

CAROLINE DE SANTANA BELLISSIMO

Revisão taxonômica do complexo de espécies *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs e *Micrasterias thomasiana* W. Archer com base em evidências morfológicas e moleculares

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2024

CAROLINE DE SANTANA BELLISSIMO

Revisão taxonômica do complexo de espécies *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs e *Micrasterias thomasi* W. Archer com base em evidências morfológicas e moleculares

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2024

CAROLINE DE SANTANA BELLISSIMO

Revisão taxonômica do complexo de espécies *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs e *Micrasterias thomasi* W. Archer com base em evidências morfológicas e moleculares

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. CARLOS EDUARDO DE MATTOS BICUDO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MAPOTECAS**

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Bellissimo, Caroline de Santana
B444r Revisão taxonômica do complexo de espécies *Micrasterias denticulata*
Brébisson ex Ralfs e *Micrasterias thomasi* W. Archer com base em evidências
morfológicas e moleculares / Caroline de Santana Bellissimo - - São Paulo, 2024.
132p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de
Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2024.

Bibliografia.

1. Biologia molecular. 2. Desmídias. 3. *Micrasterias*. 4. Taxonomia.
5. Zygnematophyceae. I. Título.

CDU: 582.262.24

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo (Orientador)

Dr. Geraldo José Peixoto Ramos

Dr^a Thaís Garcia da Silva

À minha família e ao meu noivo, pelo amor incondicional, apoio e incentivo ao longo dos anos. Vocês foram minha fonte de força e inspiração.

“Às estrelas que ouvem e aos sonhos que são atendidos”

Sarah J. Maas

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um trabalho de fôlego como o presente só foi possível com a colaboração e o entendimento de várias pessoas, as quais passo a mencionar:

Ao meu orientador, Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, minha imensa gratidão pela oportunidade de realizar meu sonho de ingressar no Mestrado e conhecer, mais profundamente, a beleza das desmídias, especialmente, das *Micrasterias*. Agradeço por compartilhar seu vasto conhecimento em taxonomia que tanto enriqueceu minha jornada acadêmica. Além disso, pela generosidade ao disponibilizar acesso irrestrito à sua biblioteca particular repleta de importantes publicações e acervo, que foi fundamental para a concretização deste trabalho.

À Dr^a Camila Barbosa de Araújo, que atuou como verdadeira co-orientadora, quero expor minha profunda gratidão pela sua orientação, colaboração e apoio fundamentais durante todo o desenvolvimento deste projeto. Sua disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas e sua paciência nos momentos difíceis foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço, além do mais, a amizade que desenvolvemos ao longo desse processo. Este trabalho também é resultado de sua dedicação e contribuição e, por isso, dedico parte dele a você Camila. Muito obrigada por tudo.

Aos membros da comissão examinadora do meu exame de qualificação, Dr^a Nair Sumie Yokoya, Dr^a Thaís Garcia da Silva e Dr^a Carmen Lúcia Amorim Pires-Zotarelli, pelas contribuições que tanto ajudaram a aprimorar o desenvolvimento do atual projeto de pesquisa.

À Coleção de Culturas da Universidade de Hamburgo (“Microalgae and Zygnematophyceae Collection - MZCH”), na Alemanha, pelas cepas MZCH08, MZCH32, MZCH50, MZCH77, MZCH216, MZCH244 e MZCH675; e à Coleção de Culturas de Microalgas da Universidade de Essen (“Central Collection of Algal Cultures – CCAC”), também na Alemanha, pela cepa CCAC1026.

Aos colegas do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisas Ambientais, pela ajuda nas análises de biologia molecular e à pesquisadora Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Amorim Pires-Zotarelli, pela troca tão construtiva de conhecimentos e proveitosas discussões. Suas contribuições foram essenciais para o aprimoramento deste estudo.

À Prof^a Dr^a Nair Sumie Yokoya, pela disponibilização integral da infraestrutura e equipamentos de seu laboratório para acomodação das culturas utilizadas neste estudo e por todo conhecimento disponibilizado.

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Ambientais, por facilitar a infraestrutura institucional para o desenvolvimento do projeto e pelos cursos oferecidos pela pós-graduação.

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais, especialmente aos antigos Núcleos de Pesquisa em Ecologia e de Pesquisa em Ficologia, por possibilitarem o uso irrestrito de toda infraestrutura e ambiente de trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro e concessão de verba ao projeto maior intitulado “Estudo polifásico em desmídias (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) e suas implicações taxonômicas e nomenclaturais” (Processo CNPq PROTAX 442217/2020-0) e ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de Mestrado (Processo 130262/2022-6) para o desenvolvimento deste estudo.

À minha mãe, por sempre me apoiar e ajudar nas horas difíceis, quando mais precisei. Ao meu pai, também por me apoiar em todos os momentos. Aos meus amigos que sempre me apoiaram e “relaxaram” nos finais de semana. Aos meus avós, por sempre se preocuparem comigo e ficarem felizes com as minhas conquistas. Aos meus irmãos, por me apoiarem. E a todos os colegas da sala de pós-graduação do prédio da Ecologia, por deixarem meus dias mais alegres e aceitarem as loucuras de criar a “mascote” da ecologia.

À minha amiga Darah Danielle Pontes, por tornar os dias mais leves e engraçados compartilhando conhecimento sobre as microalgas e a paixão pelos livros de ACOTAR, além de todo apoio e ajuda na reta final deste estudo.

