dados usados para delimitar espécies têm tido implicações nas pesquisas taxonômicas (DARIENKO et al., 2015; DAS et al., 2014; LINDELL, 2014). Os conceitos filogenéticos (CRACRAFT, 1974) e evolutivo (SIMPSON, 1990), baseados em técnicas moleculares, têm sido frequentemente utilizados para compreensão das perspectivas ecológicas, moleculares e evolutivas na delimitação de espécies (HALL, 2008; LELIAERT et al., 2014).

As microalgas verdes de água doce são consideradas um grupo complexo para a delimitação de espécie. Inicialmente, a taxonomia foi baseada em características morfológicas como a organização do talo e tipo de reprodução (PRÖSCHOLD; LELIAERT, 2007; RINDI; RYŠÁNEK; ŠKALOUD, 2017). No entanto, para grupos como o da família Selenastraceae, as características morfológicas são ambíguas em nível de gênero e não refletem as relações filogenéticas (GARCIA DA SILVA, 2016; KRIENITZ; BOCK, 2012). Além disso, a morfologia pode variar substancialmente sob diferentes condições ambientais, pois apresentam plasticidade fenotípica, com o risco de identificações equivocada em amostras de diferentes habitats ou cultivadas em diferentes condições (LANDE, 2009; WANG; LIU; CHEN, 2005).

Uma abordagem filogenética com marcadores moleculares tais como *rbcl*, ITS2 e 18S rDNA tem sido empregada para melhor taxonomia de cepas da família Selenastraceae (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001). No entanto, a delimitação de

espécies filogenéticas ainda permanece um desafio. Além disso, informações de sequências DNA sem quaisquer outras evidências, não podem ser usadas por si só como indicadores para delimitação de espécie (CARSTENS et al., 2013). Os estudos filogenéticos moleculares, os quais têm revelado muitas espécies crípticas, muitas vezes não definem claramente o quão diferentes sequências de DNA detectadas deveriam ser a fim de resultar na delimitação de espécies (MALAVASI et al., 2016). O que se observa é um problema comum na família Selenastraceae: a pequena porcentagem de variação nos marcadores moleculares para delimitar espécie, além de muitas espécies separadas em pequenos gêneros (FAWLEY et al., 2005). Uma descrição de espécies para microalgas bem estabelecida precisa ir além das informações morfológicas e genéticas, ou seja, devem ser consideradas as características, fisiológicas, bioquímicas, ecológicas e de distribuição, levando à melhor resolução da posição taxonômica das variantes morfológicas (FAWLEY; FAWLEY, 2020; WOOD; LEATHAM, 1992).

A dificuldade para a identificação dessas microalgas e de outros microrganismos tem encorajado ainda mais estudos para a caracterização das espécies envolvendo uma abordagem integrativa, ou seja, com uma combinação de informações morfológicas, filogenéticas, fisiológicas e ecológicas (BENDIF et al., 2011; CARON; HU, 2019; DARIENKO et al., 2015; DAS et al., 2014; KRIENITZ; HUSS; BOCK, 2015; MALAVASI et al., 2016). Nessa abordagem, a fisiologia pode ser avaliada pela plasticidade (morfológica, bioquímica ou no crescimento) em diferentes condições ambientais, por exemplo Darienko et al. (2014). A quimiotaxonomia, utilizando diferentes compostos (HEGNAUER, 1962; LEWIS; SMITH, 1967; MORI et al., 2018; STACEY, 1974) ou perfis químicos obtidos de células inteiras (DE MORAES; VIEIRA, 2014; MELLO et al., 2017; PALMUCCI; GIORDANO, 2012), vem sendo usada em uma abordagem polifásica para taxonomia de microalgas verdes. No entanto, para uma taxonomia mais robusta, é necessário o estudo em diferentes condições ambientais, que ainda é escasso para microalgas (CARON; HU, 2019; DARIENKO et al., 2015).

Nesse estudo, espécies de microalgas da família Selenastraceae foram escolhidas a partir de estudos moleculares filogenéticos anteriores (GARCIA DA SILVA et al., 2017; KRIENITZ et al., 2001), os quais delimitaram importantes gêneros da família, ainda que, estudos sobre delimitação de espécies nesse caso sejam bastante escassos. Dessa forma, estudaremos a plasticidade fisiológica por meio de respostas morfológicas e bioquímicas em 3 gêneros da família Selenastraceae, considerando variações na concentração de nitrato, na temperatura e pH a fim de: (1) verificar se as mudanças (plasticidade) morfológicas e fisiológicas decorrentes das variações ambientais são semelhantes em gêneros morfológicamente mais semelhantes como *Selenastrum* Reinsche *Messastrum* TS. Garcia; (2) discutir a delimitação de espécies em *Kirchneriella* Schmidle a partir das respostas fisiológicas, usando os dados morfológicos e bioquímicos para análise taxonômica; (3) propor uma abordagem fisiológica mais rápida e eficiente para inserção em uma abordagem integrativa.

3.2 Materiais e métodos

Microalgas

As 11 cepas estudadas pertencem a quatro espécies, sendo elas dos gêneros *Kirchneriella* Schmidle, *Selenastrum* Reinsche e *Messastrum* T.S. Garcia pertencentes à Família Selenastraceae (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) (Tabela 3.1). Todas as cepas são mantidas em condições axênicas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce (CCMA-UFSCar, registro internacional no WDCM: 835). Duas das cepas são provenientes da Coleção de Culturas pessoal da Dra. Christina Bock (CB), Universidade Duisburg-Essen, Alemanha.

As cepas em condições controle, foram cultivadas em sistemas tipo *batch* (fechadas) em frascos Boeco® (250 mL), com 150 mL de meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), com

adição de TRIS (0,5 g L⁻¹), pH 7,0, com intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oriunda de lâmpadas LED (3200 K) em fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura de 23 \pm 1 °C. A ausência de bactérias foi testada em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) com adição de peptona (0,025%), glicose (0,025%) no inóculo, antes do início dos experimentos.

