

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Recursos Naturais

Greyce Kelly Espolau da Silva Leite

**Diversidade e distribuição de ciliados da Família Strombidiidae
(Ciliophora) no oceano global**

São Carlos
2022

Greyce Kelly Espolau da Silva Leite

**Diversidade e distribuição de ciliados da Família Strombidiidae
(Ciliophora) no oceano global**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA em ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Sarmento

Co-orientadora: Dra. Maria Paula Huber

São Carlos
2022



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 Dissertação de Mestrado da candidata Greyce Kelly Espolau da Silva Leite, realizada em 09/11/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento (UFSCar)

Prof. Dr. Gilmar Perbiche Neves (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias (UFJF)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Dedico à minha família: Abraão, Gilson e Elaine

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter conduzido minha vida até aqui e ter me dado forças para conseguir superar todos os desafios em minha trajetória.

Aos meus pais, Gilson e Elaine, pela vida, pelo amor, pela força e pela minha criação, que foram de longe os pilares mais importantes para eu ser quem sou hoje.

Ao meu companheiro de vida, Abraão, por todo o amor, incentivo, e longos diálogos ecológicos que sempre me despertaram novas visões e idéias para serem refletidas.

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmiento pela oportunidade, orientação, ajuda e diálogo que foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal. Agradeço muito pela paciência, e por todos os conselhos que sempre foram enriquecedores.

A Dra. Paula Huber, minha co-orientadora, que sempre esteve ao meu lado me orientando em tudo que eu precisei, e me direcionou para os melhores caminhos nesta jornada.

Ao Colômbian de Vargas, Samuel Chaffron, Nicolas Henry e toda equipe do veleiro TARA pela coleta das amostras e pela disponibilidade dos dados que foram cruciais para este trabalho existir. A vocês, minha admiração e meu muito obrigada!

Ao AtlantECO (Avaliação, Previsão e Sustentabilidade dos Ecossistemas Atlânticos), por inserir este trabalho no Projeto H2020 (União Europeia) award number 862923.

A todos os companheiros do LMPB (Laboratório de Processos Microbianos e Biodiversidade- UFSCar) Clara, Pedro, Erick, Ícaro, Israel, Eloisa e Daniel, por todas as idéias e discussões, amizades, viagens, conversas, risadas, cafés e bolos. Vocês fizeram minha caminhada ser mais divertida, alegre e leve.

Aos membros da banca de qualificação e da banca de defesa, pela disponibilidade, interesse e por toda a contribuição. Cada comentário, correção e sugestão, foram e serão considerados com muito carinho.

Ao PPGERN, por me proporcionar uma das experiências mais desafiadoras e desejadas na minha vida.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A toda a minha família e amigos que acreditaram em mim e me viram apta a desenvolver este trabalho, mesmo em momentos desafiadores que eu mesma me questionava. Em especial a minha amiga e irmã de alma, Karen, que com sua amizade e conselhos fizeram desta jornada, mais leve.

*“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso,
nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que
vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.”*

Ralph Waldo Emerson

“A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana” Carl Sagan

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo” Albert Einstein

Resumo

Os ciliados dominam o microzooplâncton e desempenham um papel essencial nas teias tróficas marinhas. Ao ingerir flagelados, bactérias e outros organismos do pico e nano-plâncton, e ao serem depois consumidos pelo zooplâncton, os ciliados são o principal elo que liga a alça microbiana à cadeia trófica clássica. No entanto, a diversidade e a distribuição de ciliados no oceano global ainda é pouco conhecida devido à dificuldade de observar e classificar estes organismos em microscopia ótica. Quando fixados, a maioria dos ciliados são perdidos ou mudam a sua morfologia, dificultando a sua identificação. Assim, o uso de ferramentas moleculares representa uma oportunidade para o estudo da comunidade de ciliados no oceano. Dentro dos ciliados, a família Strombidiidae é uma das mais abundantes, porém existem ainda poucos estudos sistematizados na escala global sobre a distribuição, abundância e filogenia deste grupo. Este estudo teve como objetivos: 1) avaliar a diversidade filogenética de Strombidiidae, 2) entender a sua distribuição no oceano global e 3) determinar o nicho ecológico dos clados mais abundantes. Utilizamos um conjunto de dados de metabarcoding (região V4 18S rRNA) de 1008 amostras das expedições de circum-navegação TARA Oceans e TARA Polar. Construímos uma árvore de referência de Strombidiidae com sequências completas do gene 18S rRNA extraídos da literatura e inserimos as sequências de metabarcoding para a designação filogenética. Depois relacionamos os dados da distribuição desses clados com dados ambientais para a definição de nichos ecológicos. A filogenia de Strombidiidae revelou 20 clados distintos, quase todos amplamente distribuídos na maioria das regiões oceânicas. O clado mais abundante (*Strombidium_clade2*) é cosmopolita. Além disso, obtivemos 12 clados ambientais cujas sequências (região V4 18S rRNA) não são idênticas às descritas na árvore de referência, e portanto representam novos clados. A análise de nicho mostrou que os diferentes clados da família Strombidiidae apresentaram diferentes padrões de distribuição no oceano global, determinados pela temperatura, salinidade e oxigênio. O oceano Ártico apresentou maior abundância entre os clados de Strombidiidae, com nichos bem característicos para estas regiões oceanográficas. Este trabalho representa o primeiro estudo da diversidade taxonômica e filogenética da família Strombidiidae no oceano global, contribuindo assim, para o conhecimento da ecologia dos ciliados marinhos.

Palavras-chave: Ecologia Microbiana; Distribuição Oceânica; Ciliophora; Ordem Oligotrichida; Família Strombidiidae.

Abstract

Ciliates dominate microzooplankton and play an essential role in marine food webs. By ingesting flagellates, bacteria and other organisms from pico and nano-plankton, and then being consumed by zooplankton, ciliates are the main pathway of carbon flow that links the microbial loop to the classical trophic chain. However, the diversity and distribution of ciliates in the global ocean is still poorly understood due to the difficulty of observing and classifying these organisms under light microscopy. When fixed, most ciliates are lost or change their morphology, making their identification difficult. Thus, the use of molecular tools represents an opportunity to study the ciliate community in the ocean. Within ciliates, the Strombidiidae family is amongst the most abundant, but there are still few systematic studies at the global scale on the distribution, abundance and phylogeny of this important group in the ocean. This study aims to: 1) evaluate the phylogenetic diversity of Strombidiidae, 2) understand its distribution in the global ocean, 3) determine the ecological niche of the most abundant clades. We used a metabarcoding dataset (region V4 18S rRNA) of 1008 samples from the TARA Oceans and TARA Polar circum-navigation expeditions. We constructed a Strombidiidae reference tree with complete 18S rRNA gene sequences from the literature and inserted the metabarcoding sequences for phylogenetic assignment. Then we related the distribution data of these clades with environmental data to define ecological niches. The phylogeny of Strombidiidae revealed 20 distinct clades, almost all of them widely distributed in most oceanic regions. The most abundant clade (*Strombidium*_clade2) is cosmopolitan. Furthermore, we obtained 12 environmental clades whose sequences (V4 18S rRNA region) are not identical to those described in the reference tree, and thus, may represent new clades. Niche analysis showed that the different clades of the Strombidiidae family had different distribution patterns in the global ocean, determined by temperature, salinity and oxygen. The Arctic Ocean had greater abundance among the Strombidiidae clades and very characteristic niches were observed for these oceanographic regions. This work represents the first study of the taxonomic and phylogenetic diversity of the Strombidiidae family in the global ocean, thus contributing to the knowledge of the ecology of marine ciliates.

Key-words: Microbial Ecology; Oceanic Distribution; Ciliophora; Order Oligotrichida; Family Strombidiidae.

Lista de Figuras

- Fig. 1.** Principais estruturas taxonômicas generalizadas da família Strombidiidae. **AM-** Grandes membranelas anteriores bucais; **VM-** Pequenas membranelas ventrais bucais; **EM-** membranelas endorais; **GK-** Cinta cinécia; **VK-** Cinta cinécia ventral e **DC-** Superfície celular distendida. Agatha, S. (2004a).....**20**
- Fig. 2.** *Novistrombidium apsheronicum* **(a, b)** Visões ventrais de células vivas. **(c,d)** visão ventral e ciliaturas **(c)** dorsal . Barra de escala:30 µm (Hu *et al.*, 2019).....**22**
- Fig. 3.** *Sinistrostrombidium cupiformum* **(a, b)** Visões ventrais de células vivas **(c,d)** visões ventrais e ciliaturas **(c)** visão dorsal. Barra de escala: 20 µm (Hu *et al.*, 2019).....**23**
- Fig. 4.** *Apostrombidium sp.* **(a)** *Apostrombidium orientale* **(b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(a, b)** Visões ventral e dorsal, a seta marca os cílios dorsais extremamente longos, pontas de seta duplas marcam os cílios somáticos normais **(c,d)**. Scale bar: 30 µm **(a)**, Barra de escala: 15 µm **(b)** (Hu *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019).....**24**
- Fig. 5.** *Parallelostrombidium conicum* **(a, b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(c,d)** Visões ventrais e visões das ciliaturas **(c)** visão dorsal. Barra de escala: 20 µm (Hu *et al.*, 2019).....**25**
- Fig. 6.** *Varistrombidium kielum* **(a, b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(c,d)** Visões ventrais e ciliaturas **(c)** e dorsal. Barra de escala: 30 µm (Hu *et al.*, 2019).....**26**
- Fig. 7.** *Spirostrombidium apourceolare* **(a, b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(c,d)** Visões ventrais e ciliaturas **(c)** e dorsal. Barra de escala: 30 µm (Hu *et al.*, 2019).....**27**
- Fig. 8.** *Omegastrombidium elegans* **(a, b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(c,d)** Visões ventrais e ciliaturas **(c)** e visão dorsal. Barra de escala: 20 µm (Hu *et al.*, 2019).....**27**
- Fig. 9.** *Antestrombidium agathae* **(a, b)** Visões ventrais de indivíduos vivos **(c,d)** Visões ventrais e ciliaturas **(c)** e visão dorsal. Barra de escala: 30 µm (Hu *et al.*, 2019).....**28**

- Fig. 10.** *Williophrya maedai* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 25 µm (Hu *et al.*, 2019).....**29**
- Fig. 11.** *Strombidium capitatum* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 30 µm (Hu *et al.*, 2019).....**30**
- Fig. 12.** Estações de coleta do Tara Oceans (2009-2013) e Tara Polar (2013) onde seqüências da ordem Oligotrichida foram encontradas. AO: Oceânico Ártico, SO: Oceano Austral, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, SAO: Oceano Atlântico Sul, SPO: Oceano Pacífico Sul, NPO: Oceano Pacífico Norte e RS: Mar Vermelho.....**34**
- Fig. 13.** Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **A.** Tamanho:0.22-1.6 µm, **B.** Tamanho:0.22-3 µm. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**35**
- Fig. 13 (Cont.)** - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **C.** Tamanho:0.8-3 µm, **D.** Tamanho:0.8-5 µm AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**36**
- Fig. 13 (Cont.)** - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **E.** Tamanho:0.8-20 µm, **F.** Tamanho: 3-20 µm. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**37**
- Fig. 13 - (cont.)** - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. **G.** Fração:5-20 µm, **H.** Tamanho:20-180 µm. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**38**

- Fig. 13 - (cont.)** Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global **I**. Tamanho:180-2000 μm , **J**. Tamanho : >0.8 μm . AO: Oceânico Ártico , IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**39**
- Fig. 13 - (cont.)** Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. **K**. Tamanho: >3 μm . AO: Oceânico Ártico , IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**40**
- Fig. 14.** Diagrama de Venn representando as ASV exclusivas e comuns nas profundidades oceânicas: SRF: Superfície, DCM: Máximo de Clorofila e MESO: Mesopelágico. Fonte: <http://www.interactivenn.net/>.....**43**
- Fig. 15.** Representatividade da ordem Oligotrichida em relação aos demais Ciliados por faixas de tamanho e por amostras. n= número de amostras.....**44**
- Fig. 16.** Abundância relativa da ordem Oligotrichida em relação ao grupo Ciliophora em todas as frações de tamanhos operacionais. n=número de amostras. PICO: picoplâncton; NANO: nanoplâncton; MICRO: micropoplâncton; ALL: todas as frações..**45**
- Fig. 17.** Riqueza (Chao.1) da ordem Oligotrichida em todas as frações de tamanhos operacionais. PICO: picoplâncton; NANO: nanoplâncton; MICRO: micropoplâncton; ALL: todas as frações.....**45**
- Fig. 18.** Diversidade (Índice de Shannon) da ordem Oligotrichida em todas as frações de tamanhos operacionais. PICO: pico-plâncton; NANO: nano-plâncton; MICRO: micro-plâncton; ALL: todas as frações.....**46**
- Fig. 19.** Árvore de referência (RT) de Máxima verossimilhança (ML) da Subclasse Oligotrichia. A árvore foi construída utilizando 128 sequências do gene 18S rRNA coletadas na base de dados GenBank. Os valores de suporte de bootstrap de ML (>60%) estão representados nos nodos. Os clados formados pelas espécies e gêneros da família Strombidiidae estão representados em negrito.....**48**
- Fig. 20.** Designação filogenética das sequências ambientais que foram designadas taxonomicamente dentro do grupo de Oligotrichida. Os clados representados em

negrito são da família Strombidiidae. A cor dos quadros indicam as abundâncias totais dos clados (em números de reads). As barras de cores indicam a abundância relativa de cada clado por regiões oceânicas (AO: Oceânico Ártico , SO: Oceano Austral, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, SAO: Oceano Atlântico Sul, SPO: Oceano Pacífico Sul, NPO: Oceano Pacífico Norte e RS: Mar Vermelho).....**49**

Fig. 21. Números de ASV (painel esquerdo) e abundância (painel direito) das famílias da ordem Oligotrichida **(a)** e dos gêneros da família Strombidiidae **(b)**.....**50**

Fig. 22. Abundância dos clados em termos de número de reads em diferentes regiões oceânicas. As cores na barra horizontal indicam os clados das 4 famílias da ordem Oligotrichida assim como os clados ambientais. AO: Oceânico Ártico , IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**51**

Fig. 23. Abundância relativa dos clados em relação ao número de reads em diferentes profundidades (SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila, e MESO: Mesopelágico). As cores na barra horizontal indicam os clados das 4 famílias de Oligotrichida assim como os clados ambientais.....**52**

Fig. 24. Distribuição dos clados (em termos de abundância total de reads por amostras) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian), linhas com pontilhado representa a curva pela equação Exponencial Decay(Double) e linha com traços largos representa a curva pela equação Peak (Weibull).....**60**

Fig. 24. (cont.) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian).....**61**

Fig. 24. (cont.) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian), linhas com pontos e traços representam curva pela equação Rational.....**62**

Fig. 24. (cont.) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian).....**63**

Fig. 25. Árvore filogenética da família Strombidiidae mostrando os 20 clados definidos neste trabalho. Para cada clado, foram indicados os valores ótimos para temperatura, salinidade, oxigênio assim como as profundidade e oceano onde se registraram as maiores abundâncias. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo, e MESO: Mesopelágico. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**68**

Lista de Tabelas

Tab. 1. Total de amostras da base de dados onde sequências do filo Ciliophora e da ordem Oligotrichida foram encontradas, dividida por frações de tamanhos operacionais e profundidade. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo ; MESO: Mesopelágico.....**40**

Tab. 2. Dados de ASV da ordem Oligotrichida exclusivas e comuns para cada profundidade, frações de tamanho e regiões oceanográficas. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo; MESO: Mesopelágico; AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**42**

Tab. 3. Total de amostras da base de dados onde sequências do filo Ciliophora e da ordem Oligotrichida foram encontradas, dividida por frações de tamanhos operacionais e Regiões oceânicas. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.....**43**

Lista de Siglas e Abreviações

Amostras

PICO- Pico-plâncton

NANO- Nano-plâncton

MICRO- Micro-plâncton

Profundidades Oceânicas

SRF- Superfície

DCM- Máximo de clorofila profundo

MESO- Mesopelágico

Regiões Oceânicas

AO- Oceano Ártico

SO- Oceano Austral

IO- Oceano Índico

MS- Mediterrâneo

RS- Mar Vermelho

SAO- Oceano Atlântico Sul

NAO- Oceano Atlântico Norte

SPO- Oceano Pacífico Sul

NPO- Oceano Pacífico Norte

Metodologia

RT- Árvore de referência

OTU- Unidade taxonômica operacional

ASV- Sequências biológicas únicas

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

rRNA- Ácido Ribonucleico Ribossomal

Neste trabalho, optou-se por utilizar os seguintes termos em inglês por serem frequentemente utilizados na literatura e comumente utilizados pela comunidade científica:

Primers: Sequência de nucleotídeos usada em reações em cadeia da polimerase (PCR), como ponto de partida para a replicação do DNA.

Reads: Sequências curtas de nucleotídeos de um fragmento genômico que são obtidas como produto de sequenciamento massivo.

Sumário

1. Introdução	19
1.1- <i>Introdução geral</i>	19
1.2- <i>Descrição dos principais gêneros da família Strombidiidae</i>	21
2. Objetivos	30
3. Materiais e métodos	30
3.1 <i>Amostragem, extração e sequenciamento de DNA</i>	30
3.2 <i>Processamento das sequências</i>	31
3.3 <i>Análise Filogenética</i>	32
3.4 <i>Dados ambientais e ótimo ambiental</i>	33
3.5 <i>Análises estatísticas</i>	33
4. Resultados	34
4.1 <i>Análise exploratória da base de dados</i>	34
4.2 <i>Estudo filogenético da família Strombidiidae e análise de nicho</i>	46
5. Discussão	63
6. Conclusão	69
Referências	70

1. Introdução

1.1- Introdução geral

Os protistas são fundamentais para o ecossistema marinho (Keeling e Campo, 2017). Dentre os protistas, os ciliados representam um dos grupos mais abundantes, mais diversificados e melhor distribuídos no oceano global (Canals *et al.*, 2020; Pereira e Soares-Gomes, 2021).

Os ciliados, são organismos pequenos cujo tamanho celular varia de 10 μm a poucos mm (Lynn, 2008; Canals *et al.*, 2020). Se caracterizam pela presença de organelas chamadas cílios que são utilizados para diversas funções, como nadar, arrastar-se, aderir-se, alimentar-se e receber sensações do meio em que ocorrem (Kirchman, 2012). São essenciais para as teias tróficas, podendo ser heterotróficos, mixotróficos (podendo realizar fotossíntese e predação de outros microrganismos), ou até mesmo autotróficos (Kirchman, 2012). São importantes contribuintes ativos da alça microbiana, alimentando-se principalmente de flagelados, bactérias, fitoplâncton e outros organismos do pico e nano-plâncton (Azam *et al.*, 1983; Stoecker *et al.*, 1994; Fenchel, 2008). São importantes elos da cadeia trófica clássica, já que são presas importantes para grupos superiores de animais como copépodes e peixes (Fenchel, 2008; Kirchman, 2012).

Dentre esses ciliados, a Sub-classe Oligothichia (Ciliophora, Spirotrichia) é o grupo mais abundante, podendo ocorrer em todos os oceanos e mares do Ártico, dos trópicos até a Antártica, podendo apresentar morfoespécies restritas a certas regiões geográficas e até morfoespécies endêmicas (Agatha, 2011; Canals *et al.*, 2020). Esse grupo apresenta grande diversidade morfológica, e tende a medir de 15 a 260 μm (Agatha, 2011).

Dentro da sub-classe Oligothichia, Oligotrichida é a ordem com maior riqueza no ambiente marinho (Liu *et al.*, 2019). Apresenta 4 famílias, sendo elas: Strombidiidae, Tontoniidae, Cyrtostrombidiidae e Pelagostrombidiidae (Agatha, 2004b, 2011; Adl *et al.*, 2018). Dentro das famílias foram descritos 15 gêneros e mais de 100 espécies (Agatha, 2011).

A família Strombidiidae é o principal grupo da sub-classe Oligothrichia (Lynn, 2008; Liu *et al.*, 2015b). Apresentam uma ciliatura oral com membranelas ventrais e endorais, e a estomatogênese ocorre no tubo transitório (Agatha, 2004a; Liu *et al.*, 2015b). Sua ciliatura somática (cinta cinécia e uma cinta cinécia ventral) apresenta uma vasta diversidade de padrões considerados importantes para a diferenciação dos gêneros (Liu *et al.*, 2015b; 2019) (Fig. 1).

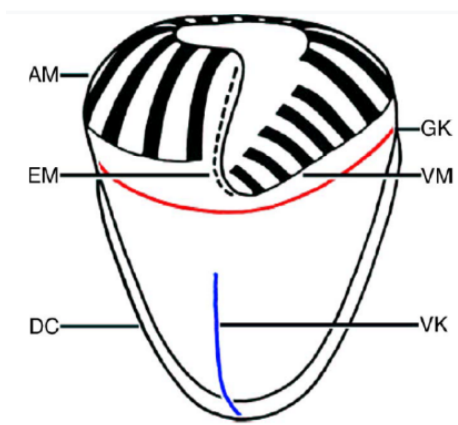


Figura 1 - Principais estruturas taxonômicas generalizadas da família Strombidiidae. **AM**- Grandes membranelas anteriores bucais; **VM**- Pequenas membranelas ventrais bucais; **EM**- membranelas endorais; **GK**- Cinta cinécia; **VK**- Cinta cinécia ventral e **DC**- Superfície celular distendida. Agatha, S. (2004a)

São organismos de vida livre, globalmente distribuídos e altamente abundantes, colonizando águas tanto costeiras como oceânicas (Agatha, 2011; Song *et al.*, 2021). Estudos anteriores mostraram que a diversidade e a distribuição deste grupo se encontra modelada principalmente pela temperatura, salinidade e disponibilidades alimentares (Gonzalez *et al.*, 1990; Montagnes, 1996; Agatha e Riedel-Lorjé, 1997; Agatha, 2011; Song *et al.*, 2021). Estudos filogenéticos revelaram que a família Strombidiidae é um grupo parafilético (Agatha, 2004b; Zhang *et al.*, 2010; Agatha e Strüder-Kypke, 2014), porém ainda há autores que defendem a necessidade de mais dados para a definição (Li *et al.*, 2013).

O conhecimento da família vem aumentado muito, a maioria dos trabalhos foram realizados em escala local, com amostras pontuais de águas costeiras, sedimentos, lagoas, baías e golfos (Lynn e Gilron, 1993; Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015a, 2015b, 2019; Hu *et al.*, 2019, Snyder *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). Desta forma, o conhecimento ecológico e os fatores principais que determinam a diversidade e distribuição deste grupo no oceano global ainda são limitados.

Devido a seu tamanho celular, tradicionalmente os ciliados foram estudados utilizando técnicas de microscopia óptica (Foissner *et al.*, 2014). Porém as técnicas de filtração, coloração e fixação, podem causar perdas de organismos assim como as alterações em sua morfologia, impedindo a identificação taxonômica detalhada (Foissner *et al.*, 2014). Desta forma, os avanços de sequenciamentos de DNA tornaram mais viável os estudos filogenéticos da diversidade dos protistas (Pawlowski *et al.*, 2012; Caron *et al.*, 2012). Análise de fragmentos de genes de RNA ribossômico (rRNA), tornaram-se análises viáveis para identificação de táxons microbianos (Countway *et al.*, 2005). A região hipervariável V4 do gene 18S rRNA (~500pb) foi proposta como um bom marcador molecular para o estudo da diversidade de eucariotos (Pawlowski *et al.*, 2012).