Ao meu noivo, Guilherme Gibim, por sempre me apoiar nas escolhas mais malucas, dar-me força nos momentos mais difíceis, tornar os dias mais leves e estar sempre disposto a me ajudar a resolver os problemas.

RESUMO

O gênero *Micrasterias* foi descrito por Carl Agardh em 1827 e validado por John Ralfs em 1848. A taxonomia do gênero está inteiramente baseada nas características morfológicas de suas células, tais como: forma, incisões celulares, dimensões, planos de simetria, ornamentação da parede celular e configuração dos cloroplastídios. O número de lobos separa os representantes do gênero em trilobados (três lobos e duas incisões) e pentalobados (cinco lobos e quatro incisões). Muitas espécies classificadas no gênero apresentam ampla variação morfológica em nível populacional, provocando confusão na descrição de inúmeras variedades e formas taxonômicas. Duas espécies de *Micrasterias* são facilmente distinguíveis, *M. denticulata* e *M. thomasi*. A primeira delas foi proposta em 1835 por A. de Brébisson e caracteriza-se pelas projeções arredondadas na base dos segmentos e a ausência de proeminências superficiais na parede celular. *Micrasterias thomasi* foi descrita em 1862 por W. Archer e apresenta bastante semelhança morfológica com *M. denticulata*, porém, é diferente no tamanho celular e características da margem terminal dos lóbulos de última ordem e proeminências superficiais na parede celular. As cepas estudadas das duas espécies exibiram ampla variação quanto às medidas lineares e à forma celular. As medidas lineares ora obtidas revelaram diferenças significativas entre as cepas e entre os indivíduos de uma mesma cepa, ressaltando a necessidade de medidas padronizadas e inclusão de novos atributos morfológicos para a caracterização morfológica de espécies. Como os representantes de ambas as espécies possuem morfologia bastante semelhante, a inclusão de seis novos atributos aliados aos três já amplamente utilizados na literatura complementou sua caracterização auxiliando significativamente na identificação das diferenças entre as cepas e, melhor ainda, entre os espécimes de cada espécie analisada. A análise das cepas usando duas abordagens morfométricas distintas (morfometrias linear e geométrica) permitiu concluir que a adoção de novos atributos morfológicos (obtenção de medidas lineares) e a análise da forma celular constituíram ferramentas essenciais para separar espécies morfologicamente próximas, problemas taxonômicos e nomenclaturais cruciais. As oito cepas estudadas foram originalmente identificadas em suas respectivas coleções de cultivo como representantes de *M. denticulata* e *M. thomasi*. Embora os indivíduos de algumas dessas cepas apresentem características morfológicas diagnósticas de ambas as espécies em pauta, os dados moleculares e filogenéticos obtidos permitiram reconhecer que as oito cepas analisadas constituem entidades taxonômicas distintas dos pontos de vista filogenético e molecular. Novas proposições e emendas taxonômicas deverão ser providenciadas em futuro breve para designar e classificar estas novas espécies dentro da linhagem *Micrasterias*.

Palavras-chave: biologia molecular, desmídias, *Micrasterias*, taxonomia, Zygnematophyceae.

ABSTRACT

Micrasterias was described by Carl Agardh in 1827 and validated by John Ralfs in 1848. The taxonomy of the genus is presently based solely on the morphological characteristics of their cells, such as shape, cell incisions and dimensions, symmetry planes, cell wall ornamentation, and chloroplast configuration. The number of lobes separates the representatives of the genus into trilobed (three lobes and two incisions) and pentalobed (five lobes and four incisions). Many species classified in the genus exhibit wide morphological variation at the population level, leading to confusion in the description of numerous varieties and taxonomic forms. Two species of *Micrasterias* are somewhat easily distinguishable, *M. denticulata* and *M. thomasi*. The first species was proposed in 1835 by A. de Brébisson and is characterized by the possession of rounded projections at the base of the segments and the absence of prominent surface features on the cell wall. *Micrasterias thomasi* was described in 1862 by W. Archer and shows considerable morphological similarity to *M. denticulata*, but differs in their cell size and characteristics of the terminal margin of the lobes of last order, and the prominent surface projections on the cell wall. Strains studied of the two species showed wide variation in terms of linear measurements and cell shape. The linear measurements obtained revealed significant differences between strains and individuals of the same strain, highlighting the need for standardized measurements and the inclusion of new morphological attributes for the characterization of similar taxa. As the representatives of both species have quite similar morphology, the inclusion of six new attributes, along with the three already broadly used in the literature complemented their characterization, significantly assisting identification of differences between the strains and, even better, between the specimens of each species. The analysis of the strains using two distinct morphometric approaches (linear and geometric morphometries) concluded that the adoption of new morphological attributes (obtaining linear measurements) and cell shape analysis were essential tools to separate morphologically similar taxa, a crucial taxonomic and nomenclatural issue. All eight strains studied were originally identified in their respective culture collections as representatives of either *M. denticulata* or *M. thomasi*. Although individuals of some of these strains display diagnostic morphological characteristics of both species, the molecular and phylogenetic data obtained allowed to recognize that the eight analyzed strains constitute distinct taxonomic entities from the phylogenetic and molecular points of view. New taxonomic propositions and original description amendments will be provided in the near future to designate and classify these new species within the *Micrasterias* lineage.

Keywords: molecular biology, Desmids, *Micrasterias*, taxonomy, Zygnematophyceae.