Tabela 3.1. - Lista das microalgas utilizadas, identificadas de acordo com a morfologia clássica e classificadas de acordo com (GARCIA DA SILVA, 2016; KORSHIKOV, 1987; MÖBIUS, 1894; WEST; WEST, 1894).

Espécie	Cepa	Local e ano de isolamento
<i>Kirchineriella</i>		
<i>Kirchineriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 087	Luis Antônio, São Paulo, Brasil, 1987
<i>Kirchineriella lunaris</i>	CCMA-UFSCar 443	Brotas, São Paulo, Brasil, 2012
<i>Kirchineriella obesa</i>	CB2012/37	Montbel, França*
<i>Kirchineriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 345	Pantanal, Mato Grosso do Sul, 2011
<i>Kirchineriella obesa</i>	CCMA-UFSCar 516	São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012
<i>Selenastrum</i>		
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CB2009/36	Neuglobsow*, Alemanha, 1986
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CCMA-UFSCar 630	Buri, São Paulo, Brasil, 2013
<i>Selenastrum bibraianum</i>	CCMA-UFSCar 125	Represa do Jataí, Goiás, Brasil, 1992
<i>Messastrum</i>		
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 005	Itirapina, São Paulo, Brasil, 1978
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 470	Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo, 2012
<i>Messastrum gracile</i>	CCMA-UFSCar 622	Conchas, São Paulo, 2013

Desenho experimental

As respostas morfológicas e bioquímicas das cepas de microalgas foram testadas em quatro tratamentos: um controle e os demais com variações na temperatura, pH e nitrato em relação às condições controle. As variações nos tratamentos em relação ao controle estão discriminadas na Tabela 3.2. As trélicas de cultivos das 11 cepas nas diferentes condições de cultivo totalizaram 132 cultivos.

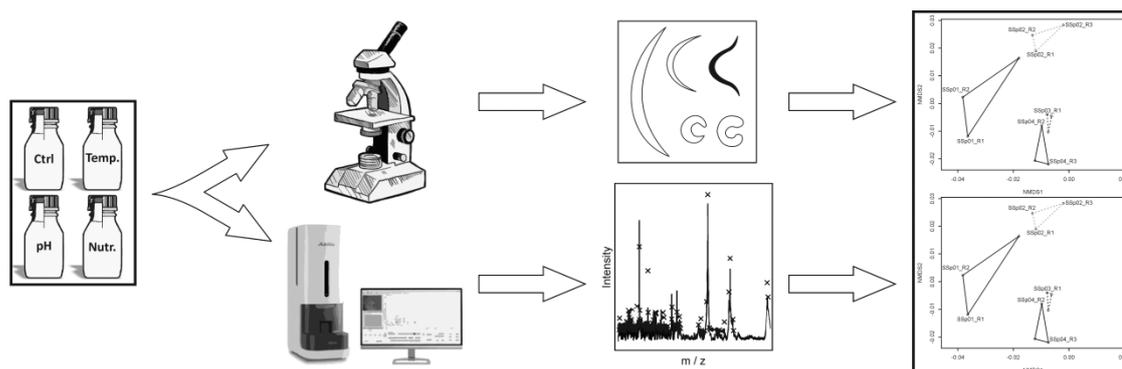
Tabela 3.2. - Condições físico-químicas dos cultivos nos diferentes tratamentos. A concentração de 1000 μM de nitrato corresponde à concentração padrão do meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).

Tratamento	Condições de cultivo variáveis
Controle	23 \pm 1 °C, pH 7,0 e 1000 μM de nitrato
Temperatura	30 \pm 1 °C , pH 7,0 e 1000 μM de nitrato
Nitrato	23 \pm 1 °C, pH 7,0 e 200 μM de nitrato
pH 8,5	23 \pm 1 °C, pH 8,5 e 1000 μM de nitrato

Previamente, foram obtidas curvas de crescimento para cada microalga em cada tratamento por espectrometria de absorvância, de acordo com Griffiths (2011) (espectrofotometro Hach DR 5000, Canadá). Durante os experimentos, o dia de amostragem variou entre os tratamentos. No entanto, em cada tratamento todas as cepas foram amostradas no mesmo dia, enquanto estavam no meio do crescimento exponencial.

De cada réplica, em cada tratamento, foi separada uma alíquota e fixada com formaldeído 4% para as análises morfológicas e o restante separado para as análises bioquímicas (Figura 3.1).

Figura 3.1 Fluxo de trabalho da geração dos dados morfológicos e bioquímicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Análises morfológicas

As medidas do comprimento e largura das células foram realizadas como descrito no capítulo 2. Resumidamente, as imagens foram capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc e o software Axiovision release 4.5 (Zeiss) em microscópio ótico Zeiss Axioplan 2, Jena (Alemanha). Por meio do software foram obtidos os valores de comprimento e largura de 30 indivíduos para a réplica de cada cepa. O comprimento foi medido de ponta a ponta da célula, acompanhando da curvatura celular. Para as análises estatísticas, utilizamos o valor médio das 30 células em cada réplica.

Análises químicas

As culturas utilizadas para análise por espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (MALDI-TOF MS), foram centrifugadas em tubos do tipo Falcon estéril na centrífuga Heraeus Megafuge® 2.0 a 3000 xg por 5 min. A biomassa foi armazenada a -20 °C por 60 dias, liofilizada e pesada. O tipo de matriz e preparo das amostras para leitura no MALDI-TOF MS seguiram a metodologia descrita por Mello *et al.* (2017) para obtenção dos espectros. No entanto, padronizamos a concentração de biomassa,

após testes preliminares com diferentes proporções de matriz e biomassa (utilizamos a proporção de 5 mg de biomassa seca para 0,9 mL de matriz).