No presente estudo, analisamos a diversidade e a distribuição de ciliados da família Strombidiidae no oceano global, explorando a sua diversidade taxonômica e filogenética para estabelecer o nicho dos principais clados desse grupo. Os resultados deste trabalho são fundamentais para melhor entendimento ecológico dos ciliados, suas relações com o meio biótico e meio abiótico, e assim prever como as mudanças climáticas poderão afetar este grupo que é um nodo essencial da teia trófica marinha.

1.2- Descrição dos principais gêneros da família Strombidiidae

Esta descrição fornece informações coletadas da bibliografia sobre a taxonomia, diagnósticos morfológicos, e espécies-tipo dos principais gêneros da família Strombidiidae.

Gênero *Novistrombidium* (Song e Bradbury, 1998)

Esse gênero apresenta uma cinta cinécia incompleta (girdle kinety) ao redor da área equatorial que é visivelmente aberta com uma grande abertura ventral através da qual se estende a cinécia ventral (ventral kinety) (Song e Bradbury, 1998; Song *et al.*, 2021) (Fig. 2). A espécie-tipo deste gênero é *Novistrombidium testaceum* (Anigstein, 1914; Song e Bradbury, 1998; Song *et al.*, 2021)

Devido a algumas mudanças morfológicas foi proposto a divisão de 2 sub-gêneros de *Novistrombidium* (*Novistrombidium* e *Propecingulum*) principalmente baseado em diferentes localizações do primórdio oral em relação à cinta cinécia e os pontos de fixação dos extrussomos (Agatha e Strüder-Kypke, 2014; Song e Bradbury, 1998; Song *et al.*, 2021). Porém, são poucas as espécies conhecidas para cada sub-gênero, optando assim, por adotar uma abordagem conservadora até novos táxons serem apresentados (Song *et al.*, 2021).

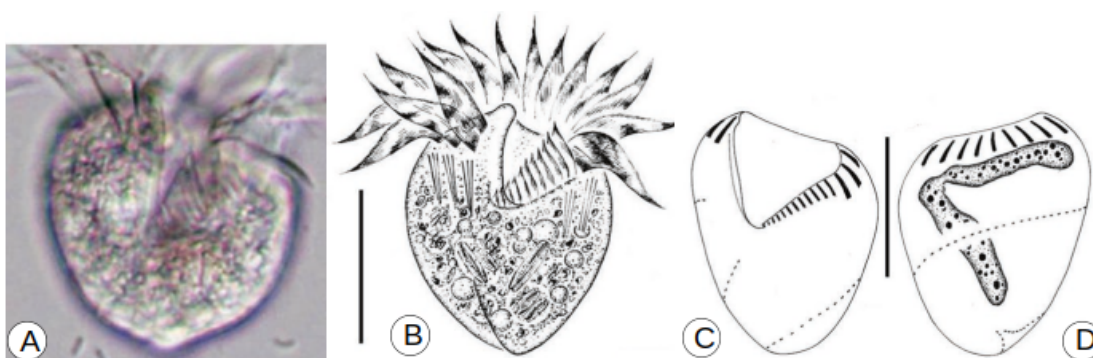


Figura 2 - *Novistrombidium apsheronicum* (a, b) Visões ventrais de células vivas. (c,d) visão ventral e ciliaturas (c) dorsal . Barra de escala:30 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Sinistrostrombidium* (Liu *et al.*, 2015b)

Este gênero se caracteriza por apresentar uma cinécia ventral e uma cinta cinécia sinistramente espiralada (Fig. 3). O primórdio oral desenvolve-se abaixo da extremidade esquerda da cintura cinécia. A espécie-tipo deste gênero é *Sinistrostrombidium cupiformum* (Liu *et al.*, 2015b; Song *et al.*, 2021)

Nos Strombidiidae, a cinta cinécia geralmente são circulares ou espiroladas dextralmente. Em *Sinistrostrombidium cupiformum*, no entanto, a cinta cinécia é sinistramente espiralada, com base no qual o gênero *Sinistrostrombidium* foi estabelecido (Liu *et al.*, 2015b; Song *et al.*, 2021).

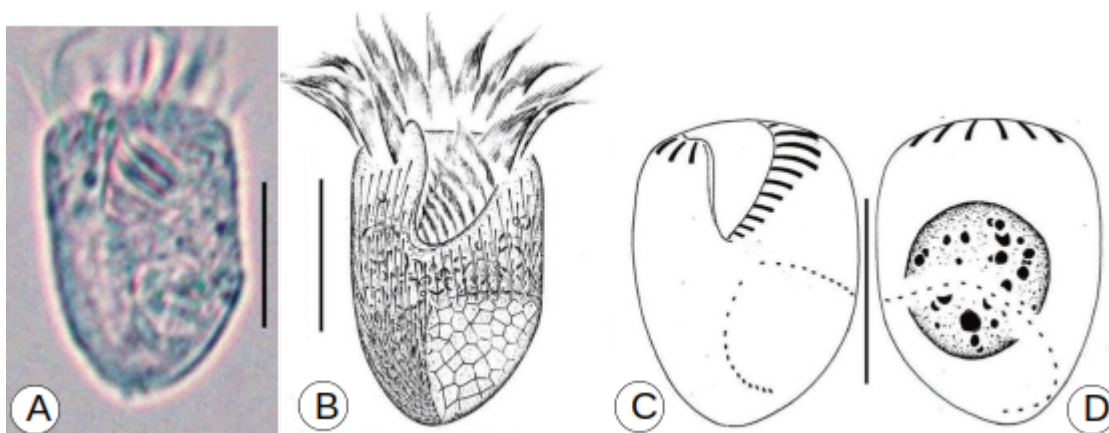


Figura 3 - *Sinistrostrombidium cupiformum* (a, b) Visões ventrais de células vivas (c,d) visões ventrais e ciliaturas (c) visão dorsal. Barra de escala: 20 μm (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Apostrombidium* (Xu *et al.*, 2009)

Estes Strombidiidae apresentam cinécia somática (somatic kinety) consistindo de vários fragmentos que se estendem em direção à extremidade posterior da célula em ambos os lados ventrais e dorsais, com ou sem fragmento de cinécia subterminal (Fig. 4). O primórdio oral está localizado entre os fragmentos cinéticos 1 e 2 (Song *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2021). A espécie-tipo deste gênero é *Apostrombidium pseudokielum* (Xu *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2021).

Inicialmente o diagnóstico deste gênero foi caracterizado em relação à espécie *Apostrombidium pseudokielum*, porém após duas novas espécies

serem atribuídas ao gênero, a diagnose foi aprimorada e novas características adquiridas (Song *et al.*, 2013, 2019, 2021).

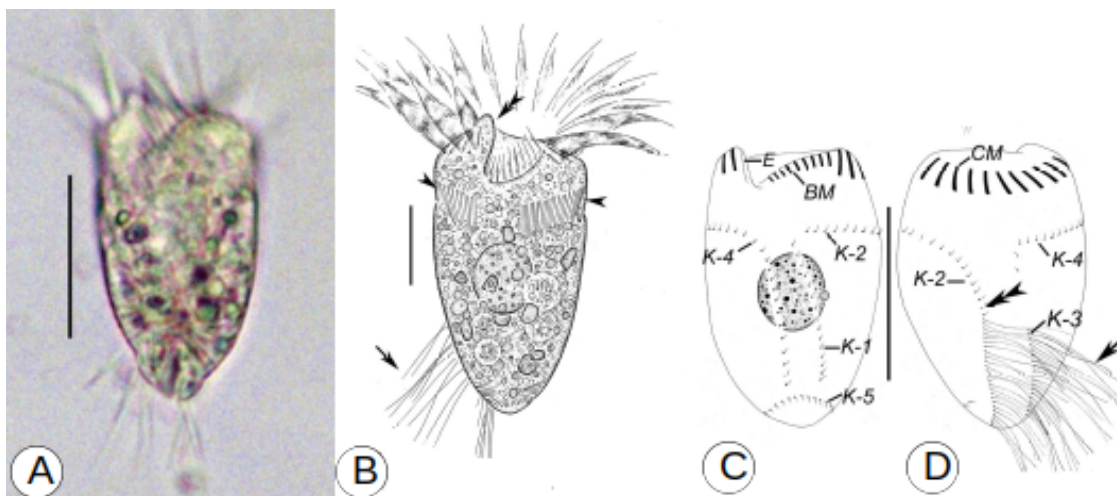


Figura 4 - *Apostrombidium* sp. (a) *Apostrombidium orientale* (b) Visões ventrais de indivíduos vivos (a, b) Visões ventral e dorsal, a seta marca os cílios dorsais extremamente longos, pontas de seta duplas marcam os cílios somáticos normais (c,d). Scale bar: 30 μ m (a), Barra de escala: 15 μ m (b) (Hu *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019).

Gênero *Parallelostrombidium* (Agatha, 2004a)

Neste gênero, a cinta cinécia ventral segue a porção posterior da cinta cinécia dextralmente espiralada, assim, ambas as cinécias têm a mesma orientação (Fig. 5) (Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021). Com base nas mesmas orientações das cinécias ventrais e de cintas cinécias, Agatha (2004a) estabeleceu o gênero *Parallelostrombidium*, designando *Parallelostrombidium rhyticollare* como espécie-tipo (Corliss e Snyder, 1986; Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021) e acabou concluindo que a cinta cinécia e cinécia ventral podem ou não ser inversamente orientadas (Song *et al.*, 2021).

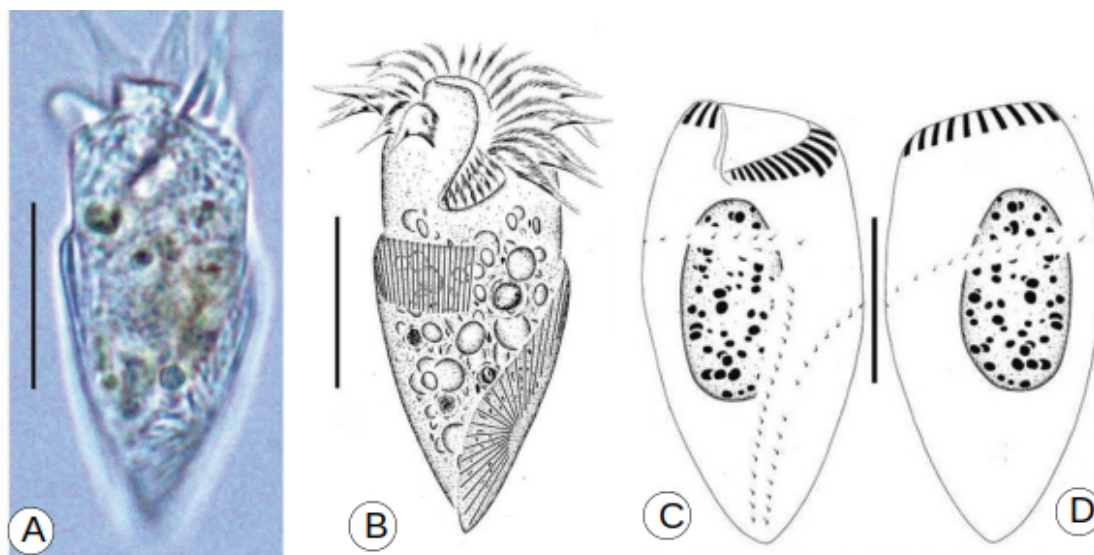


Figura 5 - *Parallelostrombidium conicum* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e visões das ciliaturas (c) visão dorsal. Barra de escala: 20 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Varistrombidium* (Xu *et al.*, 2011)

Este gênero de Strombidiidae apresenta cinco cinécias somáticas dispostas em espiral que correm obliquamente através do lado ventral e paralelos entre si, com os dois mais longos estendendo-se para o lado dorsal e terminando na área caudal (Fig. 6) (Xu *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2021).

Após algumas descrições anteriores, Xu *et al.* (2011) redescreveu a espécie *Varistrombidium kielum* e revelou seu padrão ciliar único, com base no qual estabeleceu o que seria o gênero *Varistrombidium* (Song *et al.*, 2021). A espécie-tipo deste gênero é *Varistrombidium kielum* (Maeda e Carey, 1985; Xu *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2021)

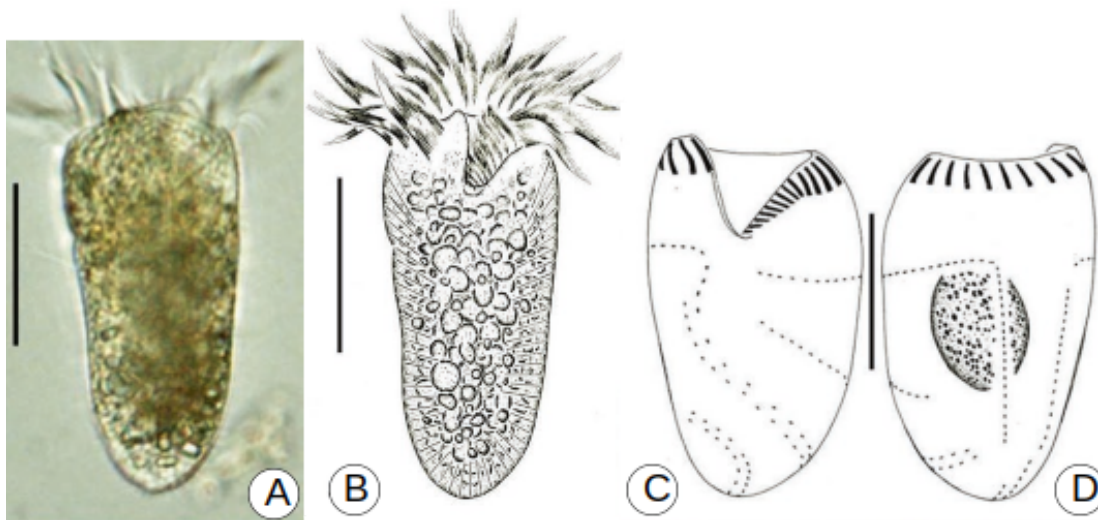


Figura 6 - *Varistrombidium kielum* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e dorsal. Barra de escala: 30 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Spirostrombidium* (Xu *et al.*, 2011)

Este gênero apresenta a cinta cinécia dextralmente espiralada, porção posterior inversamente orientada e paralela à cinécia ventral longitudinal (Fig. 7) (Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021).

O gênero *Spirostrombidium* foi estabelecido em 1978 e redefinido por Agatha em 2004a. O padrão ciliar deste gênero é bem semelhante ao *Parallelostrombidium*, exceto que as porções posteriores da cinécia ventral e cinta cinécia têm orientações opostas (Song *et al.*, 2021). A espécie-tipo é *Spirostrombidium sauerbreyae* (Kahl, 1932; Song *et al.*, 2021).

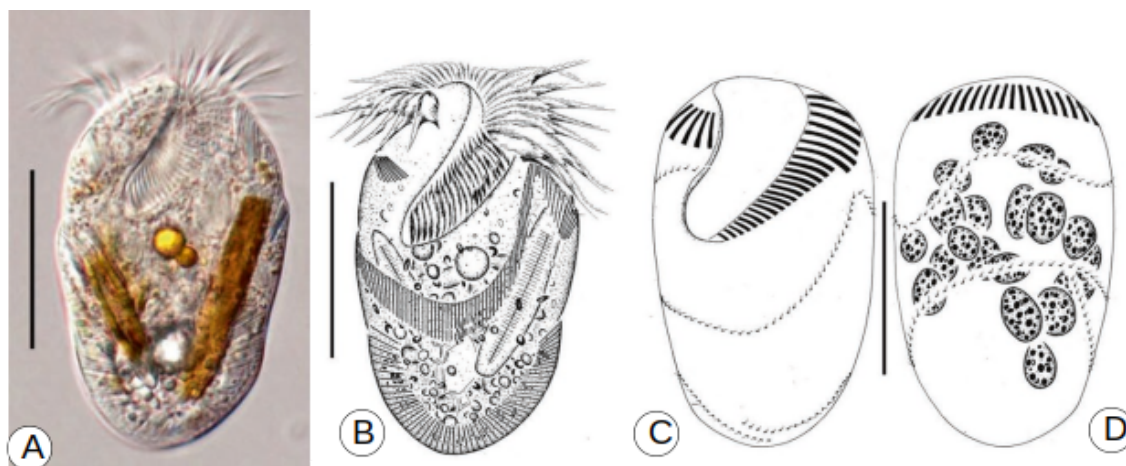


Figura 7 - *Spirostrombidium apourceolare* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e dorsal. Barra de escala: 30 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Omegastrombidium* (Agatha, 2004a)

Este gênero apresenta cinta cinécia orientada horizontalmente no lado dorsal, estendendo-se até a extremidade posterior do corpo no lado ventral (Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021). Foi no estudo de Song *et al.* (2000) que o padrão ciliar foi descrito pela primeira vez. Com base no cinta cinécia em forma de “ Ω ”, Agatha (2004a) estabeleceu o gênero *Omegastrombidium elegans* e o designou como espécie-tipo (Fig. 8) (Florentin, 1901; Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021).

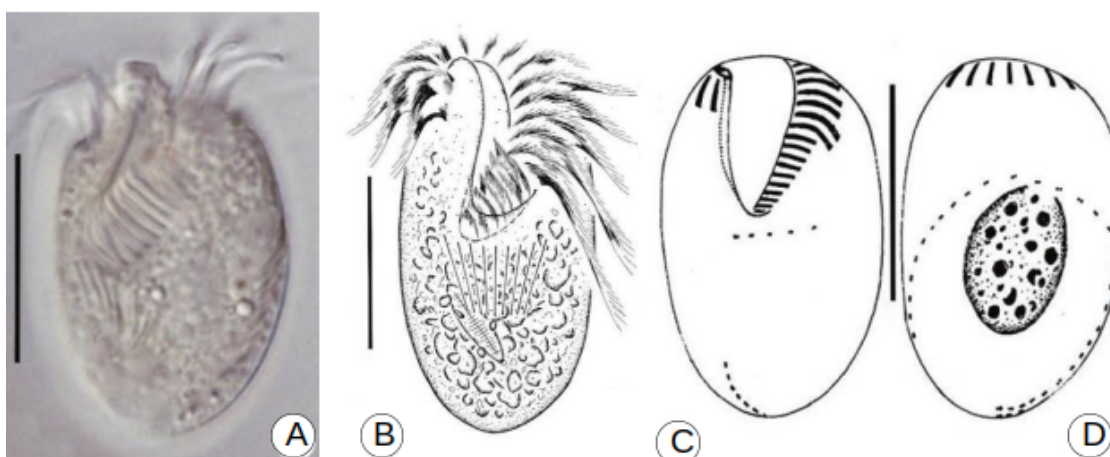


Figura 8 - *Omegastrombidium elegans* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 20 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Antestrombidium* (Liu et al., 2015a)

Este Strombidiidae apresenta três cintas cinécias somáticas, ou seja, uma cinta cinécia dextralmente espiralada, uma cinta cinécia circular e uma cinta cinécia ventral (Fig. 9) (Liu et al., 2015a, Song et al., 2021). Liu et al. (2015a) encontrou um Strombidiidae com a cinta cinécia circular fragmentada, sendo essa, uma característica única na qual o gênero *Antestrombidium* foi estabelecido (Song et al., 2021). A espécie-tipo é *Antestrombidium agathae* (Liu et al., 2015a; Song et al., 2021).

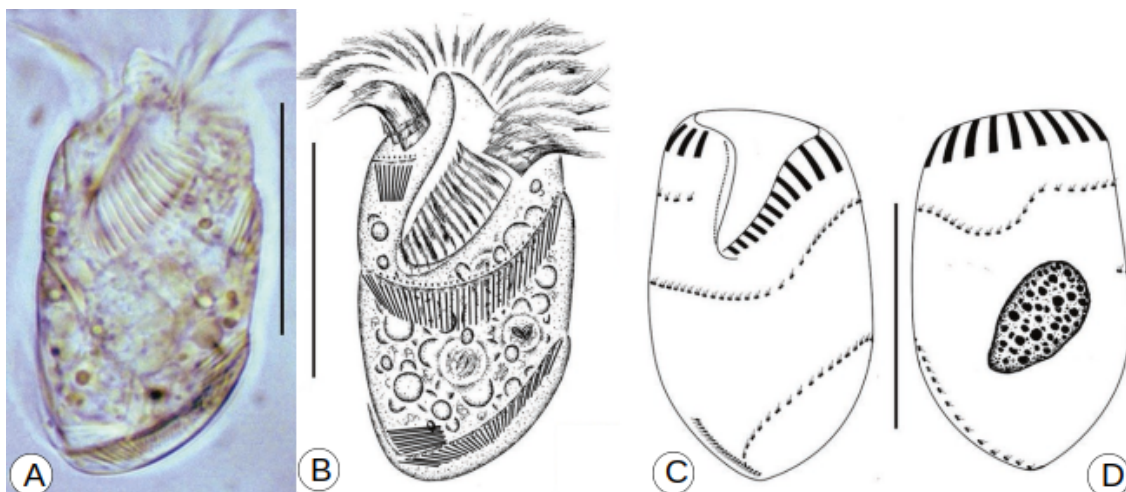


Figura 9 - *Antestrombidium agathae* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 30 μ m (Hu et al., 2019).

Gênero *Williophrya* (Liu et al., 2011)

O gênero *Williophrya* apresenta membranelas adorais indiferenciadas; ciliatura somática consistindo apenas de um cinturão com uma única fileira, bipartido e orientado horizontalmente (Fig. 10) (Song et al., 2021). *Williophrya maedai* é a única espécie da família Strombidiidae que não apresenta diferenciação das membranelas adorais, sendo assim, através desta característica Liu et al. (2011) estabeleceu este gênero (Song et al., 2021).

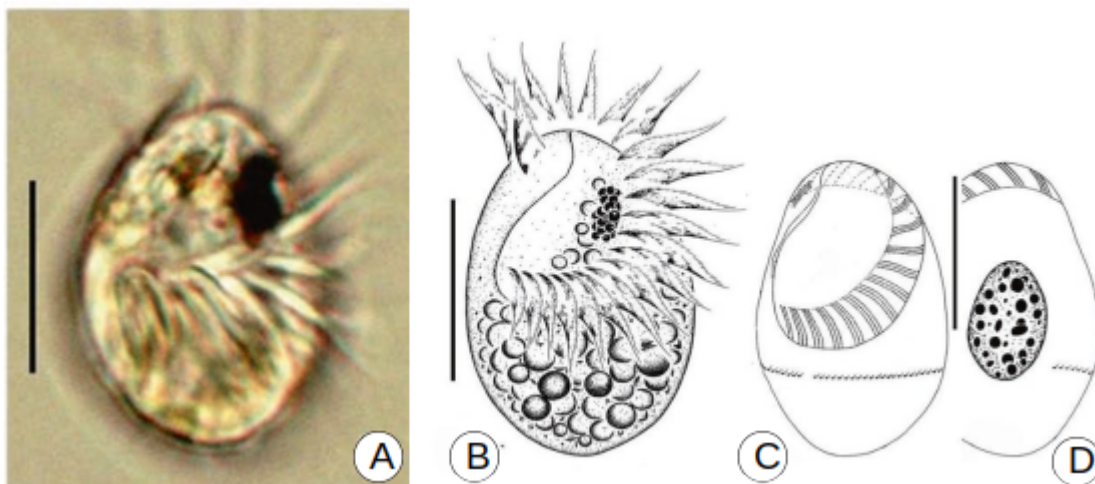


Figura 10 - *Williophrya maedai* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 25 μ m (Hu *et al.*, 2019).