LISTA DE ABREVIações UTILIZADAS

CCAC: Central Collection of Algal Cultures

CLP: Comprimento do lobo polar

CM: Comprimento médio da semicélula

coxIII: Cytochrome C oxidase subunit III

CT: Comprimento total da semicélula

GPA: Análise Generalizada de Procrustes

IW: Largura do istmo

Lapic: Largura do ápice da semicélula

LBPolar: Largura do lobo polar

LDA: Análise de Discriminante Linear

LLat 1: Largura do lobo lateral 1

LLat 2: Largura do lobo lateral 2

LT: Largura total da semicélula

MG: Morfometria geométrica

ML: Morfometria linear

MZCH: Microalgae and Zygnematophyceae Collection

PCA: Análise de Componentes Principais

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

***psaA*:** Photosystem I P700 Chlorophyll A apoprotein A1

SSUrDNA: Small subunit ribosomal DNA

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs (Figura de Ralfs 1848).	18
Figura 2. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>angulosa</i> (Hantzsch) West & G.S. West (Figura de Krieger 1939).....	19
Figura 3. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>angustosinuata</i> F.Gay (Figura de Gay 1884).	20
Figura 4. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>japonica</i> (R.Fujisawa) Y.Okada (Figura de Okada 1952).	20
Figura 5. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>africana</i> Claassen (Figura de Claassen 1961).	21
Figura 6. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>taylorii</i> Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).	22
Figura 7. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>taylorii</i> Willi Krieger f. <i>mammillata</i> Prescott & Scott (Figura de Scott & Prescott 1952).	22
Figura 8. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>basiprotuberans</i> C.Bullard (Figura de Prescott et al. 1977).....	23
Figura 9. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>abrupta</i> Willi Krieger & P.Bourrelly (Figura de Krieger & Bourrelly 1956).	24
Figura 10. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>intermedia</i> Nordstedt (Figura de Krieger 1939).	25
Figura 11. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>granulosa</i> Irénée-Marie (Figura de Irénée-Marie 1951).....	26
Figura 12. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs f. <i>mucronata</i> Irénée-Marie (Figura de Irénée-Marie 1951).....	27
Figura 13. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>minnesotensis</i> W.B.Turner (Figura de Turner 1885).	27
Figura 14. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>pseudojenneri</i> P.Bourrelly (Figura de Bourrelly 1975).	28
Figura 15. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs var. <i>lusitanica</i> J.Sampaio (Figura de Sampaio 1922).	29
Figura 16. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs f. <i>sexdentata</i> J. Roubal (Figura J. Roubal	

1947).	30
Figura 17. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer (Figura de Archer 1862).	33
Figura 18. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>javanica</i> R.Gutwinski (Figura de Krieger 1939).	33
Figura 19. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>pulcherrima</i> G.S.West (Figura de Krieger 1939).	34
Figura 20. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>ornata</i> (F.E.Fritsch) Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).	35
Figura 21. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>ornata</i> (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. <i>africana</i> P.Bourrelly (Figura de Bourrelly 1961).	36
Figura 22. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>evoluta</i> Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).	36
Figura 23. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>notata</i> (Nordstedt) Grönblad (Figura de Krieger 1939).	37
Figura 24. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>torneensis</i> Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).	38
Figura 25. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>madagascariensis</i> P.Bourrelly & A.Couté (Figura de Bourrelly & Couté 1991).	38
Figura 26. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>notata</i> (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. <i>andamanensis</i> B.N.Prasad & P.K.Misra (Figura de Prasad & Misra 1992).	39
Figura 27. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer var. <i>maxima</i> C.Bernard (Figura de Bernard 1909). 40	
Figura 28. <i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer f. <i>punctata</i> Rosa (Figura de Rosa 1951).	40

Capítulo 2

Figura 1. Esquema das medidas lineares o obtidas em populações de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> . Em vermelho, estão listadas as medidas comumente usadas na literatura e em preto as propostas no presente estudo.	56
Figura 2. Posição dos 39 marcos anatômicos (“landmarks”) distribuídos ao longo do contorno da semicélula de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i>	57
Figura 3. Semicélulas de <i>Micrasterias</i> . Fig. a-f. <i>M. thomasi</i> (a. cepa MZCH08, b. cepa MZCH32, c. MZCH77, d. MZCH244, e. cepa MZCH675, f. cepa CCAC1026); fig. g-h. <i>M. denticulata</i> (g. cepa MZCH50, h. cepa MZCH216).	59
Figura 4. Comprimento total da semicélula (CT) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i>	60
Figura 5. Comprimento celular médio (CM) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i>	61
Figura 6. Comprimento do lobo polar (CLP) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i>	63