Os espectros obtidos foram processados com o pacote MALDIquant (GIBB; STRIMMER, 2017) no ambiente estatístico R (R Core Team 2020, versão 3.6.3). O MALDI-TOF MS produziu espectros para cada réplica das onze cepas, sendo que para cada réplica fizemos três réplicas de leitura. Desta forma, obtivemos um total de 96 espectros. Para as análises, as réplicas de leitura foram agrupadas e examinamos uma faixa de massa/carga (m/z) de 2.000 a 15.000. Posteriormente, dentro da faixa escolhida, selecionamos os 50 picos principais, obtidos pelo comando *ddar* no pacote *sda* (AHDESMAKI et al., 2015) do grupo de cepas, analisado para cada um dos tratamentos.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa estatístico R (R Core Team 2020, versão 3.6.3). Para testar os dados morfológicos e bioquímicos como ferramenta taxonômica, todos os dados dos diferentes tratamentos foram utilizados, exceto quando especificado. Desta forma, para os dados morfológicos utilizamos uma matriz com as variáveis comprimento e largura de cada um dos 4 tratamentos, portanto com 8 variáveis para cada uma das réplicas. A matriz de dados bioquímicos foi composta por 50 principais picos de m/z obtidos MALDI-TOF MS para cada tratamento, portanto, com 200 variáveis por réplica. Para análise dos dados morfológicos, utilizamos uma matriz composta pelas variáveis de comprimento e largura de cada um dos tratamentos. Portanto, 2 variáveis para cada uma das réplicas. A matriz dos dados bioquímicos foi composta pelos 50 picos principais de m/z para tratamento, sendo assim utilizamos 50 variáveis por réplica.

As significâncias estatísticas da separação por gêneros e espécies, tanto para os dados morfológicos como bioquímicos, foram obtidas por análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando o método da distância euclidiana por meio do comando *adonis* no pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2007), versão 3.6.3 e teste de post-hoc para obtenção do p-ajustado utilizando o comando *p.adjust* do pacote *pairwise Adonis* no programa R (ARBIZU, 2017). O nível de significância adotado foi de $p < 0,005$.

O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS, do inglês non-metric multidimensional scaling), foi realizado com a função *metaMDS* no pacote *vegdist* (R Core Team 2020, versão 3.6.3) no R, utilizando o método de distância euclidiana.

3.3 Resultados

Nesse trabalho, as respostas aos diferentes tratamentos foram consideradas como respostas plásticas às variações ambientais, como demonstrados para a morfologia no capítulo 2. No presente capítulo, além da resposta morfológica (características métricas: dados de comprimento e largura), analisamos a resposta bioquímica (características químicas: dados dos espectros de proteínas- MALDI-TOF), que corresponde à medida indireta de resposta fisiológica dos organismos, uma vez que reflete mudanças nos metabólitos produzidos. De fato, a plasticidade fenotípica pode se manifestar na morfologia e na fisiologia. Contudo, uma vez que uma mudança morfológica não ocorre sem mudança fisiológica, para alguns autores, toda plasticidade é fisiológica (BRADSHAW, 1965). Desta forma, consideraremos as respostas morfológicas e bioquímicas às variações ambientais como plasticidades fisiológicas.

De forma geral, os resultados apontam que as respostas bioquímicas às variações ambientais ocorrem de maneira mais congruente entre cepas de um mesmo gênero ou espécie do que a plasticidade morfológica, sendo, portanto, mais eficiente na separação dos grupos taxonômicos. Utilizamos o teste estatístico não paramétrico (PERMANOVA) para verificar se a separação entre os 3 gêneros e, no caso da *Kirchneriella*, entre as duas espécies, poderia explicar significativamente a variação encontrada nos dados morfológicos e bioquímicos. Os resultados serão apresentados em três partes: 1) delimitação de táxons considerando plasticidade morfológica; 2) delimitação de táxons considerando a plasticidade bioquímica e; 3) a delimitação de táxons nos diferentes tratamentos.

(1) Delimitação de táxons considerando plasticidade morfológica

Para comparar a eficiência do conjunto de dados morfológicos na delimitação de táxons, utilizamos o comprimento e largura dos quatros tratamentos (Tabela 3.3). A PERMANOVA de

dados morfológicos (Tabela 3.3) demonstrou que o gênero *Kirchneriella* se diferencia tanto do gênero *Selenastrum* ($p = 0,001$) quanto de *Messastrum* ($p = 0,001$). No entanto, para os gêneros *Messastrum* e *Selenastrum* não houve diferenças significativas ($p = 0,135$). Tais diferenças podem ser observadas graficamente na análise de NMDS (Figura 3.2), em que se observa a formação de três grupos, com maior separação do gênero *Kirchneriella*. Além disso, o NMDS mostra uma pequena inserção das cepas do gênero *Messastrum* (CCMA-UFSCar 470 e CCMA-UFSCar 622) no grupo do gênero *Selenastrum*, indicando que não houve separação completa destes grupos. De fato, além dos dados de significância, a PERMANOVA (Tabela 3.3) também mostra que a diferença entre grupos foi maior entre *Messastrum* e *Kirchneriella* (F.Model = 32,9) e menor entre *Messastrum* e *Selenastrum* (F. Model=1,8). A delimitação específica para o gênero *Kirchneriella* também foi possível utilizando a variação morfológica em todos os tratamentos ($p= 0,003$) (Tabela 3.4).

(2) Delimitação de táxons considerando a plasticidade bioquímica

Os perfis proteicos obtidos por meio do MALDI-TOF MS forneceram os dados bioquímicos, que consideramos como medida de variação fisiológica de cada cepa de microalga nos diferentes tratamentos. A PERMANOVA utilizando dados bioquímicos foi significativa ($p=0,001$) para a separação entre os 3 gêneros (Tabela 3.3). A maior distância foi encontrada entre os gêneros *Messastrum* e *Selenastrum* (F. Model =17.583), e os gêneros mais próximos foram *Kirchneriella* e *Selenastrum* (F. Model =5.653021).