Gênero *Strombidium* (Claparède e Lachmann, 1859)

Apresentam cinta cinécia horizontal (Fig. 11). Cinta cinécia ventral longitudinal, ocasionalmente reduzida ou ausente. O primórdio oral desenvolve-se no nível ou abaixo do nível da cinta cinécia (Agatha, 2004a; Song *et al.*, 2021). O gênero *Strombidium* é o gênero-tipo e o mais especioso da família Strombidiidae, entretanto, muitas espécies foram classificadas erroneamente como *Strombidium*, fato que, posteriormente foram redescritos (Song *et al.*, 2021), sendo a espécie-tipo *Strombidium sulcatum* (Claparède e Lachmann, 1859; Song *et al.*, 2021).

Essa ordem Oligotrichida caracteriza-se por apresentar uma zona adoral em formato de C, membranela endoral, (Adl *et al.*, 2018; Agatha, 2011), duas fileiras de ciliaturas somáticas (cinta cinécia e a cinta cinécia ventral), apresentam extrusosomos (toxicistos) em forma de agulha, que auxiliam na imobilização das presas podendo levá-las a morte (Adl *et al.*, 2018; Agatha, 2011).

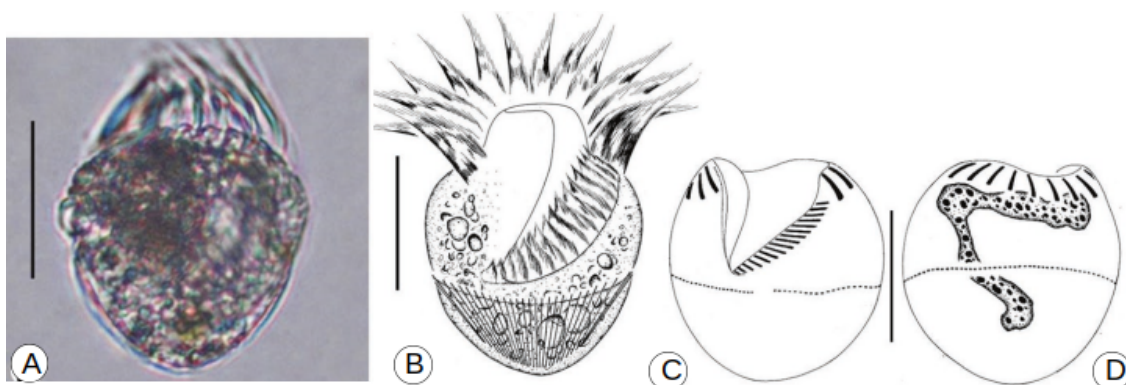


Figura 11 - *Strombidium capitatum* (a, b) Visões ventrais de indivíduos vivos (c,d) Visões ventrais e ciliaturas (c) e visão dorsal. Barra de escala: 30 μ m (Hu *et al.*, 2019).

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Estudar a diversidade, ecologia e distribuição de ciliados da Família Strombidiidae (Ciliophora) no oceano global.

Objetivos específicos:

- Explorar a diversidade taxonômica e filogenética da família Strombidiidae.
- Entender a distribuição da família Strombidiidae, no oceano global
- Analisar dados de distribuições horizontais e verticais da família Strombidiidae junto com variáveis ambientais para aferir o nicho deste grupo e conhecer melhor sobre sua ecologia.

3. Materiais e métodos

3.1 Amostragem, extração e sequenciamento de DNA

Para o estudo da diversidade espacial da família Strombidiidae, utilizamos amostras de sequenciamento massivo da região V4 do gene 18S rRNA. As amostras foram provenientes da expedição de circum-navegação Tara Oceans

(<https://oceans.taraexpeditions.org>) e da expedição Tara polar. Os dados incluem amostras que pertencem a três frações de tamanho do plâncton: pico, nano e micro-plâncton (de Vargas *et al.*, 2015; Canals *et al.*, 2020).

A água marinha foi coletada com o uso de garrafas Niskin, bombas e redes. As amostras analisadas foram coletadas na superfície (~ 3 m de profundidade), no máximo de clorofila (DCM, do inglês Deep chlorophyll maximum) e na zona mesopelágica (200 a 1000 m).

O plâncton foi separado em até onze frações de tamanho operacional, três enriquecidas com procariotos pico-planctônicos (0.22–1.6 μm , 0.22–3 μm e 0.8–3 μm), quatro enriquecidos com eucariotos nano-planctônicos (0.8–5 μm , 0.8–20, μm 3–20 μm , 5–20 μm) e dois enriquecidos com eucariotos micro-planctônicos 20–180 μm e 180–2000 μm). Também foram coletados em filtros de 0.8 μm e 3 μm sem pré-filtração (Sunagawa *et al.*, 2015 De Vargas *et al.*, 2015). As amostras foram coletadas em filtros de membrana de policarbonato de 142 mm (frações pico) e 47 mm (frações nano e micro) de diâmetro e criopreservadas para análises moleculares (Sunagawa *et al.*, 2020).

O DNA foi extraído dos filtros com diferentes métodos de extração de ácidos nucleicos dos diferentes grupos de plâncton amostrados, como descrito por Alberti *et al.* (2017). O sequenciamento foi realizado mediante a técnica de metabarcoding com a tecnologia Illumina miSeq, utilizando os primers TAReuk454 FWD1 (5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3') e TAReuk REV3 (5'-ACTTTCGTTCTTGATYRA-3') (Stoeck *et al.*, 2010; Sunagawa *et al.*, 2020). As amostras analisadas através deste estudo farão parte do projeto AtlantECO (<https://www.atlanteco.eu/>), que criará uma base de dados de microbiomas do Oceano Atlântico.

3.2 Processamento das sequências

As amostras foram processadas utilizando o software R com o pacote DADA2 v1.10.0 (<https://github.com/benjjneb/dada2>) (Callahan *et al.*, 2016) após os cortes de primers por Cutadapt 1.18 (Martin, 2011). O pacote DADA2 infere

sequências biológicas únicas (ASV, do inglês Amplicon Sequencing Variants) a partir de dados de sequenciamento de amplicons de alto rendimento, substituindo a abordagem de agrupamento OTU mais grosseira e menos precisa (Roblin *et al.*, 2021). O pipeline DADA2 leva como entrada arquivos rápidos e produz as variantes de sequência e as suas abundâncias de amostra após a remoção de erros de substituição (Roblin *et al.*, 2021).

A atribuição taxonômica de sequências eucarióticas foram realizadas usando BLAST (Altschul, *et al.*, 1990) com o banco de dados de referência PR2 (Guillou *et al.*, 2013) e com o banco de dados de eucariotos V4 (Obiol *et al.*, 2020). Sequências identificadas como ciliados foram recuperadas do conjunto de dados original e validadas usando o banco de dados EukRef-Ciliophora (Boscaro *et al.*, 2018). As sequências de ciliados foram então classificadas em um nível de classe (sempre que possível) seguindo a classificação atual (Adl *et al.*, 2018) com base em pesquisas do BLAST no banco de dados PR2.

3.3 Análise Filogenética

Para este estudo, devido a taxonomia ser muito dinâmica e ocorrer constantes alterações, optamos por seguir a classificação utilizada por Adl *et al.* (2018) e Xu *et al.* (2022). A árvore de referência (RT, do inglês Reference Tree) foi construída utilizando sequências do gene 18s rRNA (192 sequências, comprimento mínimo 700 bp) do banco de dados públicos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) garantindo que os principais clados de Strombidiidae fossem representados. O alinhamento das sequências de referência foram realizadas no programa MAFFT (KATOY *et al.*, 2002) (a multiple sequence alignment program) e posteriormente visualizado e editado pelo Aliview software (<http://ormbunkar.se/aliview/>) (Larsson, 2014). A análise de máxima verossimilhança (ML) foi conduzida usando RAxML v8.2.X (Stamatakis, 2014), através do modelo filogenético GTRGAMMA. A confiabilidade das ramificações internas foi avaliada com um método bootstrap paramétrico com 1.000 réplicas (Song *et al.*, 2021). E após isso, através dos softwares Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e iTOL (Letunic e Bork, 2007), a árvore foi editada e modificada.

Para inferir as posições filogenéticas das ASV, incorporamos elas na RT criada. Para isso, primeiro, alinhamos as ASV com os alinhamentos de referência usando PaPaRa v.2.5 (Berger e Stamatakis, 2011) e após, colocamos as ASV na árvore usando o Algoritmo de Posicionamento Evolucionário (EPA) (Berger *et al.*, 2011) conforme implementado em RAxML. Para a validação da colocação filogenética foram analisados os valores de LWR (Stamatakis, 2014).

3.4 Dados ambientais e ótimo ambiental

As variáveis ambientais incluídas neste estudo foram a salinidade, o oxigênio e a temperatura. Para medir a temperatura e salinidade, foram utilizados dois termossalinógrafo (TSG, Seabird SBE45 e SBE38), com medições durante toda a expedição, e as medições de salinidade foram corrigidas após a análise de amostras de água do mar não filtradas (Gorsky *et al.*, 2019). O Equilibrador Inlet Mass Spectrometer forneceu medições de alta resolução da razão de oxigênio dissolvido (ou seja, O₂ /Ar) (Gorsky *et al.*, 2019).

Para cada clado filogenético definido, foi calculado o ótimo ambiental em função da abundância total máxima de reads por amostras para cada fator ambiental .

3.5 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas utilizadas neste estudo foram conduzidas e visualizadas no R Studio (v.2.15.1, <http://r-project.org>). As análises de rarefação foram realizadas no R utilizando o pacote “vegan” (Oksanen *et al.*, 2013; Gimmler *et al.*, 2016). Para avaliar a diversidade alfa para cada amostra foi calculado o índice de Shannon (H) usando o pacote “vegan” em R (Oksanen *et al.*, 2013; Gimmler *et al.*, 2016). Para avaliar a riqueza de espécies, foi utilizado o estimador chao.1 utilizando o pacote “vegan” em R (Oksanen *et al.*, 2013; Gimmler *et al.*, 2016).

4. Resultados

4.1 Análise exploratória da base de dados

Utilizamos amostras de sequenciamento massivo da região V4 do gene 18S rRNA da expedição de circun-navegação Tara Oceans (2009-2013) e da expedição Tara Polar (2013) para análises de exploração da base de dados.

O conjunto de dados analisado neste trabalho foi constituído por 1008 amostras de 147 pontos de coleta através do oceano global (Fig. 12). As amostras foram coletadas na superfície (SRF 0-5 m), no DCM e mesopelágico (MESO, 200 - 1000 m). Os dados incluem onze frações de tamanhos operacionais dentro do pico, nano e micro-plâncton (tabela 1). Representantes da ordem Oligotrichida foram encontrados em 95.63% das amostras (964 amostras), em todos os pontos de coleta, cobrindo 9 regiões oceânicas (Fig. 12). A ordem Oligotrichida representou 34.8% do total de reads de Ciliophora.

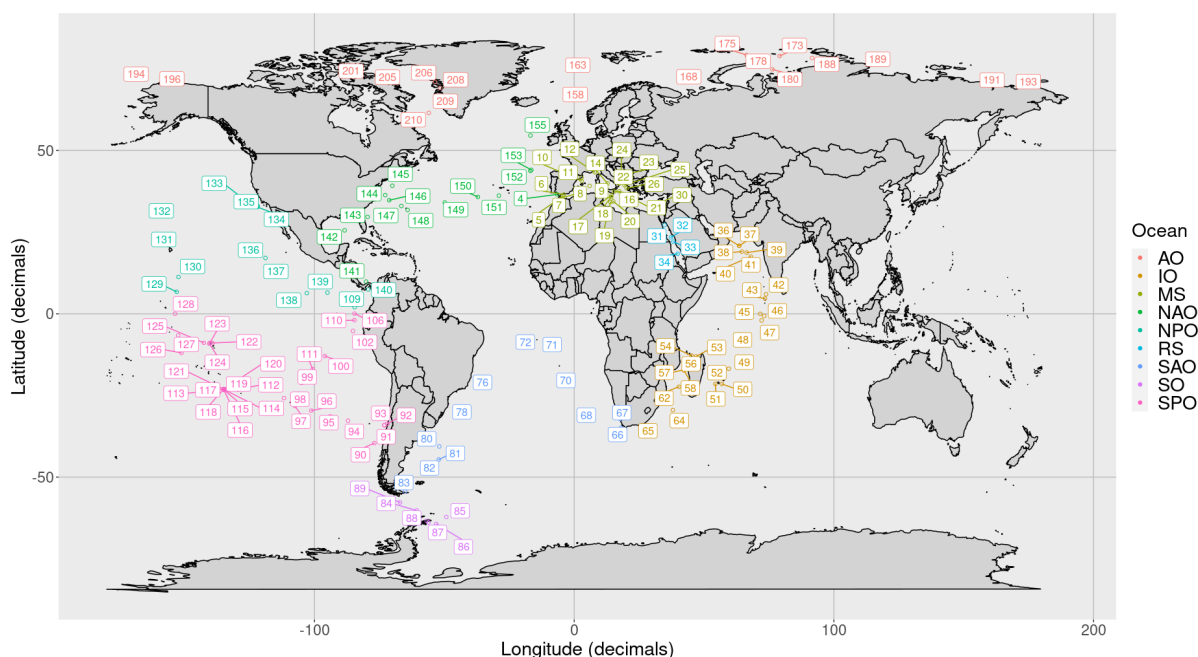


Figura 12 - Estações de coleta do Tara Oceans (2009-2013) e Tara Polar (2013) onde sequências da ordem Oligotrichida foram encontradas. AO: Oceânico Ártico, SO: Oceano Austral, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, SAO: Oceano Atlântico Sul, SPO: Oceano Pacífico Sul, NPO: Oceano Pacífico Norte e RS: Mar Vermelho.

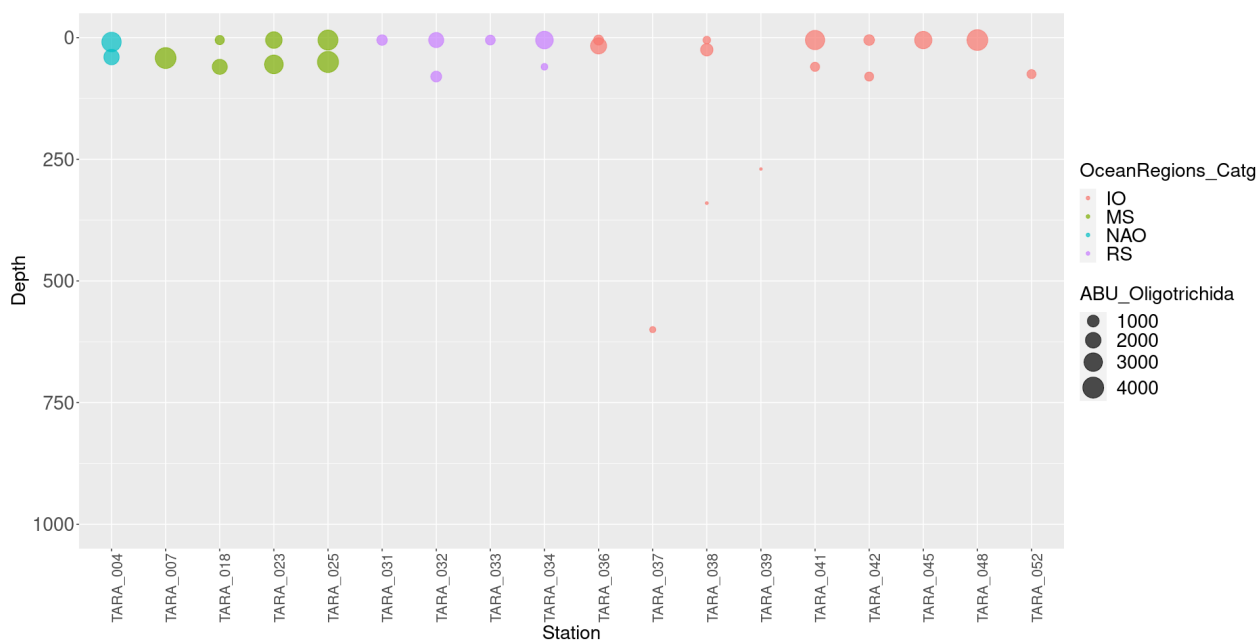
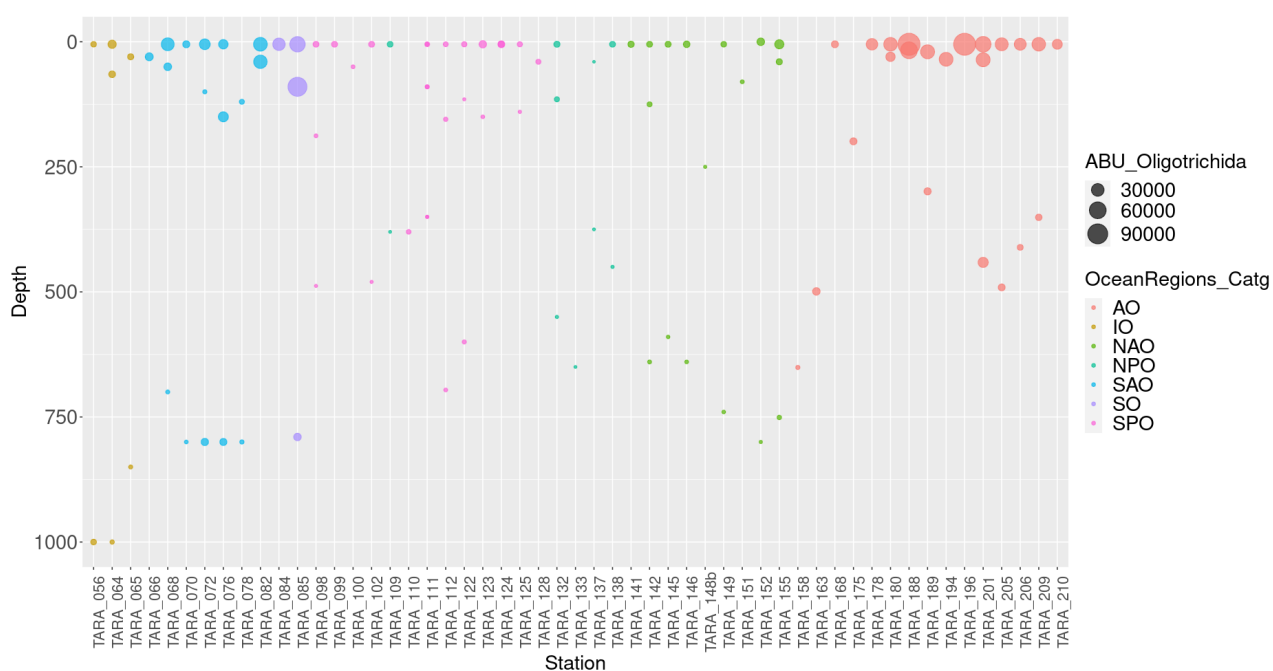
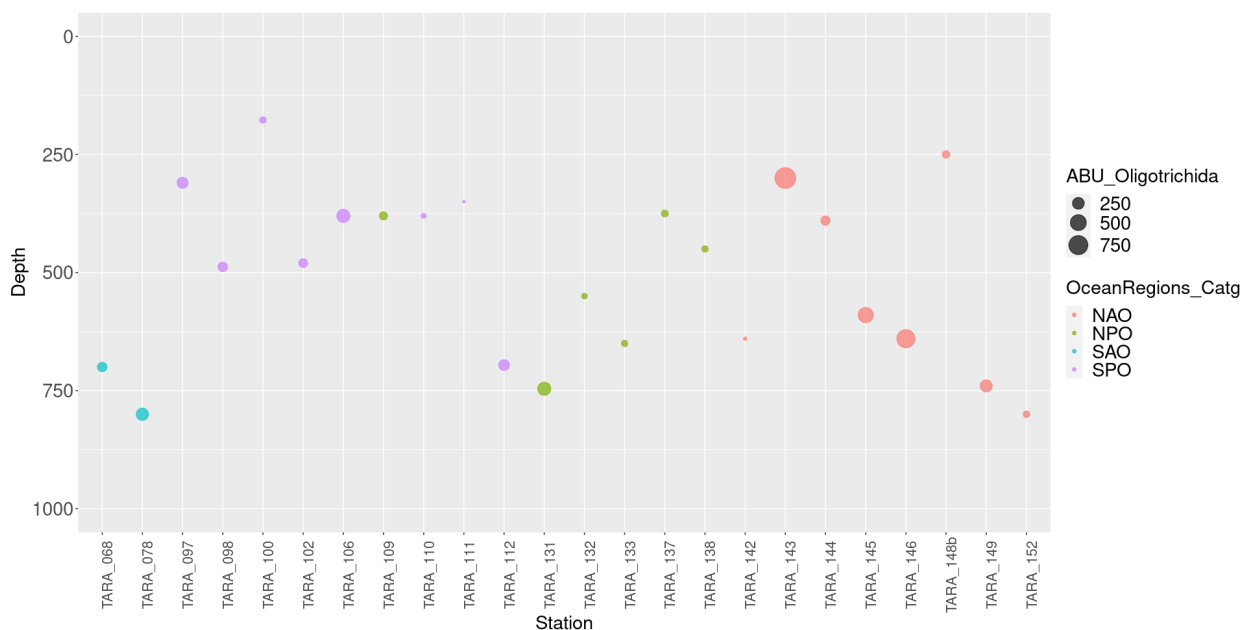
A**B**

Fig. 13 - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **A**. Tamanho: 0.22-1.6 µm, **B**. Tamanho: 0.22-3 µm. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

C



D

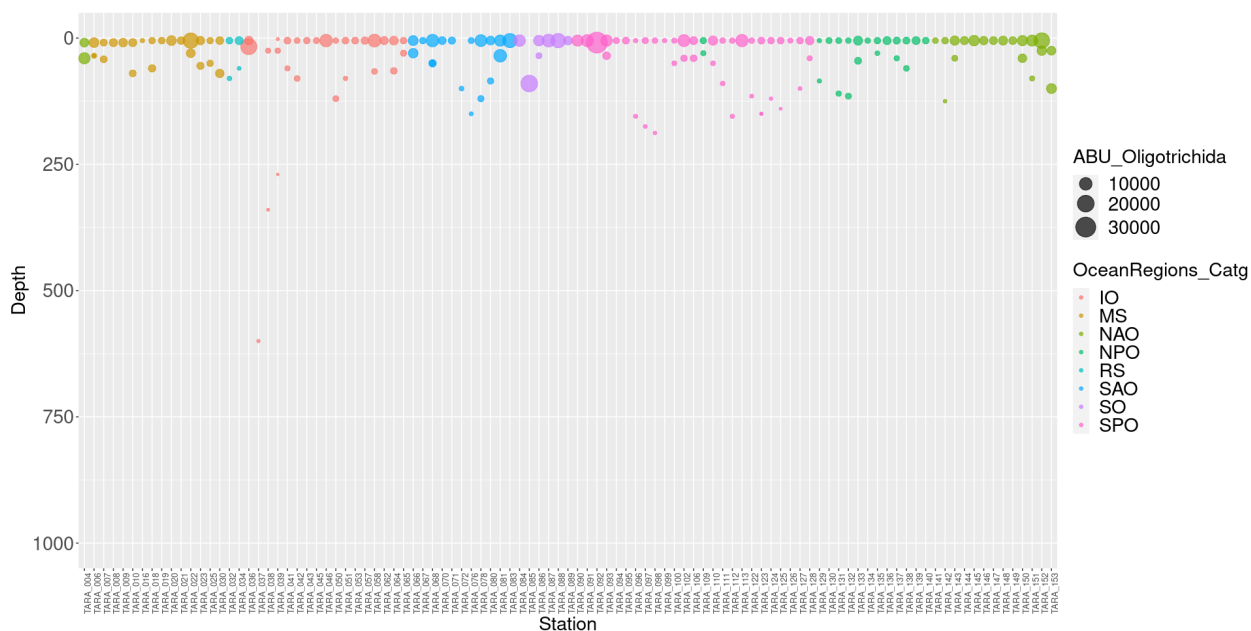


Fig. 13 (Cont.) - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **C**. Tamanho: 0.8-3 μm , **D**. Tamanho: 0.8-5 μm AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