Figura 7. Largura do lobo polar (LBPolar) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	64
Figura 9. Largura apical (Lapic) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	66
Figura 9. Largura celular total (LT) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	67
Figura 10. Largura do lobo lateral 1 (LLat1) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	69
Figura 11. Largura do lobo lateral 2 (LLat2) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	70
Figura 12. Largura do istmo (IW) das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	72
Figura 13. Forma ‘consensus’ obtida através da Análise de Procrustes Generalizada (GPA) ilustrando a configuração “ótima” dos 39 “landmarks” plotados ao longo da semicélula dos indivíduos de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.....	74
Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) das cepas estudadas. Legenda: rosa claro (cepa MZCH216), vermelho (cepa MZCH08), amarelo (cepa MZCH244), laranja (cepa MZCH32), roxo (cepa MZCH77), verde (cepa MZCH675), azul claro (cepa CCAC1026) e azul escuro (cepa MZCH50).....	75
Figura 15. ‘Grids’ de deformação obtidos através do eixo 1 (mínimo e máximo) para as cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.....	76
Figura 16. ‘Grid’ de deformação obtido para os indivíduos pertencentes à cepa MZCH216.	76
Figura 17. ‘Grids’ de deformação obtidos para as cepas MZCH77, MZCH244, MZCH675 e CCAC1026, respectivamente.....	77
Figura 18. ‘Grids’ de deformação do eixo 2 das cepas de <i>M. denticulata</i> e <i>M. thomasi</i> ana.	78
Figura 19. ‘Grids’ de deformação obtidos para os indivíduos pertencentes à cepa MZCH50.	78
Figura 20. ‘Grids’ de deformação obtidos para as cepas MZCH08 e MZCH32.	79
Figura 21. Análise de discriminante linear (LDA). Legenda de cores: rosa claro (cepa MZCH216), vermelho (cepa MZCH08), amarelo (cepa MZCH244), laranja (cepa MZCH32), roxo (cepa MZCH 77), verde (cepa MZCH675), azul claro (cepa CCAC1026) e azul escuro (cepa MZCH50).	80
Figura 22. Grids’ de deformação ilustrando as mudanças na forma celular de cada cepa analisada.	84

Capítulo 3

Figura 1. Árvore filogenética obtida com base nas sequências concatenadas dos marcadores moleculares SSU rDNA, <i>rbcL</i> , <i>psaA</i> e <i>coxIII</i> , 34 sequências de <i>Micrasterias sensu</i> Škaloud et al. (2011) e Gontcharov & Melkonian (2010). A árvore filogenética foi enraizada utilizando as sequências de <i>Haplotaenium</i> e <i>Penium</i> como grupo externo. Os valores indicam o suporte estatístico estimado pelos métodos Inferência Bayesiana (lado esquerdo) e Máxima Vesselhança (lado direito). A barra de escala representa o número estimado de substituições.	99
Figura 2. Ilustração das características morfológicas das cepas com base na filogenia obtidas neste	

estudo.101

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Variedades e formas taxonômicas registradas na literatura para *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer conforme os requisitos estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Turland et al. 2018). 43

Capítulo 2

Tabela 1. Variedades e formas taxonômicas registradas na literatura para *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer conforme os requisitos estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Turland et al. 2018). 43

Tabela 2. Tabela com os táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e *M. thomasi* propostos na literatura e na cepa CCAC2253. 58

Tabela 3. Tabela com a matriz de predição e de posterior probabilidade das variedades/formas encontradas em literatura e as cepas. 82

Capítulo 3

Tabela 1. ‘Primers’ e ciclos utilizados para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). 95

Tabela 2. Informações das 42 sequências de DNA utilizadas neste estudo e seus respectivos números de acesso GenBank. 97

Sumário

Agradecimentos	viii
Resumo	x
“Abstract”	xi
Lista de abreviações utilizadas	xii
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xvii
Sumário	xviii
Introdução geral	1
1. Reino Viridiplantae	1
2. Classe Zygnematophyceae	1
3. Taxonomia e filogenia das desmídias	2
4. Gênero <i>Micrasterias</i>	4
5. Referências citadas	6
Justificativa, hipótese e objetivos	11
1. Justificativa	11
1.1. Perguntas	11
1.2. Hipótese	11
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Geral	11
1.3.2. Específicos	11
Capítulo 1. Análise taxonômica e nomenclatural das espécies <i>Micrasterias</i> <i>denticulata</i> e <i>Micrasterias thomasi</i> (Desmidiaceae, Zygnematophyceae)	13
1. Introdução	13
2. Material e métodos	17
3. Resultados e discussão	18
3.1. <i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs	18

3.1. <i>Micrasterias thomasiana</i> W.Archer	32
4. Considerações gerais sobre o capítulo	42
5. Referências citadas	47
Capítulo 2. Caracterização morfológica das cepas de <i>Micrasterias denticulata</i> e <i>Micrasterias thomasiana</i> (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) através do uso de morfometria linear e geométrica	51
1. Introdução	51
2. Objetivos	54
2.1. Geral	54
2.2. Específicos	54
3. Material e métodos	54
3.1. Isolamento, cultivo e manutenção das cepas	54
3.2. Morfometria linear (ML)	55
3.3. Morfometria geométrica (MG)	56
3.3.1. Morfometria geométrica do material da literatura clássica	58
4. Resultados e discussão	58
4.1. Análise de morfometria linear (ML)	58
4.1.1. Comprimento celular total (CT)	59
4.1.2. Comprimento celular médio (CM)	61
4.1.3. Comprimento do lobo polar (CLP)	62
4.1.4. Largura do lobo polar (LBPolar)	64
4.1.5. Largura apical (Lapic)	65
4.1.6. Largura celular total (LT)	67
4.1.7. Largura do lobo lateral 1 (LLat1)	68
4.1.8. Largura do lobo lateral 2 (LLat2)	70
4.1.9. Largura do istmo (IW)	71
4.2. Análise de morfometria geométrica (MG)	73
4.2.1. Identificação taxonômica das cepas	81
5. Considerações finais e conclusão	83
6. Referências citadas	87
Capítulo 3. Diversidade genética e filogenia do complexo de espécie <i>Micrasterias denticulata</i> e <i>Micrasterias thomasiana</i> (Desmidiaceae, Zygnematophyceae)	91
1. Introdução	91
2. Objetivos	94
2.1. Geral	94

2.2. Específico	94
3. Material e métodos	94
3.1. Origem e cultivo das cepas	94
3.2. Extração do DNA, amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento	94
3.3. Análise das sequências e alinhamento	96
3.4. Análises moleculares e filogenia	98
4. Resultados e discussão	99
5. Referências citadas	104
4. Conclusões gerais	109

Introdução geral

1. Reino Viridiplantae

O reino Viridiplantae compreende as algas verdes e as plantas terrestres e é um dos principais grupos de eucariontes fotossintetizantes oxigenados. É composto por duas grandes linhagens: as Chlorophyta, que compreendem a maioria das algas verdes e as Streptophyta, que incluem as algas verdes e as plantas terrestres (Leliaert *et al.* 2012).