A representação gráfica de NMDS corrobora a PERMANOVA, que mostrou os três gêneros estudados bem separados (Figura 3.3) por meio das análises dos espectros de proteína, mesmo com a plasticidade sendo causada pelas variações ambientais. Ocorreu também a separação entre as duas espécies de *Kirchneriella* ($p=0,002$) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. - Análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando variáveis morfológicas e bioquímicas de todos os tratamentos (controle, pH, temperatura e nitrato) para os três gêneros e as duas espécies estudadas. O valor de significância adotado foi de $p < 0,005$. (*) significativa, (**) muito significativa e (***) extremamente significativa.

Dados Morfológicos				
Gêneros	F.Model	R2	P	p. ajustado
<i>Messastrum vs Kirchneriella</i>	32.96	0.59	0.001	0.0015 *
<i>Messastrum vs Selenastrum</i>	1.81	0.10	0.135	0.135
<i>Kirchneriella vs Selenastrum</i>	22.99	0.51	0.001	0.0015 *
Espécie				
<i>Kirchneriella lunaris vs Kirchneriella obesa</i>	5.36	0.29	0.003	0.003 *
Dados Bioquímicos				
Gêneros				
<i>Messastrum vs Kirchneriella</i>	23.66	0.52	0.001	0.001 **
<i>Messastrum vs Selenastrum</i>	17.58	0.52	0.001	0.001 **
<i>Kirchneriella vs Selenastrum</i>	5.65	0.20	0.001	0.001 **
Espécie				
<i>Kirchneriella lunaris vs Kirchneriella obesa</i>	9.377	0.428	0.002	0.002 **

(3) A delimitação de táxons nos diferentes tratamentos.

Comparando individualmente os tratamentos, notamos que para os dados morfológicos em nenhum dos tratamentos houve separação de todos os gêneros. *Messastrum* e *Selenastrum*, como observado para todos os dados em conjunto, apresentaram maior semelhança em quase todos os tratamentos, exceto no tratamento de Temperatura (F. model = 37,554) (Tabela 3.4).

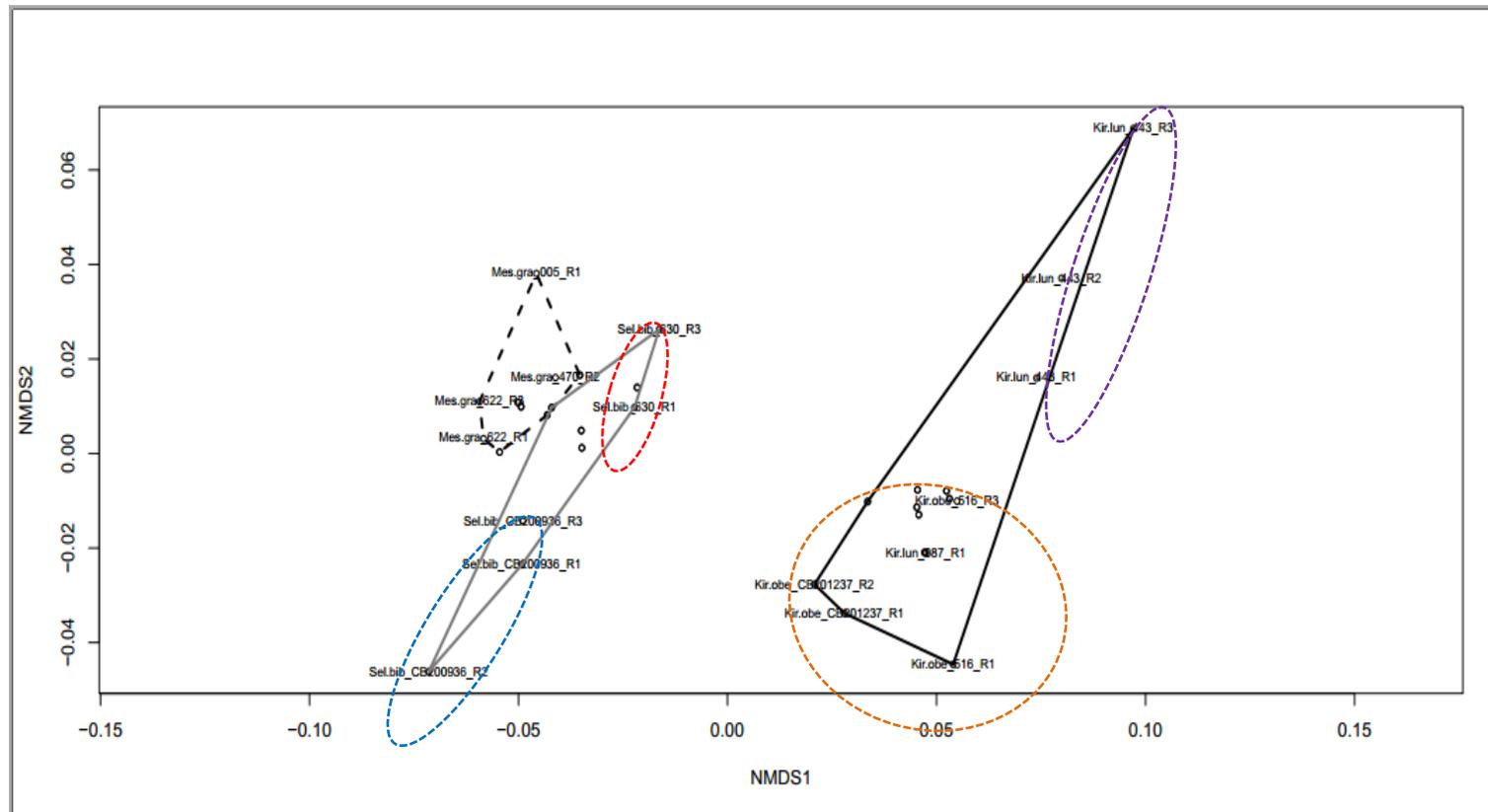
Já o gênero *Kirchneriella* se separou tanto de *Selenastrum* quanto *Messastrum* ($p=0,001$) independentemente do tratamento.