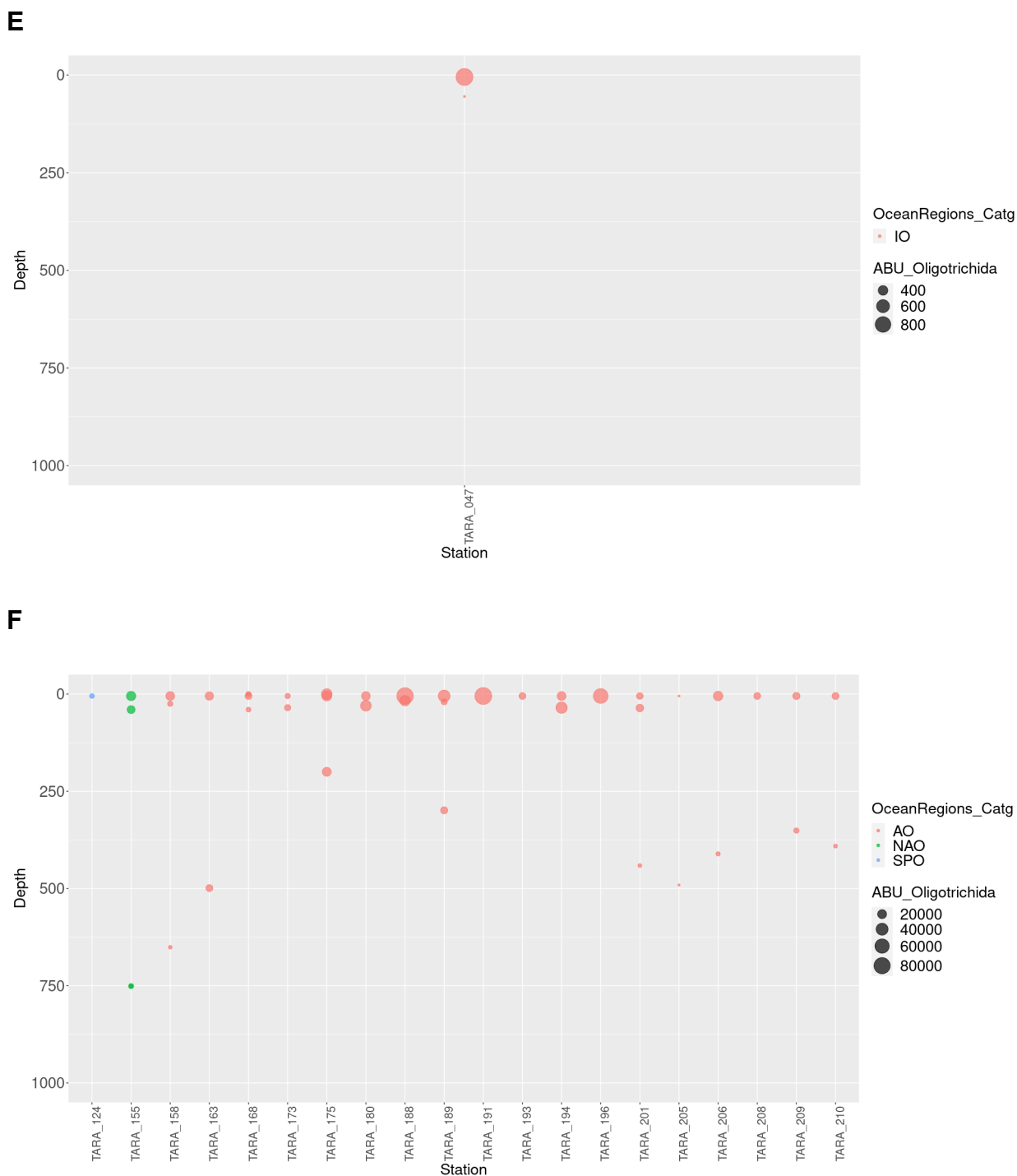
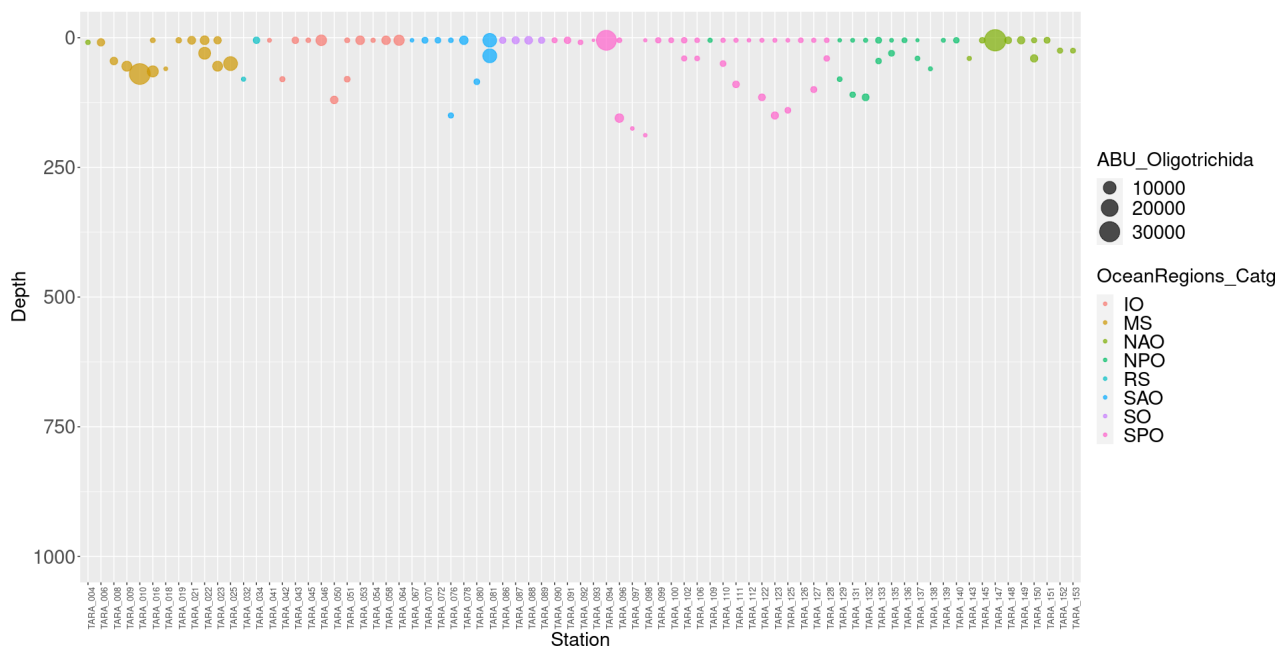


Fig. 13 (Cont.) - Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. O tamanho dos círculos corresponde à abundância **E**. Tamanho: 0.8-20 μm , **F**. Tamanho: 3-20 μm . AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

G



H

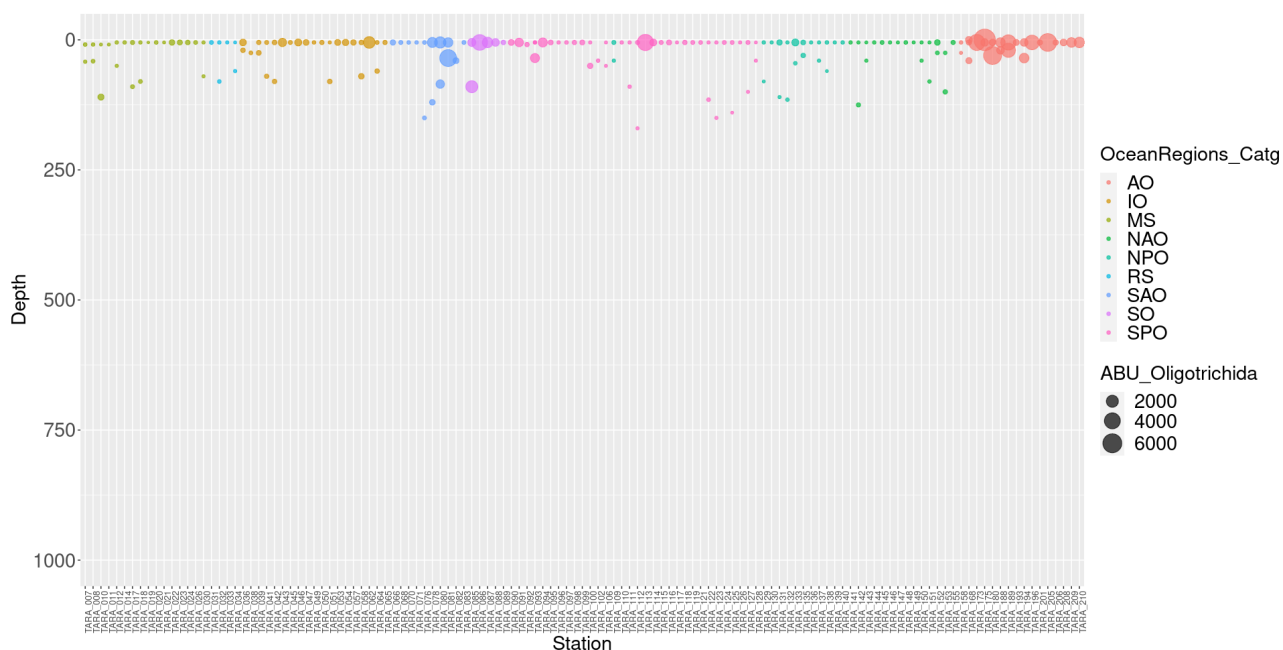


Fig. 13 - (cont.) Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. **G.** Fração:5-20 µm, **H.** Tamanho:20-180 µm. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

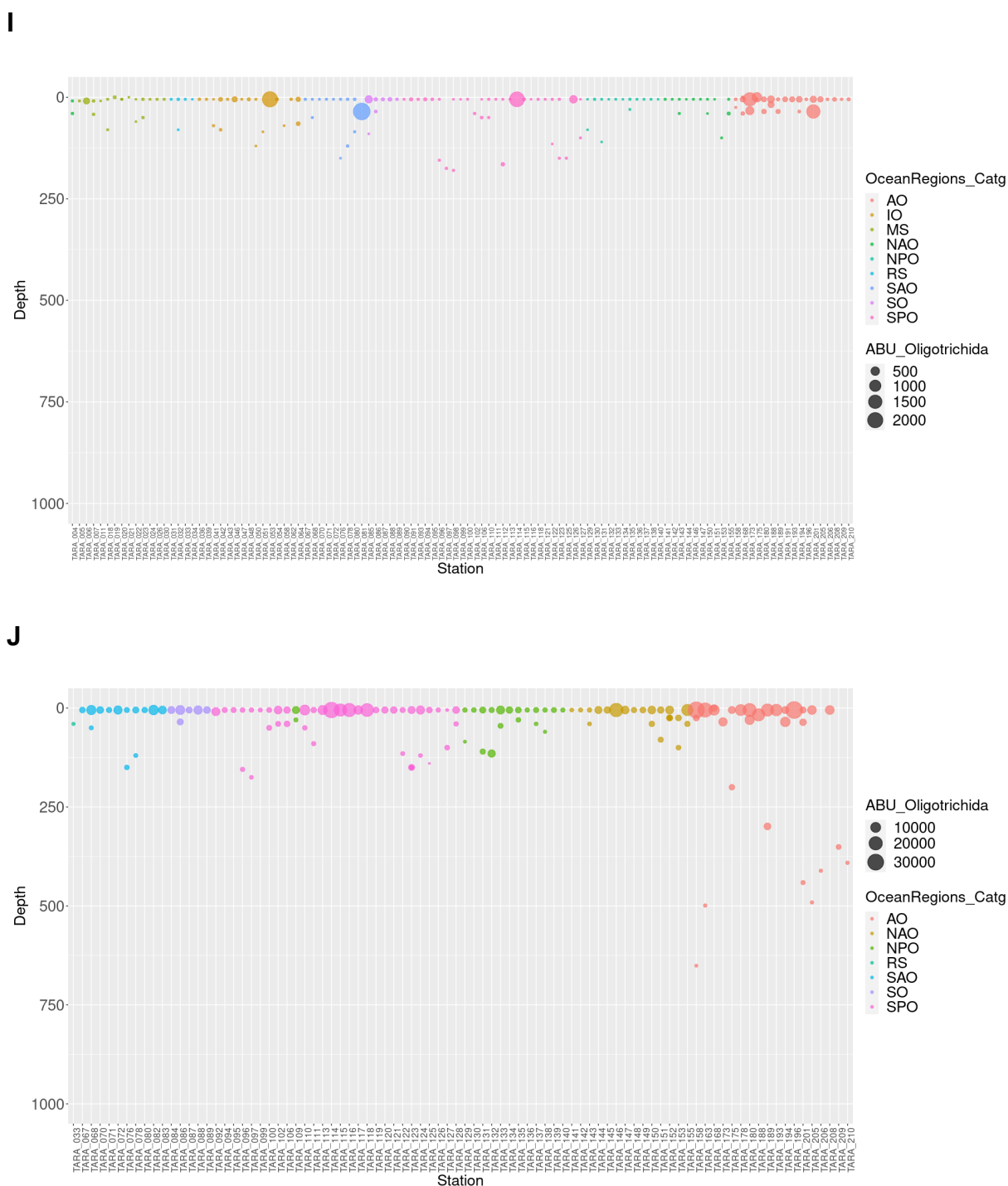


Figura 13 - (cont.) Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global **I**. Tamanho:180-2000 μm , **J**. Tamanho : $>0.8 \mu\text{m}$. AO: Oceânico Ártico , IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

K

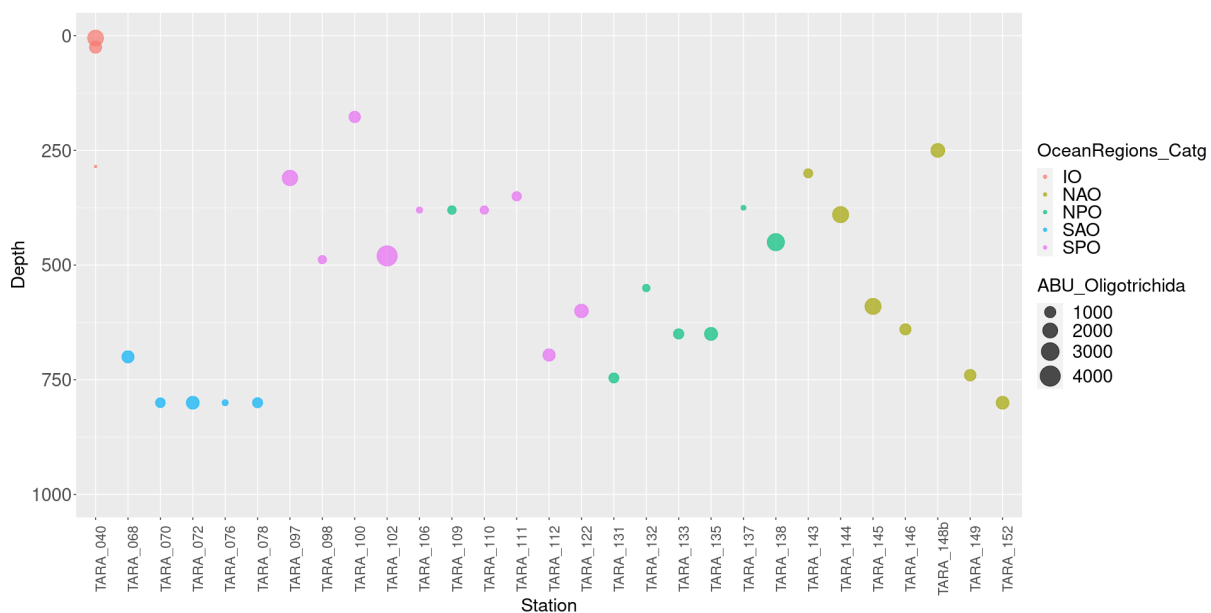


Fig. 13 - (cont.) Abundância da ordem Oligotrichida identificadas nas onze frações de tamanhos operacionais e profundidade no oceano global. **K.** Tamanho: $>3 \mu\text{m}$. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

Tabela 1 - Total de amostras da base de dados onde sequências do filo Ciliophora e da ordem Oligotrichida foram encontradas, dividida por frações de tamanhos operacionais e profundidade. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo; MESO: Mesopelágico

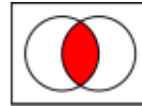
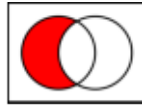
Samples Ciliophora												
Depth	0.22-1.6	0.22-3	0.8-3	0.8-5	0.8-20	3-20	5-20	20-180	180-2000	>0.8	>3	Total Result
SRF	14	43		103	1	23	66	130	133	94	2	609
DCM	12	27	1	57	1	9	35	52	61	33	1	289
MESO	3	35	23	3		10				8	28	110
Total	29	105	24	163	2	42	101	182	194	135	31	1008
Samples Oligotrichida												
Depth	0.22-1.6	0.22-3	0.8-3	0.8-5	0.8-20	3-20	5-20	20-180	180-2000	>0.8	>3	Total Result
SRF	14	43		103	1	23	66	130	109	94	2	585
DCM	12	26	1	57	1	9	35	51	43	33	1	269
MESO	3	35	23	3		10				8	28	110
Total	29	104	24	163	2	42	101	181	152	135	31	964

A ordem Oligotrichida esteve presente em todas as profundidades estudadas, porém na Superfície e DCM a abundância foi maior quando comparada com o Mesopelágico (Fig. 13). Das três profundidades, a mais representada foi a SRF com 585 amostras (Tab. 1). Do total de ASV encontrada na superfície, 831 foram exclusivas quando comparadas com as demais profundidades (representando 67% das ASV da Superfície, Tab. 2, Fig. 14).

Dentro das classificações das frações pico, nano e micro-plâncton, as comunidades foram sequenciadas para até onze frações de tamanhos operacionais (Tab. 1). Algumas frações dos tamanhos pico, nano e micro-plâncton (0.22-3 μm , 0.8-5 μm , 5-20 μm , 20-180 μm , 180-2000 μm e >0.8 μm) corresponderam maiores quantidades de amostras (Tab. 1), que estiveram representadas na maioria das regiões oceânicas coletadas (Tab. 3). Uma das frações do nano (0.8-20 μm) foi coletada apenas no Oceano Índico (2 amostras, Tab. 3). Outra fração de tamanho nano (3-20 μm), foi a mais bem representada no Ártico (37 amostras, Tab. 3). Uma das frações do tamanho pico (0.22-3 μm) foi a melhor distribuída, com uma quantidade de amostras equiparável nas 3 profundidades (Tab. 1).

Por outro lado, algumas frações dos tamanhos pico, nano e micro-plâncton (0.22-1.6 μm , 0.22-3 μm , 0.8-5 μm , 3-20 μm , >0.8 μm e >3 μm), estiveram representadas na superfície, DCM e mesopelágico (Tab. 1).

Tabela 2 - Dados de ASV da ordem Oligotrichida exclusivas e comuns para cada profundidade, frações de tamanho e regiões oceanográficas. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo; MESO: Mesopelágico; AO: Oceânico Ártico , IO: Oceânico Índico, MS:Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.



	Exclusive	Common
SRF	831	
DCM	374	409
MESO	278	
0.22-1.6	42	
0.22-3	292	
>0.8	440	
0.8-20	1	
0.8-3	21	
0.8-5	272	29
180-2000	19	
20-180	77	
>3	128	
3-20	157	
5-20	133	
AO	143	
IO	63	
MS	66	
NAO	96	
NPO	56	66
RS	7	
SAO	55	
SO	28	
SPO	109	

Tabela 3 - Total de amostras da base de dados onde sequências do filo Ciliophora e da ordem Oligotrichida foram encontradas, dividida por frações de tamanhos operacionais e Regiões oceânicas. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

Samples Ciliophora												
Oceans	0.22-1.6	0.22-3	0.8-3	0.8-5	0.8-20	3-20	5-20	20-180	180-2000	>0.8	>3	Total Result
AO		23				37		24	27	29		140
IO	14	7		28	2		12	26	26		3	118
MS	7			23			14	23	25			92
NAO	2	17	8	21		4	11	21	22	23	7	136
NPO		10	6	21			17	20	20	21	7	122
RS	6			4			2	6	6	1		25
SAO		16	2	18			9	14	14	13	5	91
SO		4		7			4	6	7	6		34
SPO		28	8	41		1	32	42	47	42	9	250
Total	29	105	24	163	2	42	101	182	194	135	31	1008
Samples Oligotrichida												
Ocean	0.22-1.6	0.22-3	0.8-3	0.8-5	0.8-20	3-20	5-20	20-180	180-2000	>0.8	>3	Total Result
AO		23				37		24	27	29		140
IO	14	7		28	2		12	26	19		3	111
MS	7			23			14	23	18			85
NAO	2	17	8	21		4	11	20	15	23	7	128
NPO		10	6	21			17	20	14	21	7	116
RS	6			4			2	6	5	1		24
SAO		16	2	18			9	14	13	13	5	90
SO		4		7			4	6	7	6		34
SPO		27	8	41		1	32	42	34	42	9	236
Total	29	104	24	163	2	42	101	181	152	135	31	964

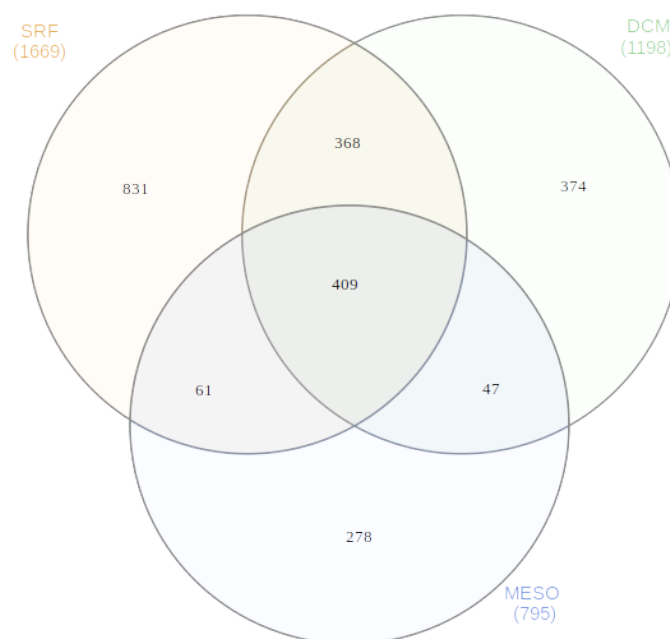


Figura 14 - Diagrama de Venn representando as ASV exclusivas e comuns nas profundidades oceânicas: SRF: Superfície, DCM: Máximo de Clorofila Profundo e MESO: Mesopelágico.

Fonte: <http://www.interactivenn.net/>

Em termos de abundância (número de *reads*), a ordem Oligotrichida esteve melhor representado em algumas frações nas três categorias de tamanhos operacionais (pico, nano e micro-plâncton: 3-20 μm , 0.22-3 μm e $>0.8 \mu\text{m}$) quando comparado aos demais tamanhos amostrados (Fig. 15). As abundâncias da ordem Oligotrichida sobre o total de Ciliophora também foram maiores em algumas frações nas três categorias de tamanhos operacionais (pico, nano e micro-plâncton: 3-20 μm , 0.22-3 μm e $> 0.8 \mu\text{m}$, Fig. 16).

A maior riqueza dentro da ordem Oligotrichida foi observada nas categorias pico e micro-plâncton (0.22-3 μm e $>0.8 \mu\text{m}$) (Fig. 17). E em relação à diversidade (Fig. 18), observamos que uma fração do tamanho pico (0.22-3 μm) apresentou a maior diversidade alfa, acima de 4.0 pelo índice de Shannon, quando comparadas com as demais frações de tamanhos operacionais amostradas.