A linhagem Streptophyta está constituída atualmente por seis classes distintas de algas verdes. Parte dessa diversidade, a classe Zygnematophyceae, vem despertando considerável interesse dos cientistas evolucionistas (Zhou & Schwartzberg 2020) pelo fato de haver mostrado ser representante dos parentes mais próximos das plantas terrestres, conforme indicado por diversos estudos como, por exemplo, os conduzidos por Wodniok *et al.* (2011), Wickett *et al.* (2014), Zhong *et al.* (2015) e Leebens-Mack *et al.* (2019). Esta classe tem sido objeto de análises aprofundadas devido à sua relevância no entendimento da evolução das plantas e de seu papel como possível elo entre as algas aquáticas e as plantas terrestres (Zhou & Schwartzberg 2020).

2. Classe Zygnematophyceae

A Classe Zygnematophyceae ou Conjugatophyceae compreende atualmente mais de 4.300 espécies descritas (Guiry & Guiry 2024) incluindo formas unicelulares e pseudofilamentosas. Estas formas ocorrem em quase todos os ambientes de água doce, incluindo habitats extremos como os corpos de água ácida e os ultra-oligotróficos. Abrange grupos morfologicamente diversos ao incluir indivíduos unicelulares imóveis, pequenas colônias e filamentos simples ou ramificados que não apresentam estágio flagelado durante seu ciclo de vida (Zhou & Schwartzberg 2020).

A reprodução sexual ocorre por um processo único de conjugação, que envolve a fusão de gametas amebóides e a produção de zigoto de parede espessa (Brook 1981). A classe é composta por seis ordens e as principais, são: Desmidiaceae e Zygnematales, que foram propostas com base nas características estruturais da parede celular de seus componentes (Wehr & Sheat 2003, Felisberto & Rodrigues 2011, Bicudo & Menezes 2017). Posteriormente, com o avanço da biologia molecular, novas classes têm sido propostas.

As Zygnematales, que incluem as desmídias sacodermes, caracterizam-se por terem a parede celular formada por uma única peça desprovida de poros e outras ornamentações e abrigam organismos que podem ser unicelulares ou formarem pseudofilamentos (Bold & Wynne 1985). A ordem Zygnematales está atualmente dividida em duas famílias: Mesotaeniaceae, que engloba cerca de 60 espécies e Zygnemataceae, com 610 espécies (Guiry & Guiry 2024).

As Desmidiaceae ou desmídias placodermes apresentam a parede celular formada por duas ou mais peças, com ornamentação e poros (Brook 1981). Os organismos são em geral unicelulares e compostos por duas semicélulas unidas por um istmo estreito (Brook 1981). A ordem está dividida, atualmente, em quatro famílias, a saber: Closteriaceae, Desmidiaceae, Gonatozygaceae e Peniaceae (Guiry & Guiry 2024).

Desmidiaceae é a mais especiosa e complexa família das algas verdes pertencente à classe Zygnematophyceae, linhagem Streptophyta (Brook 1981, Škaloud *et al.* 2011). Essas algas habitam predominantemente ambientes aquáticos de água doce e, mais especificamente, o perifíton e o metafíton e, de preferência, águas oligotróficas a mesotróficas caracterizadas por um pH naturalmente ácido, que varia entre 3,5 e 6,5 e temperaturas ótimas situadas entre 25°C e 30°C.

As Desmidiaceae são consideradas estrategistas do tipo K devido à sua notável demanda por recursos ambientais. Esses recursos incluem a presença de substrato, a estabilidade ambiental (como a velocidade da corrente e a minimização de distúrbios provenientes do banco de macrófitas), a morfometria específica do ambiente aquático e variáveis como pH e condutividade. Por conta desses fatores, as Desmidiaceae são consideradas ótimos bioindicadores (Coesel 1996, Spijkerman *et al.* 2004, Coesel & Meesters 2007, Černá & Neustupa 2010, Biolo 2016).

A família compreende, atualmente, 79 gêneros e cerca de 2.800 espécies validamente descritas (Gerrath 2003, Gontcharov 2008, Guiry & Guiry 2024), das quais a grande maioria foi proposta no século XIX a partir de estudos de taxonomia tradicional (nível α), baseada exclusivamente nas características morfológicas de seus organismos. Porém, o número total de espécies conhecidas para a família pode, segundo alguns autores, estar subestimado e ultrapassar até mais de 5.000 taxa (Škaloud *et al.* 2012).

3. Taxonomia e filogenia das desmídias

A taxonomia das desmídias encontra-se hoje baseada apenas nas características morfológicas de suas células, tais como: forma, dimensões, planos de simetria, ornamentação da parede celular e configuração dos cloroplastídios (Brook 1981, Šťastný *et al.* 2013). Muitas espécies classificadas nesse grupo apresentam, contudo, ampla variação morfológica em nível populacional, o que vem provocando bastante confusão taxonômica com a descrição de inúmeras variedades e formas taxonômicas (Gontcharov & Melkonian 2010).