Os dados bioquímicos separaram todos os gêneros nos tratamentos de Nitrato e de Temperaturas ($p=0,001$). No Controle e no tratamento de pH, não houve diferenças significativas entre os gêneros de *Kirchneriella* e *Selenastrum* ($p=0,007$ e $p= 0,011$, respectivamente). O tratamento que separou melhor as espécies foi o de Nitrato, em que o R2 foi o maior entre os tratamentos. As respostas bioquímicas na condição controle, embora tenham separado espécies, não explicam satisfatoriamente a variação entre os gêneros filogeneticamente mais próximos (*Kirchneriella* e *Selenastrum* R2 = 17%), ainda que significativo.

Tabela 3.4. - Análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) comparando variáveis morfológicas e bioquímicas de cada tratamento (controle, pH, temperatura e nitrato) para os três gêneros e as duas espécies estudadas. O valor de significância adotado foi de $p < 0,005$. (*) significativa, (**) muito significativa e (***) extremamente significativa.

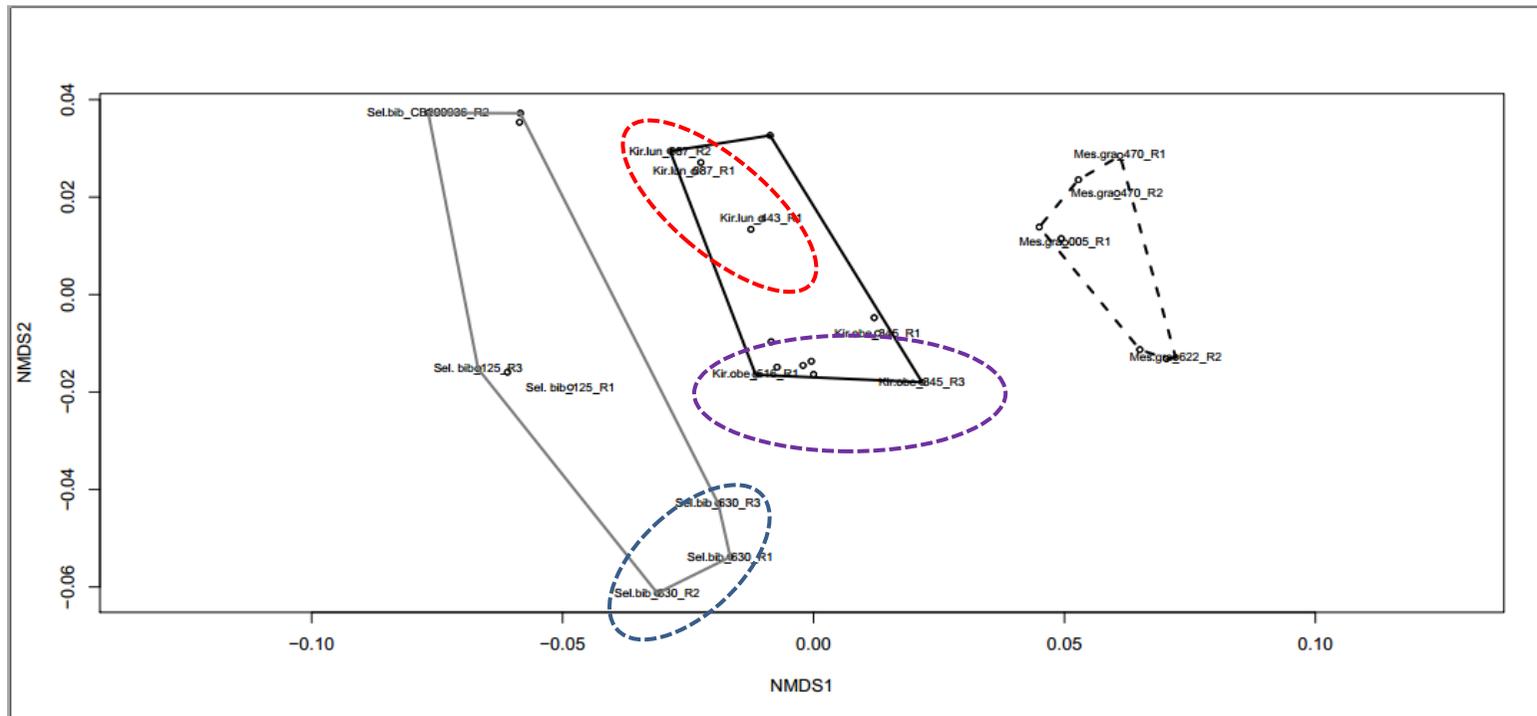
Dados Morfológicos																
Gêneros	Controle				pH				Nutrientes				Temperatura			
	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust
Kirchneriella vs Selenastrum	22.52961	0.505947	0.001	0.0015	20.9073	0.630587	0.001	0.0015	19.58255	0.470932	0.001	0.0015	1.892297	0.585268	0.001	0.0015
Kirchneriella vs Messastrum	34.26157	0.608969	0.001	0.837	26.92579	0.550339	0.001	0.0015	31.0463	0.585268	0.001	0.0015	46.37935	0.678265	0.001	0.0015
Selenastrum vs Messastrum	0.142604	0.008834	0.837	0.0015	6.869321	0.300373	0.009	0.009	1.906051	0.106447	0.206	0.206	37.55391	0.10576	0.174	0.174
Espécie																
K. lunaris vs K. obesa	2.02677	0.134877	0.152	0.1824	9.362019	0.418657	0.003	0.0036	8.069657	0.382999	0.012	0.0144	9.362019	0.00531	0.863	0.863
Dados Bioquímicos																
Gêneros	Controle				pH				Nutrientes				Temperatura			
	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust	F. Model	R2	p.value	p.adjust
Kirchneriella vs Selenastrum	4.751891	0.177628	0.007	0.007	4.302498	0.163578	0.011	0.011	13.32762	0.377258	0.001	0.001	4.939672	0.183361	0.001	0.001
Kirchneriella vs Messastrum	22.94832	0.510549	0.003	0.003	24.92938	0.49811	0.001	0.0015	25.9479	0.541169	0.001	0.001	21.83431	0.49811	0.001	0.001
Selenastrum vs Messastrum	17.34919	0.520228	0.003	0.003	16.87485	0.513306	0.001	0.0015	21.15675	0.569392	0.001	0.001	15.91046	0.498597	0.001	0.001
Espécie																
K. lunaris vs K. obesa	22.33144	0.632056	0.002	0.002	4.962053	0.00531	0.004	0.006	22.33144	0.334656	0.003	0.0036	4.962053	0.44459	0.003	0.003