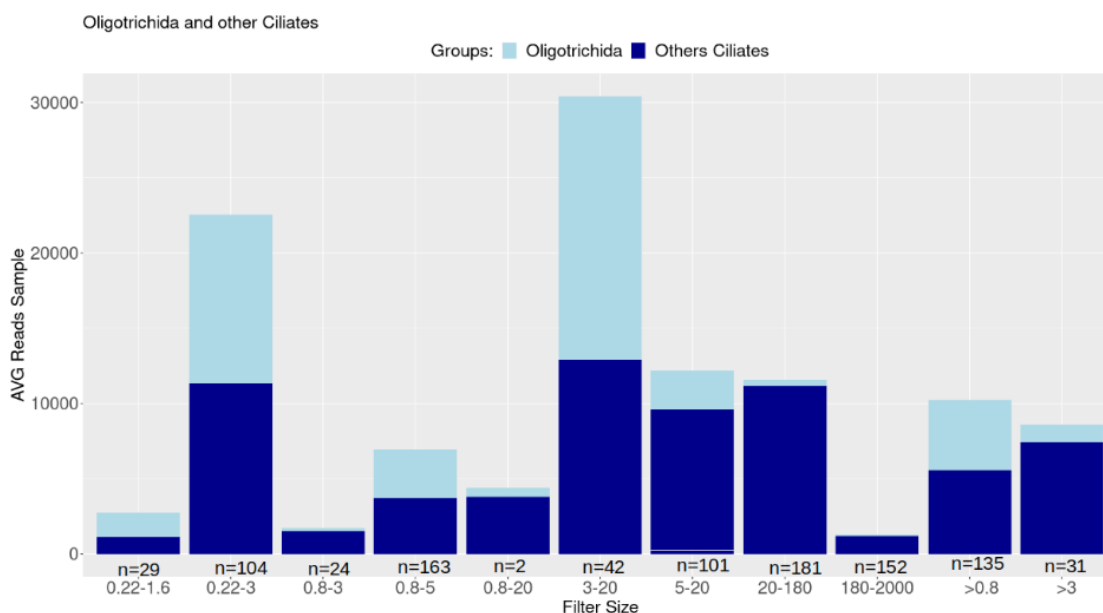


Figura 15 - Representatividade da ordem Oligotrichida em relação aos demais Ciliados por faixas de tamanho e por amostras. n= número de amostras.

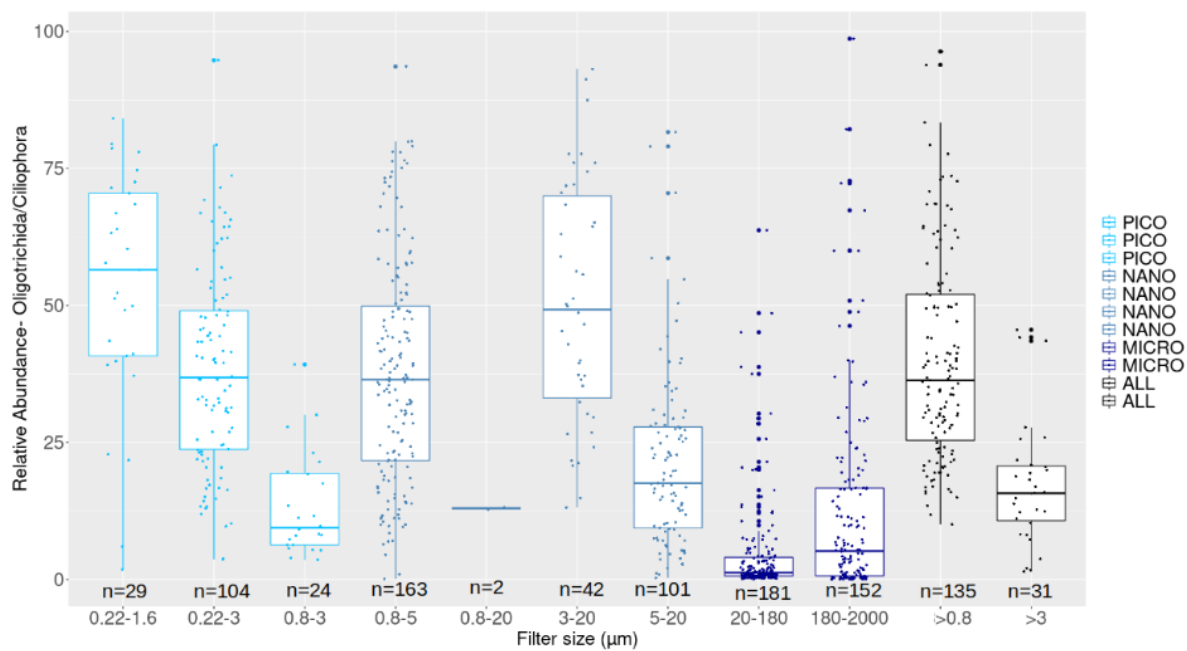


Figura 16 - Abundância relativa da ordem Oligotrichida em relação ao grupo Ciliophora em todas as frações de tamanhos operacionais. n=número de amostras. PICO: pico-plâncton; NANO: nano-plâncton; MICRO: micro-plâncton; ALL: todas as frações.

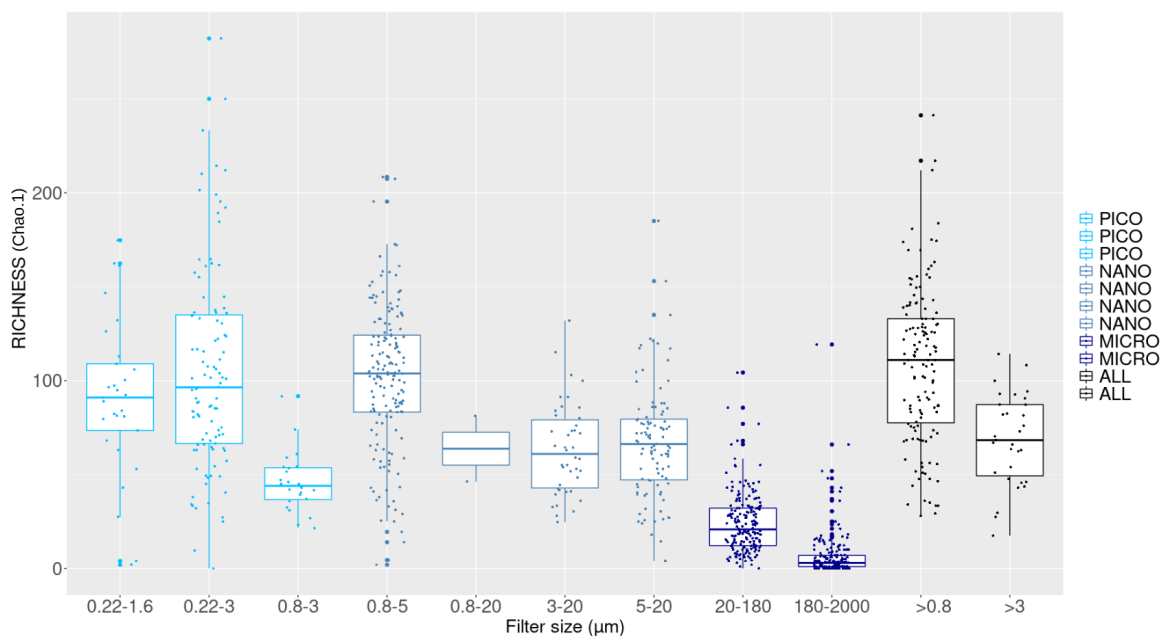


Figura 17 - Riqueza (Chao.1) da ordem Oligotrichida em todas as frações de tamanhos operacionais. PICO: pico-plâncton; NANO: nano-plâncton; MICRO: micro-plâncton; ALL: todas as frações.

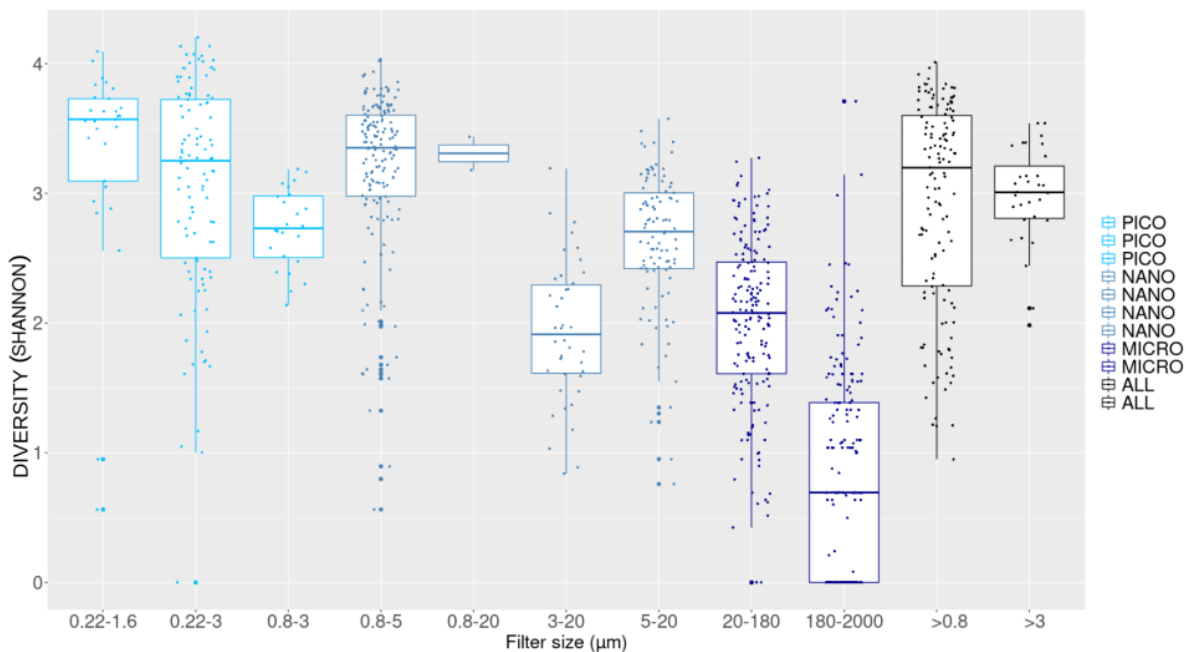


Figura 18 - Diversidade (Índice de Shannon) da ordem Oligotrichida em todas as frações de tamanhos operacionais. PICO: pico-plâncton; NANO: nano-plâncton; MICRO: micro-plâncton; ALL: todas as frações.

O Oceano Pacífico Sul foi a região oceânica mais amostrada com 236 amostras, e o Oceano Ártico como o segundo mais amostrado, com 140 amostras (Tab. 3). O Oceano Ártico apresentou o maior número de ASV exclusivas (143 ASV, 20.8%), e o Oceano Pacífico Sul em segundo lugar, com 109 ASV exclusivas (Tab. 2). O Oceano Ártico apresentou a maior abundância da ordem Oligotrichida entre as regiões oceânicas, principalmente em algumas frações de tamanhos operacionais pico, nano e micro-plâncton (0.22-3 µm, >0.8 µm, 180-2000 µm, 20-180 µm e 3-20 µm, Fig. 13).

4.2 Estudo filogenético da família Strombidiidae e análise de nicho

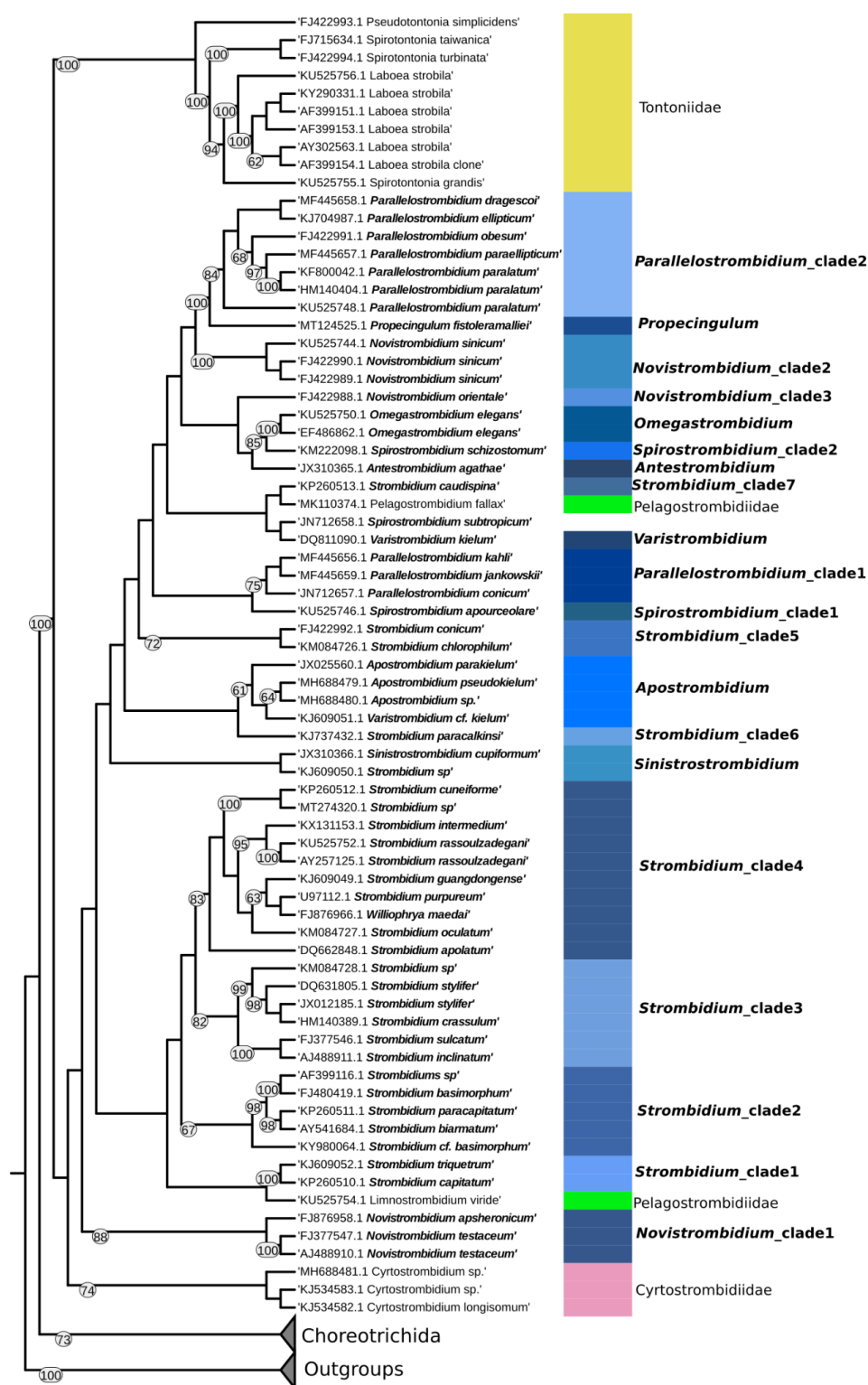
Para o estudo filogenético da família Strombidiidae, primeiramente construímos uma árvore de referência (RT) (Fig. 19) e posteriormente as ASV foram inseridas na RT para aferir sua classificação filogenética. A RT foi construída com 128 sequências do gene 18S rRNA, (fragmentos maiores que

700 pb) selecionadas manualmente de bases de dados públicas. As quatro famílias da ordem Oligotrichida, bem como os principais gêneros da família Strombidiidae, estiveram representados na RT (Fig. 19).

No total, 2563 ASV classificadas dentro da ordem Oligotrichida, foram inseridas na RT (Fig. 20), das quais 99.6% foram atribuídas a diferentes clados da ordem Oligotrichida. Os clados da família Strombidiidae foram os melhores representados na base de dados tanto em termos de abundância, quanto em número de ASV. A Família Tontoniidae foi a segunda família mais abundante, seguido por Cyrtostrombidiidae e Pelagostrombidiidae (Fig. 21). Dos 10 gêneros da família Strombidiidae presentes na RT, 9 estavam representados em nossa base de dados (Fig. 21). Mais de 50% das ASV foram atribuídas ao gênero *Strombidium*, representando 69% do total de *reads* da Família Strombidiidae.

Além disso, os gêneros *Antestrombidium*, *Parallostrombidium* e *Apostrombidium*, representaram mais de um por cento do total de *reads* da Família Strombidiidae (Fig. 21).

Além dos clados definidos na RT, 501 ASV foram agrupadas em 12 clados ambientais, representando 19.5% do total de ASV (Fig. 20). Os distintos clados apresentaram diferentes padrões de distribuição nos ambientes naturais, regiões oceanográficas e profundidades (Fig. 20 e 24).



Subclass Oligotrichia

Order Oligotrichida

Figura 19 - Árvore de referência (RT) de Máxima verossimilhança (ML) da Subclasse Oligotrichia. A árvore foi construída utilizando 128 sequências do gene 18S rRNA coletadas na base de dados GenBank. Os valores de suporte de bootstrap de ML (>60%) estão representados nos nodos. Os clados formados pelas espécies e gêneros da família Strombidiidae estão representados em negrito.

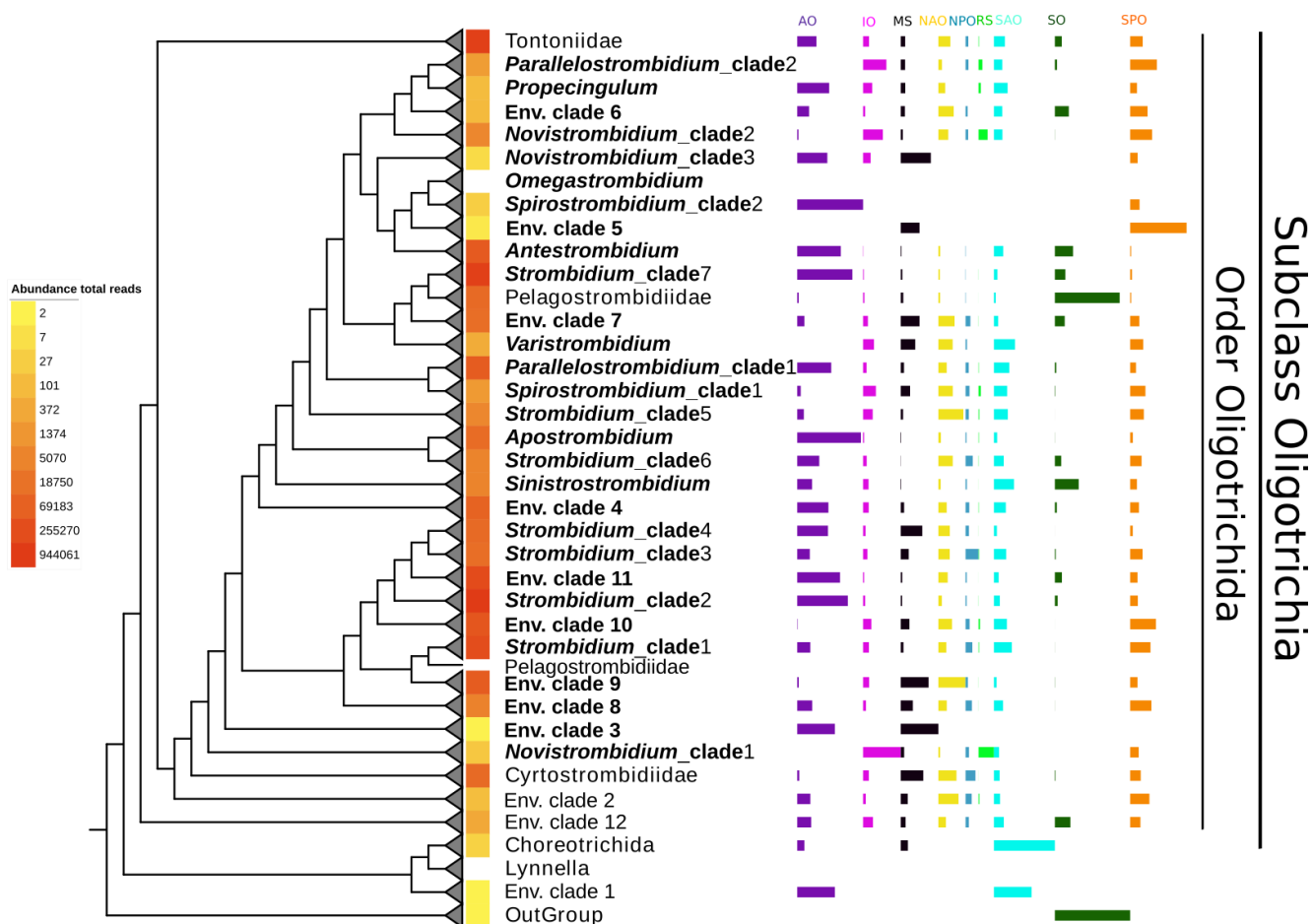


Figura 20 - Designação filogenética das sequências ambientais que foram designadas taxonomicamente dentro da ordem Oligotrichida. Os clados representados em negrito são da família Strombidiidae. A cor dos quadros indicam as abundâncias totais dos clados (em números de reads). As barras de cores indicam a abundância relativa de cada clado por regiões oceânicas (AO: Oceânico Ártico , SO: Oceano Austral, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, SAO: Oceano Atlântico Sul, SPO: Oceano Pacífico Sul, NPO: Oceano Pacífico Norte e RS: Mar Vermelho)

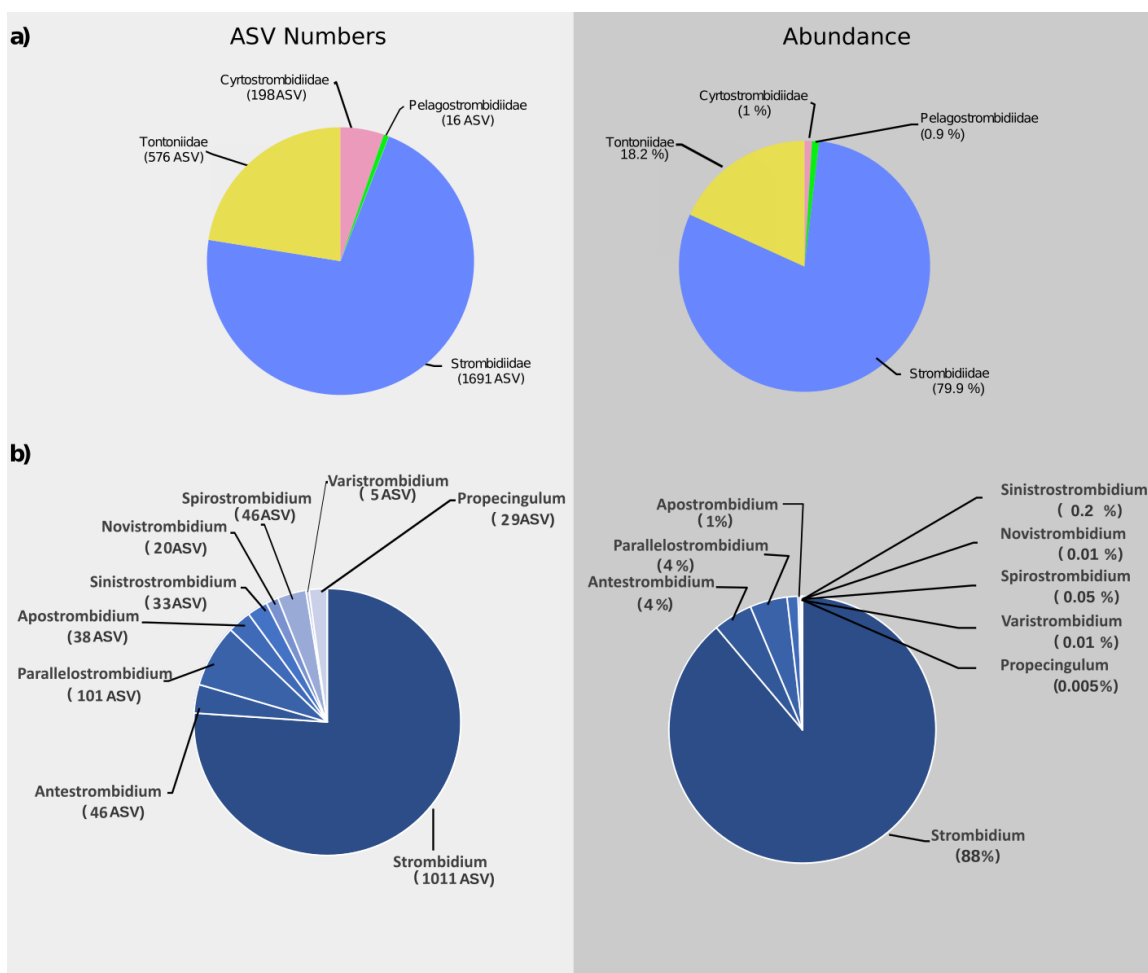


Figura 21 - Números de ASV (painel esquerdo) e abundância (painel direito) das famílias da ordem Oligotrichida (a) e dos gêneros da família Strombidiidae (b).