Contudo, já se alertava, ainda na década dos anos 70 do século passado, para a necessidade de uma urgente revisão de táxons classificados nas Desmidiaceae, ao afirmar que a família se encontrava entulhada de descrições de novas espécies, variedades e formas taxonômicas, muitas das quais propostas de forma arbitrária ou destituída de maior critério (Bicudo 1972).

Pesquisas recentes também alertaram para este problema, como visto por Gontcharov & Melkonian (2010) que destacaram que os gêneros da família necessitavam de revisão, pois muitos eram polifiléticos e demandavam novas decisões e emendas a serem propostas. Além disso, a existência de espécies crípticas, que são morfologicamente semelhantes, mas geneticamente distintas, também representa um desafio para a taxonomia baseada em características morfológicas (Št'astný *et al.* 2013).

A taxonomia clássica ainda é um dos principais fatores para identificar gênero e espécie dos organismos. É uma ciência teórico-prática que lida, basicamente, com a organização do conhecimento biológico sobre os seres vivos. Conforme proposto por George G. Simpson, taxonomia é definida como “o estudo teórico da classificação, incluindo suas bases, princípios, procedimentos e regras”.

A delimitação de espécies é um requisito absolutamente indispensável para o entendimento da biodiversidade ecossistêmica. Identificar espécies, isto é, as unidades fundamentais de muitos grupos de protistas e, em especial, das microalgas é uma tarefa um tanto difícil, especialmente devido aos problemas relacionados com a definição de o que é uma espécie diante das várias tentativas constantes na literatura, que representam diferentes conceitos e definições (Škaloud *et al.* 2015).

A morfometria desempenha papel importante na taxonomia, pois permite uma análise quantitativa e uma comparação objetiva dos organismos (Daly 1985, Monteiro & Reis 1999), abrange um conjunto de técnicas amplamente utilizado em várias disciplinas como, por exemplo, citologia, entomologia, geologia e paleontologia (Daly 1985). E pode ser analisada através da morfometria tradicional (linear) e da morfometria geométrica (Rohlf & Marcus 1993).

Os taxonomistas de microalgas vêm utilizando abordagens morfométricas que incluem análises multivariadas para melhor compreender a morfologia dos organismos, principalmente, naqueles das Zynematophyceae (Savriama *et al.* 2010, Neustupa *et al.* 2010, Škaloud & Št'astný 2010, Neustupa 2017, Neustupa & Woodard 2020).

A integração da morfometria com outras abordagens e/ou ferramentas como as análises filogenéticas baseadas em dados moleculares permite uma compreensão mais completa da diversidade biológica e da evolução dos organismos (Neustupa *et al.* 2010), pois as medidas morfológicas podem ser incorporadas diretamente nas análises filogenéticas, enriquecendo a construção de árvores filogenéticas e a inferência de padrões evolutivos (Savriama *et al.* 2010, Neustupa *et al.* 2010).

A aplicação de análises filogenéticas moleculares a partir da década dos anos 90 do século passado ampliou o escopo da taxonomia e da sistemática das algas (Št'astný *et al.* 2013). As Zygnematophyceae têm despertado grande interesse dos pesquisadores, recentemente, por ser um grupo de organismos mais próximo evolutivamente das plantas terrestres e, possivelmente, os primeiros a colonizarem o ambiente terrestre a 500-470 milhões de anos (Zhou & Schwartzberg 2020).

A taxonomia das desmídias ainda é principalmente morfológica, mas métodos moleculares têm aprimorado essa abordagem (McCourt *et al.* 2000, Gontcharov *et al.* 2004, Hall *et al.* 2008).

Com o advento das técnicas da biologia molecular e o surgimento dos primeiros resultados referentes à posição filogenética de táxons pertencentes à classe Zygnematophyceae e, em especial, à ordem Desmidiales, alguns gêneros foram reconhecidos como polifiléticos (Gontcharov & Melkonian 2010) enfatizando, conseqüentemente, a importância da realização de revisões taxonômicas para as Desmidiaceae, que incluíssem novas decisões e emendas a serem propostas, além de uma acurada revisão do conceito de espécie com base não apenas na morfologia para esse grupo de microalgas. Enfatizaram, também, a criação de uma base taxonômica robusta obtida a partir do uso da taxonomia polifásica (nível ω), ou seja, com base em dados da taxonomia tradicional subsidiados, entretanto, por outras áreas do conhecimento como a morfologia, a biologia molecular e a filogenia, além de dados fisiológicos e ecológicos.

De forma a buscar a identificação e a delimitação correta de muitas espécies de desmídias e evitar a proposição de novas espécies, variedades e formas taxonômicas artificiais e destituídas de maior critério, a abordagem polifásica vem sendo amplamente utilizada em estudos de taxonomia, ecologia e filogenia, visando a juntar e validar toda informação existente nos mais diversos conceitos de espécie (Kouwets 2008).

4. Gênero *Micrasterias*

O gênero *Micrasterias* foi proposto por Agardh (1827), validado em Ralfs (1848) e está classificado na família Desmidiaceae. É constituído por indivíduos unicelulares, solitários, coloniais ou que formam falsos filamentos simples como é o caso de *M. foliacea* Bailey ex Ralfs. Os indivíduos seus representantes apresentam grandes dimensões celulares quando comparados com os demais componentes da família, além de uma morfologia que varia de simples a altamente complexa (Neustupa *et al.* 2010).