Figura 3.2. - Gráfico de escala multidimensional não-métrica (NMDS) mostrando diferenças nas respostas morfológicas entre os três gêneros estudados: *Kirchneriella* (linha sólida preta, sendo: linha pontilhada lilás cepa CCMA-UFSCar 443; linha pontilhada laranja cepa CCMA-UFSCar 516 e CCMA-UFSCar 87), *Selenastrum* (linha sólida cinza, sendo: linha pontilhada azul a cepa CB2009/36; linha pontilhada vermelha cepa CCMA-UFSCar 630) e *Messastrum* (linha pontilhada preta).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3.3. - Gráfico de escala multidimensional não-métrica (NMDS) mostrando diferenças nas respostas fisiológicas bioquímicas entre os três gêneros estudados: *Kirchneriella* (linha sólida preta, sendo: linha pontilhada vermelha CCMA-UFSCar 443; linha pontilhada lilás cepa CCMA-UFSCar 345), *Selenastrum* (linha sólida cinza, sendo linha pontilhada azul CCMA-UFSCar 630) e *Messastrum* (linha pontilhada preta).



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Discussão

As repostas fisiológicas morfológicas e bioquímicas de cepas de microalgas submetidas a diferentes tratamentos foram utilizadas como ferramenta para separação taxonômica entre os gêneros *Kirchneriella*, *Selenastrum* e *Messastrum* e entre espécies de *Kirchneriella*.

Em princípio, nenhum critério morfológico isolado é significativo para a taxonomia de alguns gêneros da família Selenastraceae (KRIENITZ et al., 2011), sendo necessário um conjunto de dados morfológicos que considere as alterações ambientais, uma vez que esses organismos apresentam plasticidade fenotípica (FAWLEY et al., 2005; TREVIÑO, 2008). Com base em nossos resultados, é possível observar que mesmo o conjunto de repostas morfológicas em diferentes condições não são úteis como ferramenta taxonômica para garantir a separação de gêneros morfológicamente semelhantes como *Messastrum* e *Selenastrum*. Embora aparentemente o aumento de pH poderia auxiliar na diferenciação entre os gêneros, sabe-se que eles apresentam características morfológicas bastante similares como formato celular, arranjo do autósporo, estrutura do pirenóide, tipo de colônia (FAWLEY et al., 2005; GARCIA DA SILVA et al., 2017; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 1969).

Embora as microalgas dos gêneros *Selenastrum* e *Messastrum*, sob diferentes condições ambientais, tenham respondido de forma similar às variações ambientais em relação ao tamanho celular, no tratamento de pH houve diferenciação morfológica, mesmo que não significativa, entre esses gêneros, como pode ser observado pela PERMANOVA. Assim, embora a plasticidade morfológica possa ser uma causa de confusão entre táxons (como discutido no Capítulo 2), em condições controladas e específicas, o estudo de plasticidade pode auxiliar na delimitação de espécies morfológicamente semelhantes.

Utilizando as respostas bioquímicas, observamos a separação dos três gêneros estudados, bem como uma distância maior entre os gêneros *Selenastrum* e *Messastrum*, e maior similaridade entre *Selenastrum* e *Kirchneriella* tanto pela PERMANOVA como pelo NMDS (Figura 2). Nossos resultados corroboram o trabalho desenvolvido por Garcia et al. (2017), que utilizaram dados moleculares dos mesmos gêneros (algumas das mesmas cepas) e observaram que os gêneros *Selenastrum* e *Messastrum*, antes classificados morfológicamente como um único gênero (a espécie *S. gracile* foi reclassificada como gênero *Messastrum*), formavam clados filogeneticamente distantes. No mesmo trabalho, é possível verificar que a espécie *Kirchneriella obesa* é mais próxima filogeneticamente da *Selenastrum bibraianum* do que da *Messastrum gracile*.

Krientiz et al. (2001, 2011) já havia alertado que, apesar do monofiletismo da família, esses gêneros ainda precisavam de uma revisão, pois suas características morfológicas geralmente não concordam com os seus dados moleculares. Utilizando dados de 18S rDNA, Krientiz et al. (2001) já haviam sugerido maior similaridade entre as espécies *K. aperta* e *Ankistrodesmus bibraianus* (*S. bibraianum*) do que entre *A. bibraianus* e *A. gracilis* (*Messastrum gracile*), sendo confirmado posteriormente por Garcia et al. 2017. Usando separadamente os dados morfológicos em cada um dos tratamentos, observamos que nenhum dos tratamentos foi capaz de separar todos os gêneros, nenhum se assemelhou aos dados moleculares desenvolvidos por Garcia et al., (2017).