Gênero *Strombidium* (Claparède and Lachmann, 1859)

Este gênero esteve presente em 7 clados na árvore de referência (Fig. 19). O clado *Strombidium_1* apresentou 2 sequências de *Strombidium* (Bootstrap de 100%) e 162 ASV (9.5% de um total de ASV dos clados de Strombidiidae, Fig. 21). Esse foi um dos mais abundantes representando 7.94 % do total de reads de Strombidiidae. Apresentou uma distribuição cosmopolita no oceano sendo mais abundante no Oceano Pacífico Sul, Oceano Atlântico Sul e Oceano Ártico, com temperaturas ótimas de 1.8 e 16.8 °C, salinidade ótimas de 34.9 PSU e oxigênios ótimos de 234.5 e 363 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Esteve presente nas 3 profundidades (superfície, DCM e mesopelágico), porém foi mais abundante na superfície (Fig. 23).

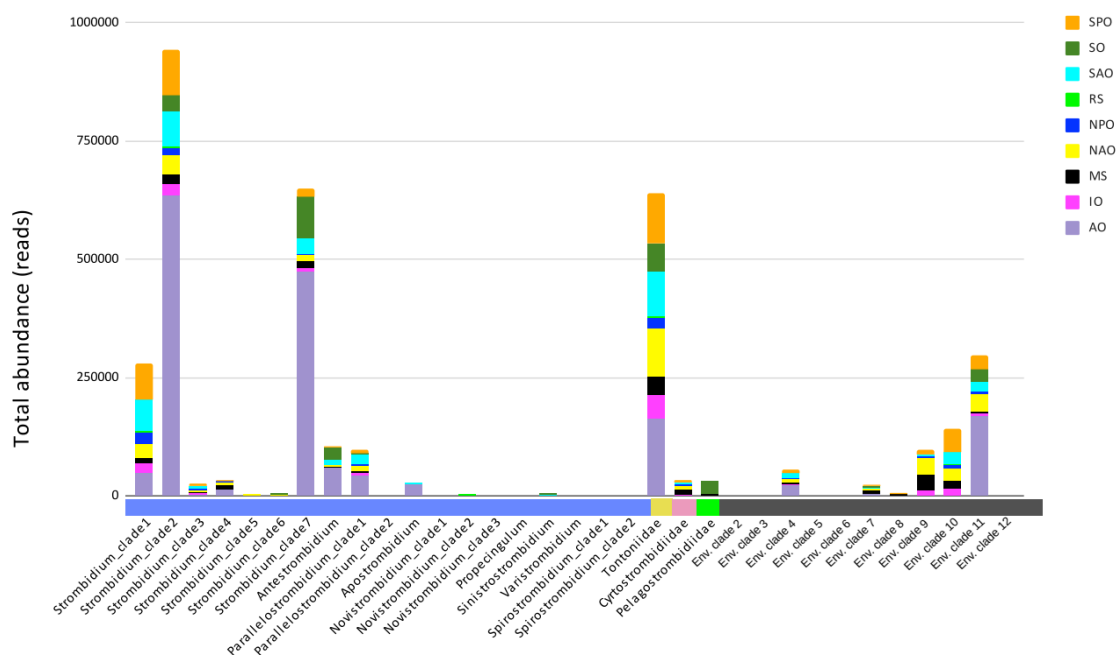


Figura 22 - Abundância dos clados em termos de número de reads em diferentes regiões oceânicas. As cores na barra horizontal indicam os clados das 4 famílias da ordem Oligotrichida assim como os clados ambientais. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

O clado *Strombidium_clade2* apresentou 5 sequências de *Strombidium* (Bootstrap de 67%) e 474 ASV (28% do total de ASV de Strombidiidae, Fig. 21). Este clado foi o mais abundante do gênero (apresentando 33.3% do total de reads dos clados de Strombidiidae). É um clado cosmopolita, porém apresenta uma distribuição mais acentuada no Oceano Ártico, com temperatura ótima de $-1.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade ótima de 33 PSU e oxigênio ótima de $398.3\text{ }\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Esteve presente nas 3 profundidades, porém mais abundante na superfície (Fig. 23).

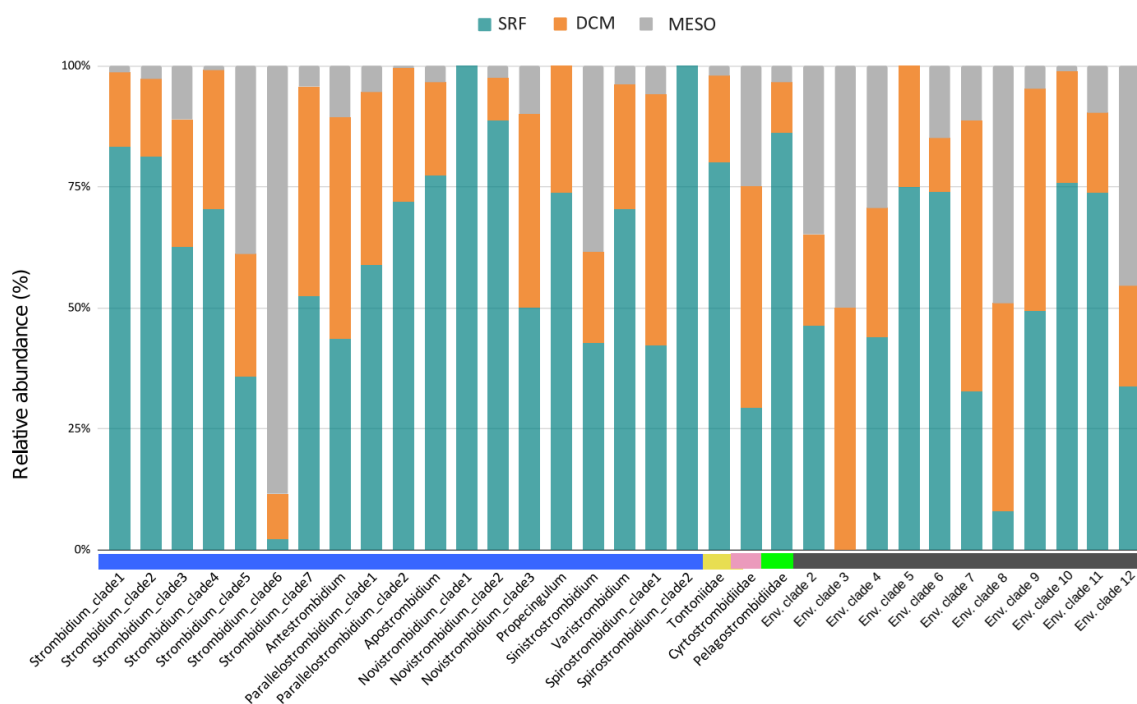


Figura 23 - Abundância relativa dos clados em relação ao número de reads em diferentes profundidades (SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo, e MESO: Mesopelágico). As cores na barra horizontal indicam os clados das 4 famílias da ordem Oligotrichida assim como os clados ambientais.

O clado *Strombidium_clade3* apresentou 6 sequências de *Strombidium*, uma das quais é a espécie-tipo do gênero (*Strombidium sulcatum*) (Bootstrap de 82%) e 103 ASV (6% do total de ASV de Strombidiidae, Fig. 21). Este clado foi pouco abundante (apresentando 0.7% do total de read dos clados de Strombidiidae). É um clado cosmopolita, porém mais presente no Oceano Pacífico Norte com temperatura ótima de 19.2 °C, salinidade ótima de 33.1 PSU e oxigênio ótima de 223.2 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Esteve presente nas 3 profundidades, porém mais abundante na superfície (Fig. 23).

O clado *Strombidium_clade4* apresentou 9 sequências de *Strombidium* e 1 sequência de *Williophrya* (Bootstrap de 83%) e 40 ASV (2.3% de um total de ASV de Strombidiidae, Fig. 20). Este clado foi pouco abundante (apresentando 0.9% do total de read dos clados de Strombidiidae). É um clado cosmopolita, com uma distribuição mais acentuada no Oceano Ártico e Mediterrâneo, assim como apresenta temperaturas ótimas de 2.5 e 20.1 °C, salinidades ótimas de

22.9 e 36.6 PSU e oxigênio ótimo de $375 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Este clado está presente nas 3 profundidades, porém mais abundante na SRF (Fig. 23).

Na RT, o clado *Strombidium_clade5* apresentou 2 espécies de *Strombidium* (Bootstrap de 72%). Trinta e quatro ASV foram designadas para este clado, representando 2.01% de um total de ASV de Strombidiidae (Fig. 21). Foi um clado pouco abundante (0.1% do total de reads dos clados de Strombidiidae), apresentando distribuição cosmopolita, porém mais localizada no Oceano Atlântico Norte com temperaturas ótimas de 9.1 e 17.9 °C, salinidade ótimas de 36.8 PSU e oxigênio ótimos de 5.1 e $189.6 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Esteve presente nas 3 profundidades (Fig. 23), apresentando maior abundância na superfície e mesopelágico.

O clado *Strombidium_clade6* esteve representado por 1 sequência de referência de *Strombidium* e 29 ASV. As ASV neste clado representaram 1.7% de um total de ASV de Strombidiidae. Foi um clado cosmopolita sendo mais abundante no Oceano Ártico, apresentando temperaturas ótimas de 0.4, 1 e 1.2 °C, salinidade ótimas de 34.6 PSU e oxigênio ótimo de 1 e $203.8 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24), embora seja pouco abundante no oceano (0.1% do total de read dos clados de Strombidiidae). Esteve mais abundante no mesopelágico e pouco abundante na superfície e DCM (Fig. 23).

O clado *Strombidium_clade7* apresentou uma sequência de referência de *Strombidium* e 169 ASV, (9.9% do total de ASV de Strombidiidae). Foi um clado abundante (18.5% do total de read dos clados de Strombidiidae) e cosmopolita, porém mais abundante no Oceano Ártico com temperatura ótima de -1.6 °C, salinidade ótima de 34.4 PSU e oxigênio ótimo de $385.9 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Esteve mais abundante na superfície e DCM do que no mesopelágico (Fig. 23). Do total das ASV atribuídas para a família Strombidiidae, 88% foram atribuídas ao gênero *Strombidium* (Fig. 21).

Gênero *Antestrombidium* (Liu *et al.*, 2015b)

Na RT, este gênero esteve representado pela espécie *Antestrombidium agathae* (Fig. 19). Um total de 46 ASV (2.7% de um total de ASV dos clados de Strombidiidae) foram atribuídas nesta espécie formando o clado *Antestrombidium* (Fig. 21). O clado apresentou uma abundância de 2.9% (do total de reads de Strombidiidae) sendo mais abundante no Oceano Ártico com temperatura ótima de -0.4 °C, salinidade ótima de 30.9 PSU e oxigênio ótimo de 334.7 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24), além disso, este clado foi mais abundante na superfície e DCM (Fig. 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 4% (Fig. 21).

Gênero *Parallelostrombidium* (Agatha, 2004a)

Na RT, *Parallelostrombidium* está dividido por 2 clados (Fig. 19). O clado *Parallelostrombidium_clade1* esteve conformado por 3 sequências de referência, suportando com um valor de bootstrap de 75%. Esteve representado por 91 ASV de Strombidiidae (5.38% de um total de ASV de Strombidiidae) representando 2.78% (do total de reads dos clados de Strombidiidae). O clado foi encontrado em todas as regiões oceânicas, porém apresentou uma abundância mais acentuada no Oceano Ártico e Oceano Pacífico Sul com temperaturas ótimas de -1.6, 2.5 e 16.8 °C, salinidade ótima de 30 PSU e oxigênio ótimo de 354.8 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Além disso, foi mais abundante na superfície do que no DCM e mesopelágico (Fig. 23).

O clado *Parallelostrombidium_clade2* foi conformado por 5 sequências de diferentes espécies do gênero (bootstrap 84%). Do total de ASV de Strombidiidae, 10 ASV (0.5% de um total de ASV de Strombidiidae) foram atribuídas a este clado. Foi um clado comparativamente pouco abundante (0.02% do total de reads dos clados de Strombidiidae) estando melhor representado no Oceano Pacífico Sul, com temperatura ótimas de 26.5 °C, salinidade ótima de 37.2 PSU e oxigênio ótimo de 191.1 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$, diferente do clado *Parallelostrombidium_clade1*. (Fig. 20, 22 e 24). Assim como o clado *Parallelostrombidium_clade1*, as maiores abundâncias foram encontradas na

superfície e posteriormente no DCM (Fig. 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 4% (Fig. 21).

Gênero *Apostrombidium* (Xu *et al.*, 2009)

Na RT, este gênero esteve representado em um clado conformado por 3 sequências de *Apostrombidium* entre as quais se encontra a espécie-tipo do grupo, e uma espécie de *Varistrombidium* (bootstrap de 61%) (Fig. 19). Um total de 38 ASV (2.24% de um total de ASV de Strombidiidae) (Fig. 21) foram atribuídas a este clado apresentando uma abundância de 0.8% (do total de reads dos clados de Strombidiidae). Esteve presente em todas as regiões oceânicas, com maior abundância no Oceano Ártico e com temperatura ótima de 1.1 °C, salinidade ótima de 34.7 PSU e oxigênio ótimo de 322.6 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 19, 21 e 23). Além disso, foi mais abundante na superfície do que nas demais profundidades (Fig. 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 1% (Fig. 21).

Gênero *Novistrombidium* (Song e Bradbury, 1998)

Este gênero foi distribuído em três clados na RT (Fig. 19). Duas sequências das espécies *Novistrombidium testaceum* (espécie-tipo do grupo) e uma sequência de *Novistrombidium apsheronicum* se agruparam formando o clado *Novistrombidium_clade1*, um clado basal suportado por um bootstrap de 88%. Este clado esteve representado com um total de 6 ASV (Fig. 22), (0.35% de um total de ASV de Strombidiidae). Apresentou uma abundância de 0.001% (do total de reads dos clados de Strombidiidae) estando mais abundante no Oceano Índico, porém apresentou uma baixa abundância no oceano em modo geral (Fig. 20 e 22), além de estar presente só na superfície (Fig. 23).

O clado *Novistrombidium_clade2* esteve representado por três sequências da espécie *Novistrombidium sinicum*. Um total de 9 ASV (0.5% de um total de ASV de Strombidiidae) foram atribuídos neste clado (Fig. 21). Apresentou uma abundância de 0.11% (do total de reads dos clados de Strombidiidae) estando presente em todas as regiões oceânicas, porém mais abundante no Oceano

Pacífico Sul, com temperatura ótima de 27.6 °C, salinidade ótima de 38.3 PSU e oxigênio ótimo de 188.9 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Este clado foi relativamente mais abundante na superfície, porém também foi encontrado no DCM e mesopelágico (Fig. 23).

O clado *Novistrombidium*_clade3 esteve representado pela espécie *Novistrombidium orientale* e 5 ASV (0.29% de um total de ASV de Strombidiidae). Este clado apresentou uma abundância baixa na base de dados (0.0002%, do total de reads de Strombidiidae), estando melhor representado no Oceano Ártico e Mar Mediterrâneo e na superfície e mesopelágico (Fig. 22 e 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 0.01% (do total de reads dos gêneros de Strombidiidae) (Fig. 21).

Gênero *Sinistrostrombidium* (Liu *et al.*, 2015b)

Na RT este gênero esteve representado por um clado constituído por duas espécies distintas, *Sinistrostrombidium cupiformum* (espécie-tipo do grupo) e *Strombidium* sp. (*bootstrap* <60%) (Fig. 19). Do total de ASV, 33 foram atribuídas a este clado (1.9% do total das ASV de Strombidiidae, Fig. 21).

Este clado apresenta pouca abundância (0.15% do total de reads dos clados de Strombidiidae), tendo sido encontrado em todas as regiões oceânicas, sendo mais abundante no Oceano Austral, com temperatura ótima de 3.9 °C, salinidade ótima de 33.6 PSU e oxigênios ótimos de 191.4 e 392.6 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). O clado foi encontrado em todas as profundidades, porém mais abundantes na superfície e mesopelágico (Fig. 22). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 0.2% (Fig. 21).

Gênero *Varistrombidium* (Xu *et al.*, 2011)

Este gênero esteve representado por 2 sequências de *Varistrombidium* (Fig. 19). Uma das sequências, *Varistrombidium kielum* (espécie-tipo), ficou agrupada com uma sequência de *Spirostrombidium* com baixo valor de bootstrap (<60%). 5 ASV (0.2% do total das ASV de Strombidiidae) foram designadas a esta espécie, formando o clado *Varistrombidium* (Fig.21). A outra sequência deste gênero foi agrupada no clado de *Apostrombidium* com baixo valor de bootstrap (<60%, Fig. 19).

O clado de *Varistrombidium* apresentou uma baixa abundância (0.008%, do total de reads de Strombidiidae) (Fig. 20 e 22), sendo mais encontrado no Oceano Atlântico Sul quando comparado com as demais regiões (Fig. 20). O clado *Varistrombidium* foi mais abundante na superfície, seguido de DCM (Fig. 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 0.01% (Fig. 21).

Gênero *Spirostrombidium* (Xu *et al.*, 2011)

Na RT, este gênero foi distribuído em dois clados: *Spirostrombidium_clade1* e *Spirostrombidium_clade2*, e além destes dois clados, uma sequência agrupou-se com *Varistrombidium kielum*, com baixo valor de suporte (bootstrap <60%) (Fig. 19). Um total de 44 ASV (2.6% do total das ASV dos clados de Strombidiidae, Fig. 21) foram atribuídas nesta espécie formando o clado *Spirostrombidium_clade1* (Fig. 20) e um total de 2 ASV foram atribuídas ao clado *Spirostrombidium_clade2* 0.11% do total das ASV dos clados de Strombidiidae).

O clado *Spirostrombidium_clade1* foi mais abundante (0.03% do total de reads de Strombidiidae) em relação ao clado *Spirostrombidium_clade2* (0.0006% do total de reads dos clados de Strombidiidae) no oceano global (Fig. 20 e 22). *Spirostrombidium_clade1* apresenta uma distribuição em todas as regiões oceânicas, porém apresenta abundância maior no Oceano Pacífico Sul, com temperatura ótima de 21.1 °C, salinidade ótima de 38 PSU e oxigênio ótimo de 209.7 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). Diferente de

Spirostrombidium_clade2 que foi encontrado apenas nas regiões Oceano Ártico e Oceano Pacífico Sul (Fig. 20). *Spirostrombidium_clade1* está mais abundante na superfície e DCM, já *Spirostrombidium_clade2*, presente apenas na superfície (Fig. 23). Do total de gêneros de Strombidiidae, apresentou uma abundância de 0.05% (Fig.21).

Gênero *Omegastrombidium* (Agatha, 2004a)

Na árvore de referência, este gênero esteve representado por duas sequências da espécie *Omegastrombidium elegans* (espécie-tipo do gênero), este é um clado bem suportado com 100% de bootstrap (Fig. 19). Este clado não estava representado em nossa base de dados.

Gênero *Williophrya* (Liu *et al.*, 2011)

Na árvore de referência, este gênero foi encontrado no clado *Strombidium_clade4*, (Fig. 19) com o representante *Williophrya maedai* (espécie-tipo do grupo), porém não apresentou um clado próprio.

Clados ambientais

A classificação filogenética das ASV revelou doze clados ambientais (Env. clade), além dos clados dos principais gêneros (Fig. 20). Onze Env. clades foram atribuídos à ordem Oligotrichida, e um Env. clade foi atribuído a um grupo da subclasse Oligotrichia.

O Env. clade 11 apresentou 179 ASV (10.5% do total das ASV de Strombidiidae, Fig. 21). Foi o Env. clade mais abundante (8.45%, do total de reads dos clados de Strombidiidae) (Fig. 20 e 22), estando presente em todas as regiões oceanográficas, sendo mais abundante no Oceano Ártico com temperatura ótima de 1.9 °C, salinidade ótima de 28.6 PSU e oxigênio ótimo de 336.2 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24), na superfície em relação às demais profundidades (Fig. 23). Este clado está relacionado com clados de *Strombidium* e o clado Env. clade 10.

O clado Env. clade 10 (25 ASV, 1.4% do total das ASV dos clados de Strombidiidae, Fig. 21), também é um clado abundante (4%, do total de reads dos clados de Strombidiidae) (Fig. 20 e 22). Foi mais abundante no Oceano Pacífico Sul com temperatura ótima de 19.1 °C, salinidade ótima de 36.6 PSU e oxigênio ótimo de 230.6 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24) mais abundante na superfície do que nas demais profundidades (Fig. 23).

O Env. clade 9 apresentou 56 ASV (3.3% do total das ASV dos clados de Strombidiidae, Fig. 21), também relacionado com o clado *Strombidium*_clade1 (Fig. 20 e 22). Foi o terceiro mais abundante (2.7% do total de reads dos clados de Strombidiidae) (Fig. 20 e 22). Foi mais abundante no Mediterrâneo com temperatura ótima de 14.1 °C, salinidade ótima de 38.4 PSU e oxigênio ótimo de 213.4 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24). E está mais abundante na superfície e DCM (Fig. 23)

O Env. clade 4 foi o clado mais distante do gênero *Strombidium*, apresentou 19 ASV (1.1% do total das ASV de Strombidiidae, Fig. 21), e teve uma abundância de 2.7% (do total de reads dos clados de Strombidiidae) (Fig. 20 e 22) estando melhor representado no Oceano Ártico na temperatura ótima de -1.6 °C, salinidade ótima de 30.2 PSU e oxigênio ótimo de 311.4 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Fig. 20, 22 e 24) além de estar presente nas três profundidades, sendo mais abundante na superfície (Fig. 23).