São morfológicamente formados por duas semicélulas “idênticas” uma à outra, interligadas na região do istmo e que apresentam simetria bilateral e incisões celulares que fazem com que as semicélulas apareçam divididas em lobos e lóbulos e separem os indivíduos em trilobados (três lobos e duas incisões) e pentalobados (cinco lobos e quatro incisões). Algumas espécies possuem parede

lisa e porosa, enquanto outras apresentam elaborada ornamentação representada por grânulos, escrobículos ou espinhos dispostos ou não de maneira regular. Essas características morfológicas fazem do gênero *Micrasterias* um grupo fascinante e diversificado da família Desmidiaceae (Sormus 1980).

Estão incluídos no banco de dados AlgaeBase, atualmente, 221 nomes de espécies e 754 de categorias infraespecíficas (variedades e formas taxonômicas) de *Micrasterias*. Contudo, apenas 85 deles são aceitos e foram validados taxonomicamente (Guiry & Guiry 2024).

As espécies *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer são características por sua forma pentalobada e semelhança morfológica. Ao descrever *M. thomasi*, em 1862, Archer (1862) realizou comparações com duas espécies semelhantes, *M. rotata* Ralfs e *M. denticulata* destacando suas semelhanças como a presença de projeções apiculadas na base dos segmentos e as proeminências superficiais, características estas comuns às três espécies. Em seguida, descreveu as diferenças específicas entre *M. thomasi* e as outras duas espécies, apontando que as principais diferenças residiam no tamanho da célula, nos lobos basais, na margem terminal do lóbulo final e na presença de elevações ou projeções na superfície da célula. Tais características distintivas fundamentaram a diferença taxonômica proposta por Archer entre as duas espécies.

No que tange a taxonomia e a sistemática deste complexo de espécies, *M. denticulata* apresenta pelo menos 37 registros (entre variedades e formas taxonômicas) de acordo com dados levantados da plataforma taxonômica AlgaeBase (Guiry & Guiry 2024). Desses registros, 26 são de variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* e os demais 11 são outras espécies que incluem a palavra *denticulata* no nome de suas variedades taxonômicas.

Ainda segundo dados disponíveis no AlgaeBase, *M. thomasi* apresenta 17 registros entre variedades e formas taxonômicas (Guiry & Guiry 2024). Destas 17 variedades e formas taxonômicas, *M. thomasi* var. *schweinfurthii* (Cohn) Playfair foi considerada em nível espécie, *M. schweinfurthii* Cohn. Da mesma forma que *M. denticulata*, *M. thomasi* também necessita de uma acurada revisão.

Em relação à distribuição das espécies, *M. denticulata* encontra-se amplamente registrada nos Estados Unidos da América, Canadá e em outros continentes (Prescott *et al.* 1977). Para o Brasil, a espécie foi documentada em trabalhos de taxonomia clássica de nível α para o Distrito Federal e quatro estados brasileiros (Bahia, Minas Gerais, Paraná e São Paulo) (Oliveira 2011, Bicudo *et al.* 2015).

Micrasterias thomasi é, no entanto, mais restrita em sua distribuição geográfica. *Micrasterias thomasi* var. *notata* é o único material amplamente registrado em todos os continentes, incluindo a América do Sul (Prescott *et al.* 1977). Para o Brasil, a presença desta variedade foi documentada nos estados Amazonas, Bahia, Minas Gerais, Pará, Paraná e São Paulo (Santos 2016). Considerando

o Estado de São Paulo, a referida variedade foi registrada em sistemas aquáticos do Jardim Botânico de São Paulo, Município de São Paulo e mais cinco municípios paulistas: Atibaia, Bragança Paulista, Miracatu, Pirassununga e Socorro (Bicudo *et al.* 2015).

Apesar dos numerosos estudos sobre taxonomia clássica (nível α) e do crescente aumento no número das pesquisas subsidiadas pela taxonomia polifásica (nível ω), ainda é possível observar importantes lacunas quanto à resolução de problemas relacionados com a sistemática, taxonomia e nomenclatura de muitas espécies de microalgas, mesmo as de *Micrasterias*, que é um dos gêneros de algas mais bem estudado e conhecido tanto no que tange à taxonomia clássica quanto a outras áreas do conhecimento (Meindl 1993).

Dispõe-se hoje de pouco conhecimento sobre a posição filogenética de *M. denticulata* e *M. thomasi* (apenas de uma cepa de cada uma destas espécies) e, por conseguinte, sobre o real valor taxonômico de ambas como espécies distintas do ponto de vista genético (Škaloud *et al.* 2011). No que diz respeito à morfologia, ambas as espécies compartilham muitas semelhanças e podem, consequentemente, ser consideradas espécies complexas e problemáticas dos pontos de vista taxonômico e nomenclatural.

Isto decorre, especialmente, das inúmeras variedades taxonômicas documentadas para essas espécies que podem estar, muitas vezes, mal identificadas, adicionado à carência de parâmetros ou características que, de fato, as diferencie. É evidente, portanto, que o complexo de espécies *M. denticulata*-*M. thomasi* requer revisão em sua filogenia e morfologia, visando a explorar e aprofundar o conhecimento sobre o grau de diversidade e proximidade existente entre ambas as espécies.