Em nosso estudo, foi possível diferenciar as espécies de *Kirchneriella obesa* e *Kirchneriella lunaris* quando utilizamos o conjunto de dados de todos os tratamentos, tanto para os dados morfológicos quanto bioquímicos. Por meio de nossas análises fisiológicas, observamos que essas espécies são fisiologicamente diferentes. No entanto, não foi possível separá-las em todos os tratamentos quando utilizamos individualmente

os dados morfológicos por tratamento. Os dados morfológicos possibilitaram apenas a separação das espécies no tratamento de pH, indicando que a resposta fenotípica nesse tratamento foi diferente para cada espécie, permitindo sua diferenciação. Como já notado por Bridge et al. (1989), as respostas plásticas bioquímicas não correspondem às morfológicas. Em nosso estudo, foi possível separar através dos dados bioquímicos as espécies em todos os tratamentos.

Segundo Domenighini e Giordano (2009), quando indivíduos das mesmas espécies são submetidos a composições diferentes de nutrientes, eles apresentam espectros bioquímicos diferentes para cada composição testada. Isso ocorre até mesmo em espécies muito próximas que possuem características ecológicas, funcionais e morfológicas similares. As estratégias adotadas são diferentes em resposta às mudanças ambientais. Esse comportamento indica a particularidade das respostas plásticas para cada espécie. Em nossos resultados, observamos que houve particularidade nas respostas plásticas bioquímicas em todos os tratamentos para *K. obesa* e *K. lunaris*, tal que ambas apresentaram respostas plásticas bioquímicas diferentes, o que permitiu a separação bioquímica entre elas.

A partir de nossos resultados bioquímicos e, comparado com outros estudos que utilizaram apenas dados bioquímicos como ferramenta taxonômica (DE MORAES; VIEIRA, 2014; TAIPALE et al., 2013), nota-se a importância em considerar as variações ambientais para uma abordagem taxonômica. Por exemplo, se apenas os dados das respostas bioquímicas do tratamento de pH ou do Controle fossem utilizados, não teríamos a separação de todos os gêneros, como ocorreu com *Kirchneriella* e *Selenastrum*. Embora tenham sido significativas, a porcentagem de explicação da variação entre os gêneros da PERMANOVA foi baixa e houve sobreposição no NMDS. Mello et al. (2017) também utilizaram a técnica MALDI TOF para caracterizar e separar

espécies e gêneros da família Selenastraceae. Embora o MALDI TOF tenha sido considerado uma ferramenta boa e ágil, os autores não obtiveram a separação de espécies que possuíam mais de um gênero. Além disso, relataram problemas com algumas espécies, as quais se agruparam com outros gêneros. Por fim, os autores não consideraram variações ambientais e suas possíveis respostas plásticas, o que pode limitar as análises para a taxonomia.

Segundo Boenigk et al. (2012), uma delimitação de espécie consistente é aquela em que tanto o genótipo quanto fenótipo são diferentes de todas as outras espécies. A definição de espécie fenotípica é mais abrangente que a morfológica; é uma medida tão ou mais apropriada para medir diversidade, uma vez que dentro da mesma espécie podem ocorrer variações importantes, já que a delimitação por espécie não explica toda a variação encontrada nos dados. Contudo, as espécies se separam independente das variações nas respostas fisiológicas, mantendo a delimitação dos táxons. Os nossos dados bioquímicos concordam com os dados filogenéticos.

Considerando os critérios fisiológicos, é possível delimitar as espécies fisiológicas, sendo preciso buscar particularidades no funcionamento de cada alga para considerar que, mesmo em diferentes regiões com diferentes climas e ambientes, os organismos de mesma espécie comportem-se de maneira semelhante. A combinação das respostas fisiológicas bioquímicas, frente aos diferentes tratamentos, demonstrou ser uma estratégia útil para a taxonomia de gêneros e espécies morfológicamente semelhantes da família *Selenastraceae*, inclusive refletindo a filogenia. Dessa forma, nesse trabalho demonstramos que é possível realizar uma abordagem taxonômica que utilize os critérios bioquímicos para delimitar as espécies na família *Selenastraceae* e contribuir para uma taxonomia mais robusta, além das diversidades morfológicas e genéticas.

3.5 Conclusões

1) As respostas morfológicas frente a variações ambientais (abióticas) foram menos eficientes que as respostas bioquímicas para separar gêneros e espécies na família Selenastraceae. 2) As respostas bioquímicas foram mais eficientes na separação de táxons e ainda concordaram com os dados já disponíveis na literatura para a filogenia das espécies estudadas. 3) O tratamento com redução de nitrato isoladamente foi o que melhor separou gêneros; separou também as 2 espécies de *Kirchneriella*, mas as variações bioquímicas no controle diferenciaram melhor essas espécies. 4) Desta forma, os espectros do MALDI-TOF MS são uma ferramenta útil e rápida para a caracterização de espécies de microalga, especialmente se consideradas as plasticidades bioquímicas, que incorporam uma diversidade funcional (fisiológica) na delimitação de táxons.

3.6 Referências

AHDESMAKI, M. et al. **sda: Shrinkage Discriminant Analysis and CAT Score Variable Selection**, 2015. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=sda>>

ARBIZU, M. P. **pairwiseAdonis: pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.0. 1**, 2017.

BENDIF, E. M. et al. Integrative taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): a reassessment. **Protist**, v. 162, n. 5, p. 738–761, 2011.

BOENIGK, J. et al. Concepts in protistology: species definitions and boundaries. **European Journal of Protistology**, v. 48, n. 2, p. 96–102, 2012.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: CASPARI, E. W.; THODAY, J. M. (Eds.). **Advances in genetics**. [s.l.] Academic Press, 1965. p. 115–155.

BRIDGE, P. D. et al. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 11, p. 2979–2991, 1989.

CARON, D. A.; HU, S. K. Are we overestimating protistan diversity in nature? **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 197–205, 2019.

CARSTENS, B. C. et al. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.

CRACRAFT, J. Phylogenetic models and classification. **Systematic Zoology**, v. 23, n. 1, p. 71–90, mar. 1974.

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.

DAS, S. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80–100, 2014.