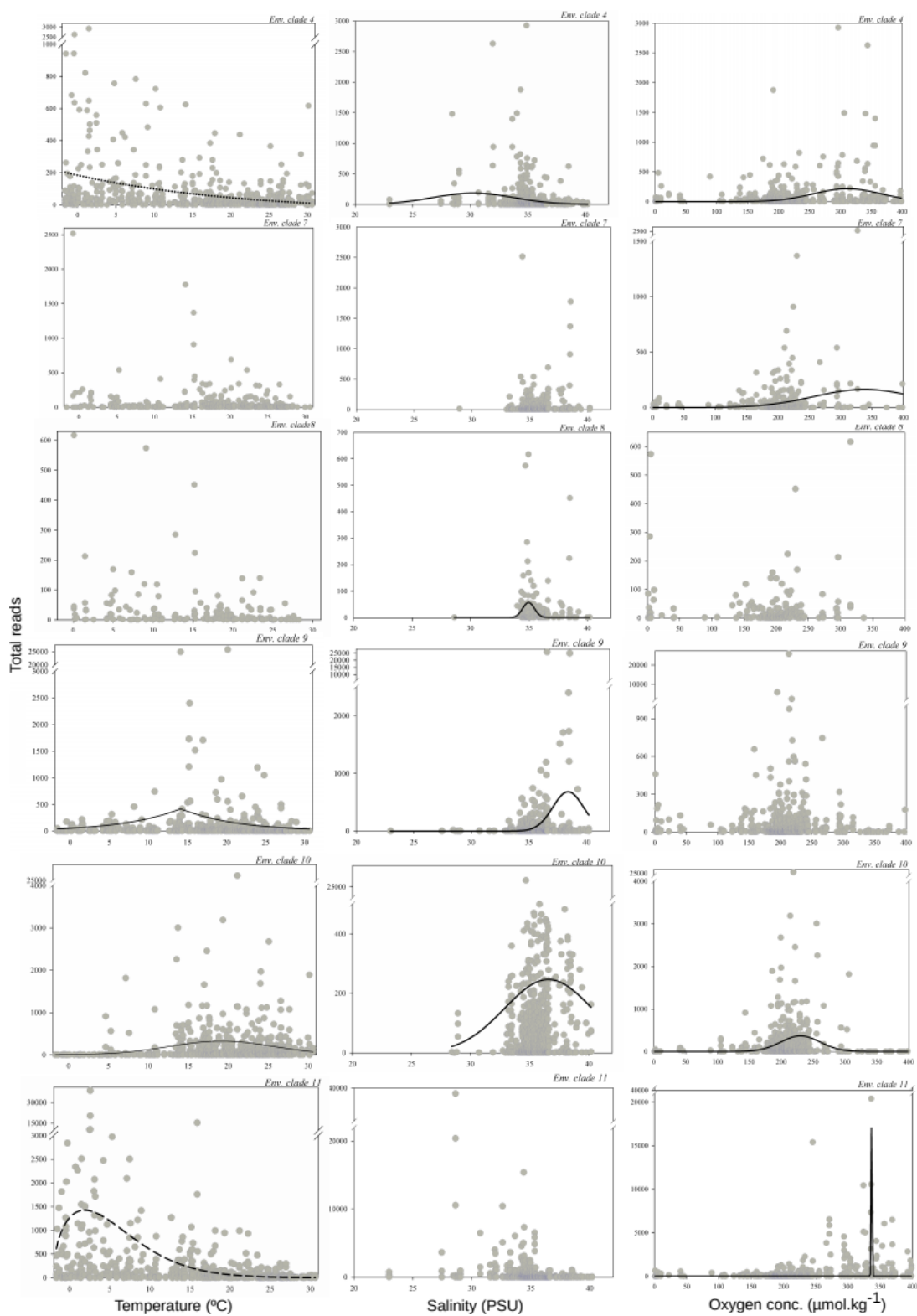


Figura 24 - Distribuição dos clados (em termos de abundância total de reads por amostras) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian), linhas com pontilhado representa a curva pela equação Exponential Decay(Double) e linha com traços largos representa a curva pela equação Peak (Weibull).

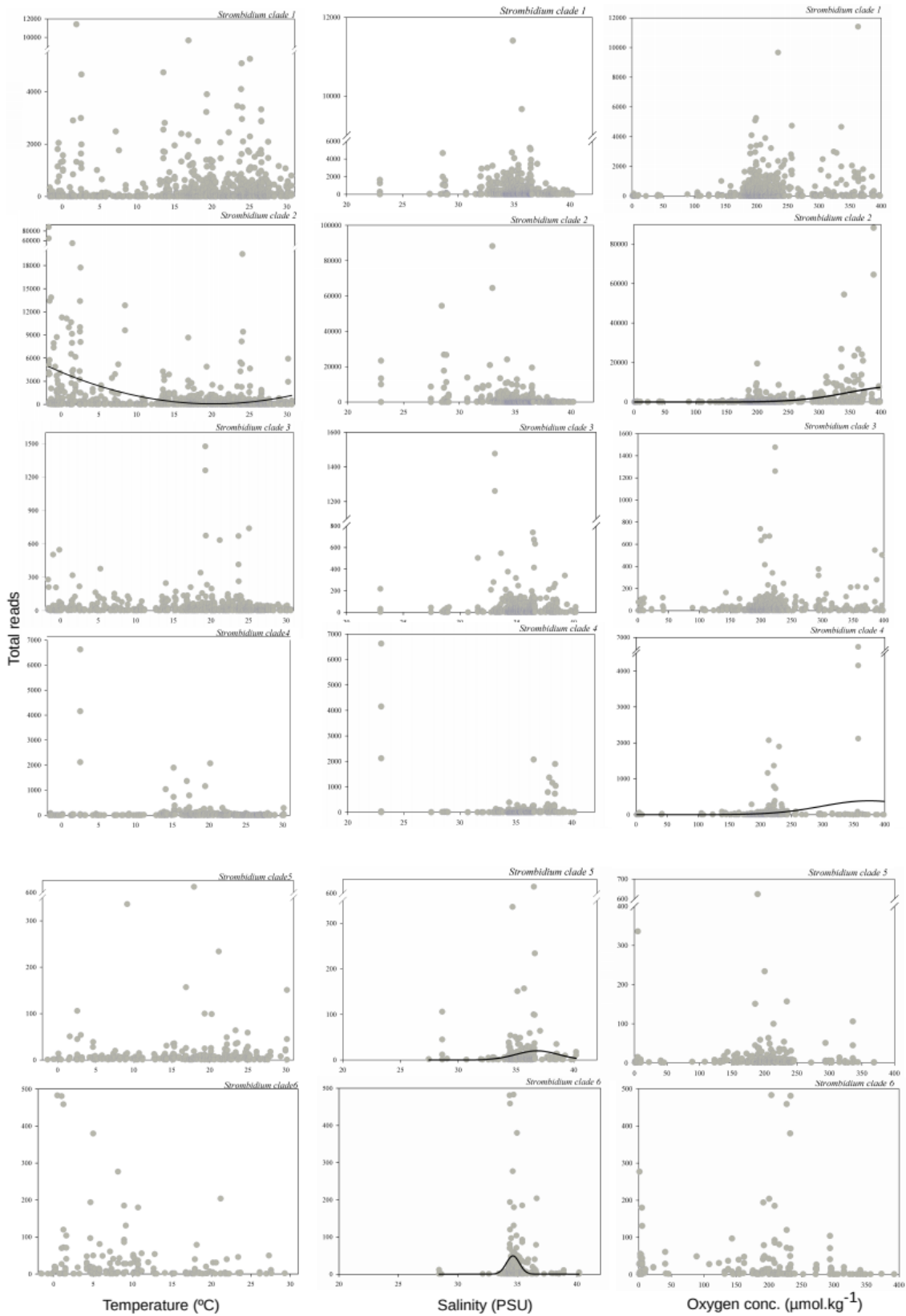


Figura 24 - (cont) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian).

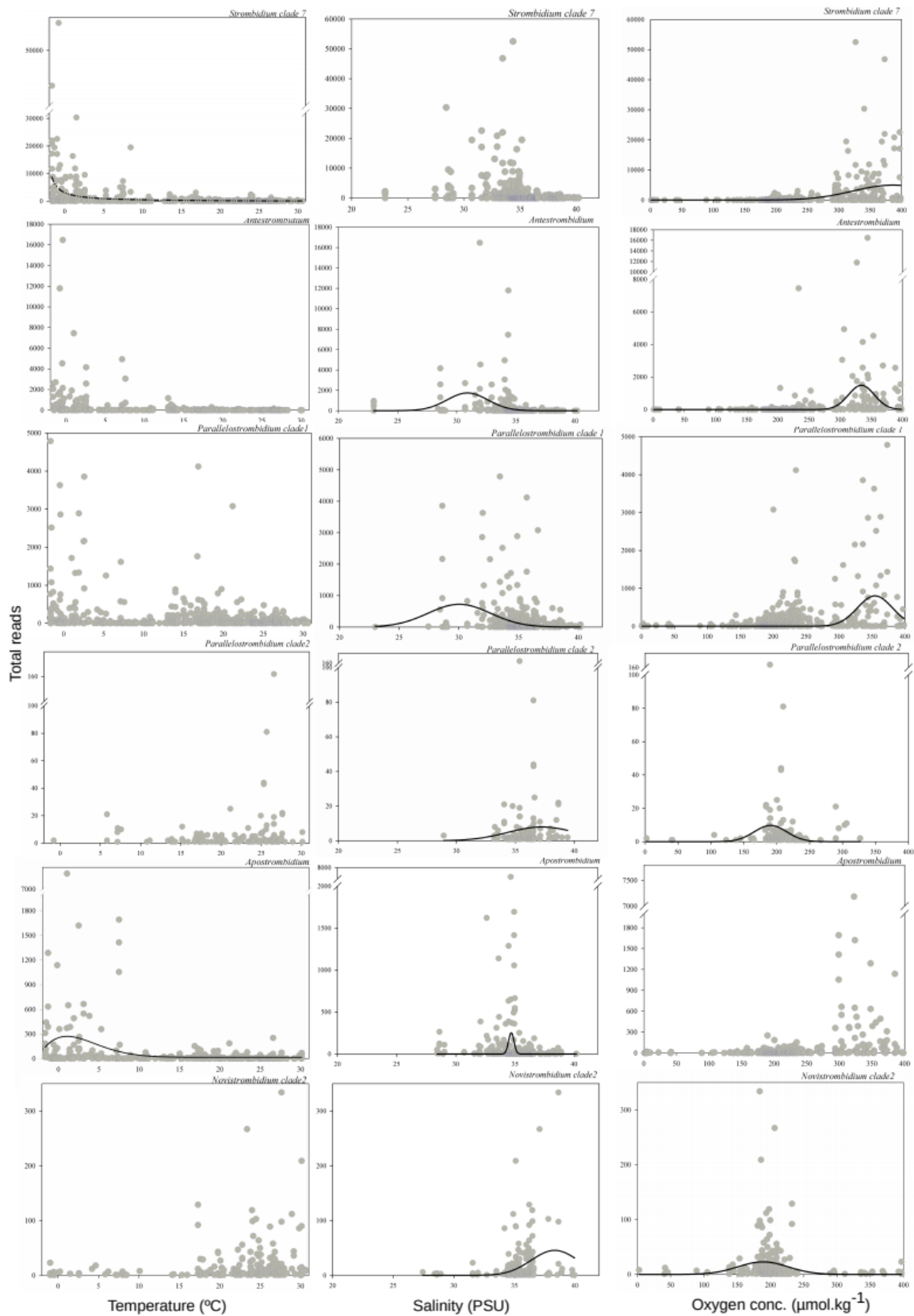


Figura 24 - (cont) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian), linhas com pontos e traços representam curva pela equação Rational.

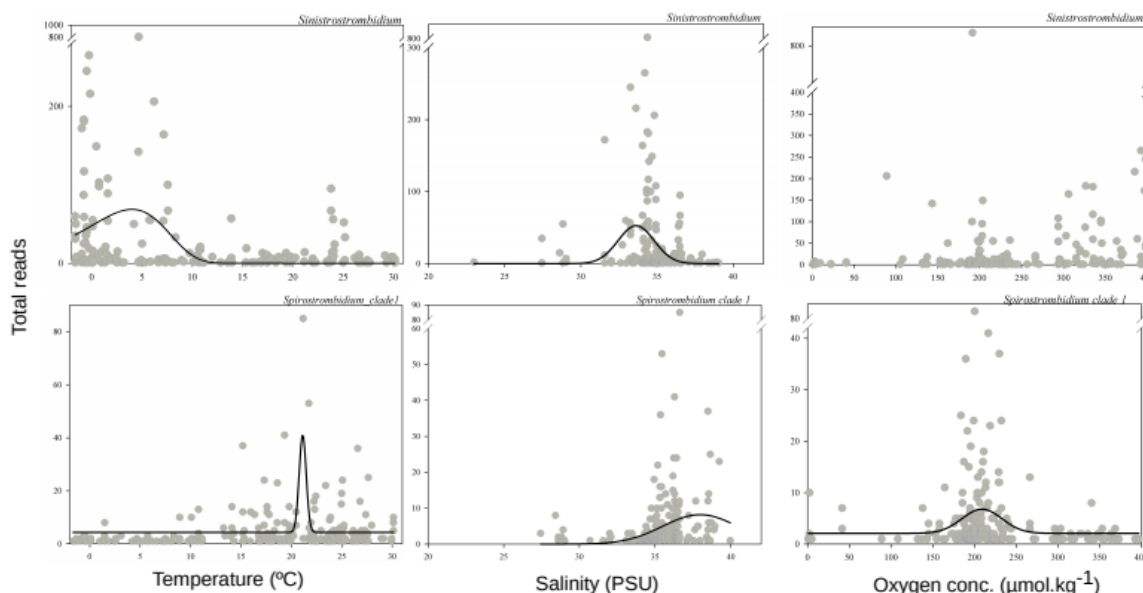


Figura 24 - (cont) Distribuição das ASV por clados (em termos de abundância relativa de reads) para diferentes temperaturas, salinidades e oxigênio. Linhas inteiras representam curvas pela equação Peak (Gaussian).

5. Discussão

Os resultados da distribuição da ordem Oligotrichida evidenciaram que essa ordem se encontra presente em todas as regiões oceânicas, confirmando a sua extensa distribuição no oceano global (Luo *et al.*, 2009; Canals *et al.*, 2020). Trabalhos anteriores reportaram influência limitada da região oceânica na composição da comunidade de ciliados (Snyder *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2009; Terrado *et al.*, 2009), mas nosso estudo mostrou que existe um número elevado de ASV exclusivas de cada região oceanográfica. Particularmente o Oceano Ártico apresentou o maior número de sequências exclusivas em relação às demais regiões.

As temperaturas extremamente baixas, assim como as fortes variações de salinidades pela influência da água doce escoada através dos rios glaciais, fazem do Oceano Ártico um sistema muito particular, com redes ecológicas muito particulares e separadas do resto dos oceanos (Chaffron *et al.*, 2021; Hop *et al.*, 2002). Assim, essas características ambientais poderiam levar a

seleção de espécies com adaptação a baixas temperaturas e salinidade relativamente baixa. No outro extremo polar, o Oceano Austral apresentou poucas sequências exclusivas, diferente de trabalhos anteriores que evidenciaram uma maior diferenciação da comunidade da classe Oligotrichea (Agatha *et al.*, 2011, Canals *et al.*, 2020). No entanto, cabe ressaltar que em nossa base de dados havia poucas amostras dessa região, o que poderia explicar esses resultados.

O estudo da distribuição vertical da ordem Oligotrichida revelou que esta ordem, apesar de ser mais abundante na superfície, pode ser encontrada em toda a coluna d'água. Este resultado coincide com outros estudos que reportaram a presença de Ciliados desde a superfície até o batipelágico. Particularmente, Canals e colaboradores (2020), estudaram a diversidade de Ciliophora em diferentes profundidades e regiões oceanográficas, e encontraram que aproximadamente 30% da abundância total de ciliados no mesopelágico e batipelágico está representada pela ordem Oligotrichida. Em concordância com trabalhos anteriores das comunidades de Ciliophora, nosso trabalho mostrou uma clara diferenciação da composição de ASV da ordem Oligotrichida com a profundidade (Grattepanche *et al.*, 2015, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Foi na superfície onde as maiores ASV exclusivas foram encontradas. Estes resultados podem ser o reflexo de um maior número de amostras na superfície em nossa base de dados. Outra possível explicação é que a superfície do oceano é mais heterogênea em suas condições ambientais quando comparadas ao oceano profundo (Villarino *et al.*, 2018; Ruiz-González *et al.*, 2019). Assim, na superfície poderiam se desenvolver comunidades mais diversas com espécies exclusivas, que não conseguem colonizar outras regiões da coluna d'água.

Em relação a presença dos Oligotrichidas nas diferentes frações de tamanhos operacionais, nossos resultados indicaram a presença das sequências desta subclasse no pico, nano, bem como, no micro-plâncton. Embora seja bem conhecido que os ciliados são maiores do que as frações pico e nano-plâncton, com a incorporação das técnicas de sequenciamento massivo, sequências de Ciliophora são repetidamente reportadas nestas frações de tamanho (Montagnes *et al.*, 1988, de Vargas *et al.*, 2015;

López-García *et al.*, 2001; Not *et al.*, 2009; Canals *et al.*, 2020). Várias hipóteses foram propostas para explicar estes resultados, e a explicação mais aceita é que estas sequências são na realidade artefatos da filtração. A ordem Oligotrichida apresenta um corpo nú e flexível, e durante a filtração, as células podem ser quebradas ou deformadas permitindo que passem pelos poros filtrantes (Canals *et al.*, 2020; Terrado *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2008). Adicionalmente, a maior diversidade e riqueza da ordem Oligotrichida foi encontrada na fração pico. Esse resultado concorda com o reportado por Canals *et al.* (2020), aportando uma nova evidência que as sequências obtidas dos filtros com poros de pequenos tamanhos, representam informações úteis para o estudo da diversidade e composição da comunidade de ciliados marinhos.

A árvore filogenética de referência (RT) apresentou uma topologia similar a outras árvores publicadas na literatura, com os clados agrupando-se por gênero (Song *et al.*, 2021; Fenfen *et al.*, 2020). A RT apontou evidências de que a família Strombidiidae e os gêneros *Strombidium* e *Spirostrombidium* são polifiléticos (Song *et al.*, 2020, 2021; Li *et al.*, 2013). E que os gêneros *Parallelostrombidium* e *Novistrombidium* não são monofiléticos (Liu *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2018; Küppers *et al.*, 2019).

A análise filogenética das sequências do gene 18S rRNA revelou que a Strombidiidae foi a família mais representada na base de dados, apresentando um total de 29 clados validados com altos valores estatísticos. Os principais clados descritos em estudos anteriores foram representados (Xu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013, Agatha e Strüder-Kypke, 2014; Liu, *et al.*, 2015b; Küppers, *et al.*, 2019; Fenfen *et al.*, 2020; Song, *et al.*, 2021), mas também foram identificados 9 novos clados conformados exclusivamente por sequências ambientais. Este resultado revela uma grande diversidade de Strombidiidae ainda desconhecida, expandindo o conhecimento da biodiversidade das comunidades planctônicas do oceano global.

Strombidium foi o gênero mais diverso filogeneticamente, agruparam-se em um total de 7 clados distintos. Os clados apresentaram diferentes padrões de distribuição no oceano global, assim como na coluna d'água, indicando que

essas diferenças filogenéticas refletiram diferenças nas características ecológicas dos diferentes clados.

Os clados *Strombidium_clade2*, *Strombidium_clade7* compartilharam um padrão similar de distribuição sendo mais abundante no Oceano Ártico. Os clados *Strombidium_clade1* e *Strombidium_clade2* são clados já definidos anteriormente por outros autores (Song *et al.*, 2021). *Strombidium_clade2* esteve representado por *Strombidium basimorphum*, *Strombidium paracapitatum* e *Strombidium biarmatum*. Essas espécies têm em comum a presença morfológica de dois tipos de extrussomos, diferente dos demais Strombidiídeos que apresentam apenas um (Song *et al.*, 2021), e foram previamente relatados no Pacífico Norte (*S. basimorphum* e *S. paracapitatum*) e no Mar Mediterrâneo (*S. biarmatum*). *Strombidium_clade1* esteve representado pelas espécies *S. triquetrum* e *S. capitatum* que foram relatadas em diferentes estações costeiras do Pacífico Norte (costa da China) (Song *et al.*, 2021). Por fim, *Strombidium_clade7* esteve representado pela espécie *S. caudispina*, espécie descrita pela primeira vez no Pacífico Norte, na costa da China (Song *et al.*, 2021). Assim, nosso estudo mostra uma distribuição mais ampla desses clados no oceano global.

O clado *Strombidium_clade4* foi um clado bem representado em nossa base de dados, presente em todas as regiões oceanográficas. O clado *Strombidium_clade4* é representado por várias espécies de *Strombidium* (*S. apolatum*, *S. rassoulzadegani*, *S. oculatum*, *S. purpureum*, *S. guangdongense*, *S. cuneiforme*) que já foram descritas em trabalhos anteriores como sendo o “clado da mancha ocular”, já que todos estes organismos apresentam uma mancha ocular, conhecida como ocelo (Liu *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2021). O ocelo é formado por um grupo de células fotossensíveis, através da qual os organismos podem perceber a luz mas não formar imagens, isto poderia explicar porque este clado foi relativamente mais abundante na superfície e DCM em comparação com o Mesopelágico.

O gênero *Parallelostrombidium* também foi um dos gêneros mais bem representados no nosso banco de dados. Em nosso trabalho, *Parallelostrombidium* esteve representado em dois clados distintos já reportados na bibliografia (Song *et al.*, 2021). A separação destes clados tem

um suporte morfológico relacionados à diferenças na forma celular e nos padrões ciliares somáticos (Song *et al.*, 2018, 2021). Nosso trabalho mostrou que esses clados apresentam padrões de distribuição diferentes: *Parallelostrombidium_clade1* foi mais abundante no Oceano Ártico e Oceano Pacífico Sul e em águas mais frias (-1.6, 2.5 e 16.8 °C, Fig. 25), já *Parallelostrombidium_clade2* apresentou maior distribuição no Oceano Pacífico Sul e em águas mais quentes (26.5 °C, Fig. 25). Assim, esses resultados podem estar indicando que diferenças na morfologia têm grande influência na ecologia das espécies de *Parallelostrombidium*.

Em concordância com estudos anteriores, os gêneros *Varistrombidium* e *Apostrombidium* apresentaram uma estreita relação no RT (Gao *et al.*, 2016). Estes resultados foram atribuídos às similaridades na morfologia que poderiam ter uma origem evolutiva: compartilham uma divisão dorsal da cintura cinécia e cílios longos no lado dorsal (Agatha, 2011; Agatha e Strüder-Kypke, 2014, Song *et al.*, 2013, 2021; Gao *et al.*, 2016).

Os clados do gêneros *Parallelostrombidium* (*Parallelostrombidium_clade2*) e *Novistrombidium* (*Novistrombidium_clade2*) foram reportados próximos na nossa RT em concordância com estudos anteriores (Liu *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2021). Os ótimos ambientais destes clados foram similares, o que estaria corroborando o fato de coexistirem. Porém, estes clados apresentam diferenças morfológicas, principalmente nas estruturas ciliares. O gênero *Novistrombidium* apresenta uma cinta cinécia incompleta, já o gênero *Parallelostrombidium* apresenta uma cinta cinécia dextralmente espiralada (Agatha, 2004a; Song e Bradbury, 1998; Song *et al.*, 2021).

Os clados Env. clade 4, Env. clade 11, *Strombidium_clade2*, *Strombidium_clade4*, *Strombidium_clade7*, *Antestrombidium* e *Apostrombidium* apresentaram nichos ótimos em temperaturas baixas e em condições de oxigênio elevados que foram predominantes no Oceano Ártico. Uma possível explicação da alta abundância de ciliados em ambientes de frio e oxigênio extremos é a ação do gene En-MsrB, que desempenha um papel central no mecanismo genético, permitindo que os ciliados consigam adaptar-se a estes ambientes polares (Luo *et al.*, 2009; Marquardt *et al.*, 2016; Ricci *et al.*, 2017).