DE MORAES, G. P.; VIEIRA, A. A. H. Fourier transform infrared with attenuated total reflectance applied to the discrimination of freshwater planktonic coccoid green microalgae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.

DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1905–1916, 2005.

DOMENIGHINI, A.; GIORDANO, M. Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the assessment of water quality. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 2, p. 522–531, 2009.

FAWLEY, M. W. et al. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142–154, fev. 2005.

FUJITA, M. K. et al. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 9, p. 480–488, 2012.

GARCIA DA SILVA, T. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 1 abr. 2017.

GIBB, S.; STRIMMER, K. Mass spectrometry analysis using MALDIquant. In: DATTA, S.; MERTENS, B. J. A. (Eds.). . **Statistical analysis of proteomics, metabolomics, and lipidomics data using mass spectrometry**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 101–124.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with Chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

HALL, J. C. Systematics of Capparaceae and Cleomaceae : an evaluation of the generic delimitations of Capparis and Cleome using plastid DNA sequence data 1. v. 696, p. 682–696, 2008.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe**. 1. ed. Stuttgart, Germany: Birkhäuser Verlag Basel, 1962.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. **The systematics and ontogenesis of the genera Ankistrodesmus Corda and Monoraphidium gen. nov.** [s.l.] Academia, 1969.

KORSHIKOV, O. A. **The freshwater algae of the Ukrainian SSR**. Koenigstein, W. Germany: Koeltz Scientific Books, 1987.

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**, v. 47, n. 4, p. 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.

KRIENITZ, L.; HUSS, V. A. R.; BOCK, C. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 67–69, 2015.

LANDE, R. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1435–1446, 2009.

LELIAERT, F. et al. DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 2, p. 179–196, 2014.

LEWIS, D. H.; SMITH, D. C. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants: I. distribution, physiology and metabolism. **New Phytologist**, v. 66, n. 2, p. 143–184, 1967.

LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1535–1556, 2004.

LINDELL, D. The genus *prochlorococcus*, phylum cyanobacteria. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 829–845.

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. e0151137, 30 mar. 2016.

MELLO, R. V. et al. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, n. September, p. 151–160, 2017.

MÖBIUS, M. Australische Süßwasseralgen. In: [s.l.] Moritz Diesterweg, 1894. p. 310–350.

MORI, C. C. et al. Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). **Phytochemistry**, v. 151, p. 9–16, 2018.

OKSANEN, J. et al. The vegan package. **Community ecology package**, v. 10, p. 631–637, 2007.

PALMUCCI, M.; GIORDANO, M. Is cell composition related to the phylogenesis of microalgae? An investigation using hierarchical cluster analysis of fourier transform infrared spectra of whole cells. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 220–224, 2012.

PRÖSCHOLD, T.; LELIAERT, F. Systematics of the green algae. In: BRODIE, J.; LEWIS, J. (Eds.). . **Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 123–153.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 6, p. 889–900, 2003.

RINDI, F.; RYŠÁNEK, D.; ŠKALOUD, P. Problems of epitypification in morphologically simple green microalgae: a case study of two widespread species of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 78–88, 2017.

SILVA, T. G. DA. **Biodiversidade de Selenastraceae (Sphaeropleales,**

Chlorophyceae): características morfológicas e sequenciamento dos marcadores moleculares 18S rDNA, rbcL e ITS como base taxonômica tradicional. [s.l.]

Universidade Federal de São Carlos, 2016.

SIMPSON, G. G. **Principles of animal taxonomy.** New York: Columbia University Press, 1990.

TAIPALE, S. et al. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: Analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 71, n. 2, p. 165–178, 2013.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria (version 3.6.3)**Vienna, AustriaR Core Team, , 2020.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). . **Handbook of microalgal culture.** Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 3–19.

TREVIÑO, I. F. **Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España.** [s.l.] Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, 2008.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology.** [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

WANG, W. L.; LIU, S. L.; CHEN, P. C. Studies on the morphotype alternation in *Monoraphidium* sp. (Selenastraceae, Chlorophyta). **Cryptogamie, Algologie**, v. 26, n. 3, p. 243–257, 2005.

WEST, W.; WEST, G. S. On some freshwater algae from the West Indies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 30, n. 208, p. 264–280, 1894.

WOOD, A. M.; LEATHAM, T. the Species Concept in Phytoplankton Ecology. **Journal of Phycology**, v. 28, n. 6, p. 723–729, 1992.

4 Considerações finais

A partir dos dados fisiológicos obtidos no presente trabalho, com as diferentes cepas da família Selenastraceae pertencentes aos gêneros *Selenastrum* Reinsch e *Messastrum* TS. Garcia e *Kirchneriella* Schmidl, observamos que os fatores ambientais atuam diretamente na morfologia e na bioquímica dessas espécies. Por terem uma morfologia muito parecida, esses gêneros podem ser identificados erroneamente, uma vez que os fatores ambientais podem aproximar ou distanciar as semelhanças entre eles. Não é indicado utilizar dados métricos, como comprimento e largura (máximos e mínimos) como ferramenta taxonômica entre as duas espécies ou gêneros estudados.

Quando testamos as variações de pH, temperatura e nutriente, notamos que todas as cepas apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao tratamento de controle, o que significa que a plasticidade fenotípica atua frequentemente nessas cepas. É de extrema importância inserir a plasticidade fenotípica das espécies nas identificações taxonômicas, principalmente nas morfológicas. Ao utilizarmos os dados fisiológicos considerando as respostas de todos os tratamentos em nosso estudo, notamos que para a identificação morfológica a plasticidade fenotípica, neste caso, não auxiliou na separação taxonômica dos gêneros estudados, não sendo uma boa ferramenta para identificação das espécies. Por outro lado, os dados fisiológicos (bioquímicos) se mostraram úteis concordando com os dados moleculares da literatura. Nossos resultados sugerem que é possível delimitar as espécies por meio das respostas fisiológicas (bioquímicas).