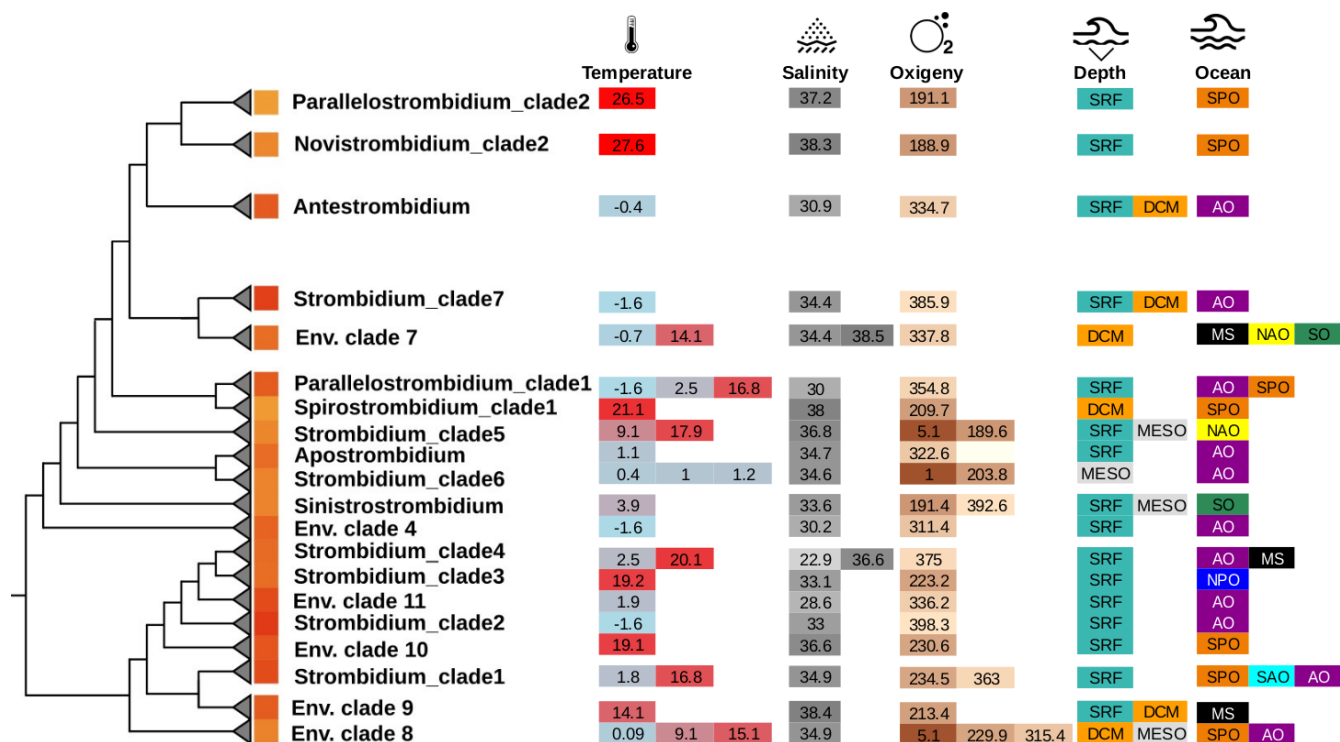


Figura 25 - Árvore filogenética da família Strombidiidae mostrando os 20 clados definidos neste trabalho. Para cada clado, foram indicados os valores ótimos para temperatura, salinidade, oxigênio assim como as profundidade e oceano onde se registraram as maiores abundâncias. SRF: Superfície, DCM: Máximo de clorofila profundo, e MESO: Mesopelágico. AO: Oceânico Ártico, IO: Oceânico Índico, MS: Mar Mediterrâneo, NAO: Oceano Atlântico Norte, NPO: Oceano Pacífico Norte, RS: Mar Vermelho, SAO: Oceano Atlântico Sul, SO: Oceano Austral e SPO: Oceano Pacífico Sul.

Os clados *Strombidium_clade5*, *Strombidium_clade6* e Env. clade 8 apresentaram grandes abundâncias em níveis baixos de oxigênio. Estudos anteriores mostraram que espécies dentro destes clados apresentam uma resistência a ambientes com baixa concentração de oxigênio (Bernard e Fenchel (1996). Especificamente o Env. clade 8 é mais abundante no Oceano Pacífico Sul, onde ocorrem zonas de ressurgência que são afetadas por uma zona mínima de oxigênio (Escribano, 2006). Essas condições de baixo oxigênio em águas abertas constituem ambientes pelágicos únicos com a presença de microorganismos que resistem a estas condições (Ulloa *et al.*, 2006).

6. Conclusão

Este é o primeiro trabalho que descreve a distribuição dos diferentes clados e gêneros da família Strombidiidae no oceano global em distintas profundidades.

Foi encontrada maior diversidade na profundidade SRF, nas frações de tamanho PICO e no Oceano Ártico. E foi encontrado menor diversidade na profundidade MESO, nas frações de tamanho MICRO e no Mar Vermelho.

A informação molecular obtida dos filtros com poros de pequenos tamanhos foi suficiente para o estudo da diversidade e composição da comunidade de ciliados marinhos.

Mediante a construção de uma árvore de referência da ordem Oligotrichida utilizando o gene 18S rRNA, foi possível a classificação de ASV do grupo da família Strombidiidae no oceano global.

O gênero *Strombidium* foi o mais abundante da família e mais diverso filogeneticamente. Os resultados sugerem que este gênero deveria ser revisto, pois alguns clados deste gênero apresentam uma distribuição filogenética e ecologia muito distintas.

Na classificação filogenética das ASVs encontramos 12 novos clados, refletindo a grande diversidade do grupo ainda desconhecida.

A temperatura e a salinidade resultaram em parâmetros muito importantes que afetam a distribuição da família Strombidiidae. No cenário de aquecimento global, o aumento das temperaturas polares poderá afetar a distribuição destas espécies no oceano.

Referências

ADL, S.M., et al. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v. 66, p. 4-119, 2018 doi:10.1111/jeu.12691

AGATHA, S.; RIEDEL-LORJÉ, J.C. Morphology, infraciliature, and ecology of halteriid and strombidiid (Ciliophora, Oligotrichea) from coastal brackish water basins. **Archiv für Protistenkunde** v.148, n.4, p. 445–459, 1997 doi:10.1016/s0003-9365(97)80021-8

AGATHA, S. Evolution of ciliary patterns in the Oligotrichida (Ciliophora, Spirotricha) and its taxonomic implications. **Zoology** v.107, n.2, p.153–168, 2004a doi:10.1016/j.zool.2004.02.003

AGATHA, S. A Cladistic Approach for the Classification of Oligotrichid Ciliates (Ciliophora: Spirotricha). **Acta Protozoologica** v.43, n.3, p.201-217, 2004b PMID: 20396404; PMCID: PMC2854820.

AGATHA, S. Global Diversity of Aloricate Oligotrichea (Protista, Ciliophora, Spirotricha) in Marine and Brackish Sea Water. **PLoS One** v.6, n.8, e22466. 2011 doi:10.1371/journal.pone.0022466

AGATHA, S.; STRÜDER-KYPKE, M. C. What morphology and molecules tell us about the evolution of Oligotrichea (Alveolata, Ciliophora). **Acta Protozoologica** v.53, n.1, p.77–90, 2014 doi:10.4467/16890027AP.14.008.1445

ALBERTI, A., et al. Viral to metazoan marine plankton nucleotide sequences from the Tara Oceans expedition. **Scientific Data** v.4, p.170093, 2017 <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.93>

ALTSCHUL, S. F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** v.215, n.3, p.403–410, 1990 doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

AZAM, F., et al. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. **Marine Ecology Progress Series** v.10, p.257–263, 1983 <https://doi.org/10.3354/meps010257>

BERGER, S. A.; STAMATAKIS, A. Aligning short reads to reference alignments and trees. **Bioinformatics** v.27, n.15, p.2068–2075, 2011 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr320>

BERGER, S. A., KROMPASS, D., STAMATAKIS, A. Performance, accuracy, and web server for evolutionary placement of short sequence reads under maximum likelihood. **Systematic Biology** v.60, n.3, p.291–302, 2011 <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr010>.

BERNARD, C.; FENCHEL, T. Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes, **European Journal of Protistology** v.32, n.3, p.293–297, 1996 doi:10.1016/s0932-4739(96)80051-4

BOSCARO, V., et al. EukRef-Ciliophora: a manually curated, phylogenybased database of small subunit rRNA gene sequences of ciliates **Environmental Microbiology** v.20, n.6, p.2218–2230, 2018 doi:10.1111/1462-2920.14264

CALLAHAN, B. J., et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** v.13, n.7, p.581–583, 2016 doi: 10.1038/nmeth.3869

CANALS, O., et al. Ciliate diversity and distribution across horizontal and vertical scales in the open ocean. **Molecular Ecology** v.29, n.15, p.2824-2839, 2020. doi:10.1111/mec.15528

CARON, D.A., et al. Marine Protistan Diversity **Annual Review of Marine Science** v.4, n.1, p.467-493, 2012 DOI: [10.1146/annurev-marine-120709-142802](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802)

CHAFFRON, S., et al. Environmental vulnerability of the global ocean epipelagic plankton community interactome. **Science Advances** v.7, n.35, eabg1921, 2021. DOI:10.1126/sciadv.abg1921

CHEUNG, M. K., et al. Genetic diversity of picoeukaryotes in a semienclosed harbour in the subtropical western Pacific Ocean. **Aquatic Microbial Ecology**, v.53, n.3 p.295–305, 2008. doi: 10.3354/ame01247

COUNTWAY, P. D., et al. Protistan Diversity Estimates Based on 18S rDNA from Seawater Incubations in the Western North Atlantic. **The Journal of General and Applied Microbiology** v.52, n.2, p.95–106, 2005. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.05202006.x

CORLISS, J. O. ; Snyder, R. A. A preliminary description of several new ciliates from the Antarctica, including *Cohnilembus grassei* n. sp. **Protistologica** v.22, n.1, p.39–46, 1986.

DE VARGAS, C., et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. **Science**, v.348, n.6237, p.1261605-1261605, 2015
doi:10.1126/science.1261605

ESCRIBANO, R. Zooplankton interactions with the oxygen minimum zone in the eastern south pacific. **Gayana (Concepción)**, v. 70, p. 19–21, 2006.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382006000300005>

FENCHEL, T. The microbial loop – 25 years later. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** v.366, n.1-2, p.99–103, 2008.
doi:10.1016/j.jembe.2008.07.013

FENFEN, L., F.; et al. Taxonomy and Phylogeny of a New Marine Planktonic Ciliate, *Strombidium pseudorapulium* sp. n. (Protozoa, Ciliophora, Oligotrichia). **Journal of Ocean University of China** v.19, n.4, p.954–960, 2020
doi:10.1007/s11802-020-4402-8

FLORENTIN, R. Description de deux infusoires ciliés nouveaux des mares salées de Lorraine suivie de quelques considerations. **Annales des Sciences Naturelles: Zoologie archives**, v.12, p.343–363, 1901.

FOISSNER, W. An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_1, p. 271–292, 2014.

GAO, F., et al. Multi-gene-based phylogenetic analysis of oligotrich ciliates with emphasis on two dominant groups: Cyrtostrombidiids and strombidiids (Protozoa, Ciliophora). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 105, p. 241–250, 2016.

GIMMLER, A.; KORN, R.; DE VARGAS, C.; AUDIC, S.; STOECK, T. The Tara Oceans voyage reveals global diversity and distribution patterns of marine planktonic ciliates. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33555, 2016. doi:10.1038/srep33555

GONZALEZ, J. M.; SHERR, E. B.; SHERR, B. F. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 583–589, 1990.

GORSKY, G. et al. Expanding Tara Oceans Protocols for Underway, Ecosystemic Sampling of the Ocean-Atmosphere Interface During Tara Pacific Expedition (2016–2018). **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 750, 2019.

GRATTEPANCHE, J.; et al. Distinct assemblage of planktonic ciliates dominates both photic and deep waters on the New England shelf. **Marine Ecology Progress Series**, v. 526, p. 1–9, 2015 doi: 10.3354/meps11256

GRATTEPANCHE, J.; et al. Unexpected biodiversity of ciliates in marine samples from below the photic zone. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 16, p. 3987–4000, 2016.

GUILLOU, L.; et al. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D597–D604, 2013 doi: 10.1093/nar/gks1160

HOP, H.; et al. The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard. **Polar Research** v. 21, n. 1, p. 167–208, 2002 doi:10.3402/polar.v21i1.6480

HU, X.; LIN, X.; SONG, W. Class Spirotrichea. In: HU, X.; LIN, X.; SONG, W. (Eds.). *Ciliate Atlas: Species Found in the South China Sea*. Singapore: **Springer Singapore**, 2019. p. 499–932
https://doi.org/10.1007/978-981-13-5901-9_11

KAHL, A. (1932). “Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria) 3.Spirotricha,” in *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*, 25, ed. F. Dahl (Jena: Gustav Fischer), 399–650.

KATOH, K. et al., MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

KEELING, P. J.; CAMPO, J. Marine Protists Are Not Just Big Bacteria. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R541–R549, 2017 doi:10.1016/j.cub.2017.03.075

KIRCHMAN, D. L. *Processes in Microbial Ecology*. **Oxford University Press**, Oxford 2012

KÜPPERS, G. C. et al. A new oligotrich (Ciliophora, Oligotrichia) from Argentina, with redefinition of *Novistrombidium* Song and Bradbury. **European Journal of Protistology**, v. 69, p. 20–36, 2019 doi: 10.1016/j.ejop.2019.02.006

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. **Bioinformatics** v.30, n.22, p.3276-3278 2014/
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 127–128, 2007 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>

LI, J., et al. Multigene-Based Analyses of the Phylogenetic Evolution of Oligotrich Ciliates, with Consideration of the Internal Transcribed Spacer 2 Secondary Structure of Three Systematically Ambiguous Genera. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 430–437, 2013 doi:10.1128/EC.00270-12

LIU, W., et al. Taxonomy, morphology and molecular systematics of a new oligotrich ciliate, *Williophrya maedai* gen. nov., sp. nov., with redescription of *Strombidium basimorphum* and *Pseudotontonia simplicidens* (Protozoa, Ciliophora, Oligotrichia). **Systematics and Biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 247–258, 2011.

LIU, W., et al. Taxonomy, morphology and phylogeny of three new oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora, Oligotrichia) from southern China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_12, p. 4805–4817, 2013.

LIU, W., et al. Morphology and molecular phylogeny of three new oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora) from the South China Sea: Three new oligotrich ciliates. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 174, n. 4, p. 653–665, 2015a doi: 10.1111/zoj.12257

LIU, W., et al. Two New Genera of Planktonic Ciliates and Insights into the Evolution of the Family Strombidiidae (Protista, Ciliophora, Oligotrichia). **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0131726, 2015b doi:10.1371/journal.pone.0131726

LIU, W., et al. Taxonomy and molecular systematics of three oligotrich (s.l.) ciliates including descriptions of two new species, *Strombidium guangdongense* sp. nov. and *Strombidinopsis sinicum* sp. nov. (Protozoa, Ciliophora). **Systematics and Biodiversity**, v. 14, n. 5, p. 452–465, 2016 doi: 10.1080/14772000.2016.1162872

LIU, W., et al. Overview of the biodiversity and geographic distribution of aloricate oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora, Spirotrichea) in coastal waters of southern China. **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 8, p. 787–800, 2019 doi:10.1080/14772000.2019.1691081

LÓPEZ-GARCÍA, P., et al. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 603–607, 2001 doi:10.1038/35054537

LUO, W., et al. Diversity of microbial eukaryotes in Kongsfjorden, Svalbard. **Hydrobiologia**, v. 636, n. 1, p. 233–248, 2009 doi:10.1007/s10750-009-9953-z

LYNN, D. H.; GILRON, G. L. Strombidiid ciliates from coastal waters near Kingston Harbour, Jamaica (Ciliophora, Oligotrichia, Strombidiidae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 73, n. 1, p. 47–65, 1993 doi:10.1017/S0025315400032641

LYNN D. The Ciliated Protozoa. Characterization, classification, and guide to the literature. Springer Science + Business Media B.V. Ontario (Canada), 2008.

MAEDA, M.; CAREY, P.G. An illustrated guide to the species of the Family Strombidiidae (Oligotrichida, Ciliophora), free swimming protozoa common in

the aquatic environment. **Bull Ocean Research Institute** Univ. Tokyo v.19, n.1, p.68, 1985

MARQUARDT, M., et al. Strong Seasonality of Marine Microbial Eukaryotes in a High-Arctic Fjord (Isfjorden, in West Spitsbergen, Norway). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1868–1880, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03208-15>

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011

MONTAGNES, D. J. S., et al. Taxonomic Descriptions of One New Species and Redescription of Four Species in the Family Strombidiidae (Ciliophora, Oligotrichida) **The Journal of Protozoology**, v. 35, n. 2, p. 189–197, 1988

MONTAGNES, D. J. S. Growth responses of planktonic ciliates in the genera *Strobilidium* and *Strombidium*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 130, p. 241–254, 1996.

NOT, F., et al. New Insights into the Diversity of Marine Picoeukaryotes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7143, 2009 doi: 10.1371/journal.pone.0007143

OBIOL, A., et al. Metagenomic assessment of microbial eukaryotic diversity in the global ocean. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 3, p. 718–731, 2020 doi: 10.1111/1755-0998.13147.

OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., KINDT R. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.2-1, 2013

PAWLOWSKI, J., et al. CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. **PLoS Biology**, v. 10, n. 11, p. e1001419, 2012 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>

PEREIRA, R.; SOARES-GOMES, A. Ecologia marinha - 1. ed.-Rio de Janeiro: Interciência, 2021

RICCI, F.; et al. The Anti-Oxidant Defense System of the Marine Polar Ciliate *Euplotes nobilii*: Characterization of the MsrB Gene Family. **Biology** v. 6, n. 4, p. 4, 2017 <https://doi.org/10.3390/biology6010004>

ROBLIN, C., et al. The Multifunctional Sactipeptide Ruminococcin C1 Displays Potent Antibacterial Activity In Vivo as Well as Other Beneficial Properties for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3253, 2021 <https://doi.org/10.3390/ijms22063253>

RUIZ-GONZÁLEZ, C. et al. Higher contribution of globally rare bacterial taxa reflects environmental transitions across the surface ocean. **Molecular Ecology**, v. 28, n. 8, p. 1930–1945, 2019.

SHEN, Z., et al. Taxonomy, Morphology and Phylogeny of a New Oligotrich Ciliate– *Omegastrombidium hongkongense* n. sp. (Protozoa: Ciliophora) from Clear Water Bay, Hong Kong. **Journal of Ocean University of China** v. 17, n. 4, p. 890–896, 2018 doi:10.1007/s11802-018-3483-0

SNYDER, R. A., et al. Ciliate microzooplankton from the Northeastern Gulf of Mexico. **ICES Journal of Marine Science**, v. 78, n. 9, p. 3356–3371, 2021 <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab002>

SONG, W.; BRADBURY, P. C. Studies on some new and rare Reported Marine Planktonic Ciliates (Ciliophora: Oligotrichia) from Coastal Waters in North China. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 78, n. 3, p. 767–794, 1998 doi: 10.1017/S0025315400044775

SONG, W. B.; WANG, M.; WARREN, A. Redescriptions of three marine ciliates, *Strombidium elegans* Florentin, 1901, *Strombidium sulcatum* Claparede & Lachmann, 1859 and *Heterostrombidium paracalkinsi* Lei, Xu & Song, 1999 (Ciliophora, Oligotrichida). **European Journal of Protistology** v.36, n. 3, p.327–342. 2000 doi: 10.1016/S0932-4739(00)80010-3

SONG, W., et al. Taxonomy, morphology and molecular systematics of three oligotrich ciliates, including a description of *Apostrombidium parakielum* spec. nov. (Ciliophora, Oligotrichia). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_3, p. 1179–1191, 2013 doi: 10.1099/ijs.0.048314-0

SONG, W., et al. Morphological Characterizations of Four Species of *Parallelostrombidium* (Ciliophora, Oligotrichia), with a Note on the Phylogeny of the Genus. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 679–693, 2018 doi: 10.1111/jeu.12513

SONG, W. et al. Taxonomy and phylogeny of two poorly studied genera of marine oligotrich ciliates including descriptions of two new species: *Cyrtostrombidium paraboreale* sp. n. and *Apostrombidium orientale* sp. n. (Ciliophora: Spirotrichea). **European Journal of Protistology**, v. 70, p. 1–16, 2019 doi: 10.1016/j.ejop.2019.05.001.

SONG, W., et al. Morphology and Molecular Phylogeny of Two Freshwater Oligotrich Ciliates (Protozoa, Ciliophora, Oligotrichia), *Pelagostrombidium fallax* (Zacharias, 1895) Krainer, 1991 and *Limnostrombidium viride* (Stein, 1867) Krainer, 1995, with Brief Notes on Stomatogenesis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 232–244, 2020, doi: 10.1111/jeu.12777

SONG, W., et al. Overview of the Diversity, Phylogeny and Biogeography of Strombidiid Oligotrich Ciliates (Protista, Ciliophora), With a Brief Revision and a Key to the Known Genera. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p.10.3389, 2021

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

STOECK, T., et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 21–31, 2010 doi:10.1111/j.1365-294x.2009.04480.x

STOECKER, D.; GIFFORD, D.; PUTT, M. Preservation of marine planktonic ciliates: losses and cell shrinkage during fixation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 110, p. 293–299, 1994.

SUNAGAWA, S.; KARSENTI, E.; BOWLER, C.; BORK, P. Computational eco-systems biology in Tara Oceans: translating data into knowledge. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 5, p. 809, 2015. doi: [10.15252/msb.20156272](https://doi.org/10.15252/msb.20156272)

- SUNAGAWA, S., et al. Tara Oceans: towards global ocean ecosystems biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 428–445, 2020
- TERRADO, R.; VINCENT, W.; LOVEJOY, C. Mesopelagic protists: diversity and succession in a coastal Arctic ecosystem. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 56, p. 25–39, 2009 doi:10.3354/ame01327
- ULLOA, O., et al. Microbial communities and their biogeochemical role in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. **Gayana (Concepción)**, v. 70, p. 87–89, 2006.
- VILLARINO, E., et al. Large-scale ocean connectivity and planktonic body size. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 142, 2018 doi:10.1038/s41467-017-02535-8
- XU, D., WARREN, A., SONG, W. B. “Oligotrichs,” in Free-living Ciliates in the Bohai and Yellow Seas, China, eds W. Song, A. Warren, and X. Hu *Beijing: Science Press* p. 307–351, 2009
- XU, D., et al. The establishment of a new oligotrich genus *Varistrombidium* n. gen. and the morphology and phylogeny of a marine ciliate *V. kielum* (Maeda & Carey, 1985) n. comb.(Protista, Ciliophora). **Acta Zootaxonomica Sinica** v.36, n.3, p.502–511, 2011
- XU, K.; AGATHA, S.; DOLAN, J. (2022). World Ciliophora Database. Strombidiidae Fauré-Fremiet, 1970. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1703> on 2022-09-29

ZHANG, Q. et al. Molecular phylogeny of oligotrich genera *Omegastrombidium* and *Novistrombidium* (Protozoa, Ciliophora) for the systematical relationships within Family Strombidiidae. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 28, n. 4, p. 769–777, 2010 <https://doi.org/10.1007/s00343-010-9096-0>

ZHAO, F., et al. Patterns and Drivers of Vertical Distribution of the Ciliate Community from the Surface to the Abyssopelagic Zone in the Western Pacific Ocean. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2559, 2017