5. REFERÊNCIAS CITADAS

- Agardh, C.A.** 1827. Aufzählung einiger in den österreichischen Landern gefundenen neuen Gattungen und Arten von Algen, nebst ihrer Diagnostik und beigefügten Bemerkungen. Flora 10: 625-646.
- Archer, W.** 1862. Description of a new species of *Micrasterias* (Ag. et Aliorum, non Ehr.), with remarks on the distinctions between *Micrasterias rotata* (Ralfs) and *M. denticulata* (Bréb.). Quarterly Journal of Microscopical Science, nov. sér. 2: 236-247.
- Bicudo, C.E.M.** 1972. Revisão do gênero *Arthrodesmus*, das desmidiáceas (Chlorophyceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 686 p.
- Bicudo, C.E.M. & Menezes, M.** 2017. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. RiMa Editora, São Carlos. 552 p.
- Bicudo, C.E.M., Schetty, S.P. & Castro-Pinto, L.S.** 2015. Zygnemaphyceae. In: Bicudo, C.E.M. (Ed.), Flora ficológica do Estado de São Paulo. Vol. 4(2). RiMa Editora, São Carlos. 165 p.

- Biolo, S.** 2016. O gênero *Cosmarium* Corda ex Ralfs (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento taxonômico das formas com parede celular decorada. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 357 p.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J.** 1985. Introduction to the algae: structure and reproduction. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 719 p.
- Brook, A.J.** 1981. The biology of desmids. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 276 p.
- Černá, K. & Neustupa, J.** 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiales (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. *Aquatic Ecology* 44: 409-419.
- Coesel, P.F.M.** 1996. The Dutch representatives of *Staurostrum manfeldtii* complex (Desmidiaceae, Chlorophyta): a taxonomic revision. *Nordic Journal of Botany* 16: 99-106.
- Coesel, P.F.M. & Meesters, K.J.** 2007. Desmids of the Lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands. KNNV Publishing, Utrecht. 352 p.
- Daly, H. V.** 1985. Insect morphometrics. *Annual Review of Entomology* 30(1): 415-438.
- Felisberto, S.A. & Rodrigues, L.** 2011. Desmídias epifíticas do reservatório de Rosana, bacia do rio Paranapanema, Paraná/São Paulo, Brasil: *Euastrum* e *Micrasterias* (Desmidiaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 9: 206-213.
- Gerrath, J.S.** 2003. Conjugating green algae and desmids. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G. & Kociolek, J.P. (eds), *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier Science Academic Press, Amsterdam. p. 353-352.
- Gontcharov, A.A.** 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea* 8: 87-104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B. & Melkonian, M.** 2004. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Molecular Biology and Evolution* 21(3): 612-624.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M.** 2010. Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* gen. nov. *Journal of Phycology* 46: 346-362.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** 2024. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M. & Delwiche, C.F.** 2008. Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology* 44: 467-477.
- Kouwets, F.A.C.** 2008. The species concepts in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. *Biologia* 63: 877-883.

- Leebens-Mack, J., Barker, M., Carpenter, E., Deyholos, M., Gitzendanner, M., Graham, S., Grosse, I., Li, Z., Melkonian, M., Mirarab, S., Porsch, M., Quint, M., Rensing, S., Soltis, D., Soltis, P., Stevenson, D., Ullrich, K., Wickett, N., DeGironimo, L., Edger, P., Jordon-Thaden, I., Joya, S., Liu, T., Melkonian, B., Miles, N., Pokorny, L., Quigley, C., Thomas, P., Villarreal, J., Augustin, M., Barrett, M., Baucom, R., Beerling, D., Benstein, R., Biffin, E., Brockington, S., Burge, D., Burris, J., Burris, K., Burtet-Sarramegna, V., Caicedo, A., Cannon, S., Cebi, Z., Chang, Y., Chater, C., Cheeseman, J., Chen, T., Clarke, N., Clayton, H., Covshoff, S., Crandall-Stotler, B., Cross, H., DePamphilis, C., Der, J., Determann, R., Dickson, R., Stilio, V., Ellis, S., Fast, E., Feja, N., Field, K., Filatov, D., Finnegan, P., Floyd, S., Fogliani, B., Garcia, N., Gateble, G., Godden, G., Goh, Q.-Y., Greiner, S., Harkess, A., Heaney, J., Helliwell, K., Heyduk, K., Hibberd, J., Hodel, R., Hollingsworth, P., Johnson, M., Jost, R., Joyce, B., Kapralov, M., Kazamia, E., Kellogg, E., Koch, M., Konrat, M., Konyves, K., Kutchan, T., Lam, V., Larsson, A., Leitch, A., Lentz, R., Li, F.-W., Lowe, A., Ludwig, M., Manos, P., Mavrodiev, E., McCormick, M., McKain, M., McLellan, T., McNeal, J., Miller, R., Nelson, M., Peng, Y., Ralph, P., Real, D., Riggins, C., Ruhsam, M., Sage, R., Sakai, A., Scascitella, M., Schilling, E., Schlosser, E.-M., Sederoff, H., Servick, S., Sessa, E., Shaw, A., Shaw, S., Sigel, E., Skema, C., Smith, A., Smithson, A., Stewart, C., Stinchcombe, J., Szovenyi, P., Tate, J., Tiebel, H., Trapnell, D., Villegente, M., Wang, C.-N., Weller, S., Wenzel, M., Weststrand, S., Westwood, J., Whigham, D., Wu, S., Wulff, A., Yang, Y., Zhu, D., Zhuang, C., Zuidof, J., Chase, M., Pires, J., Rothfels, C., Yu, J., Chen, C., Chen, L., Cheng, S., Li, J., Li, R., Li, X., Lu, H., Ou, Y., Sun, X., Tan, X., Tang, J., Tian, Z., Wang, F., Wang, J., Wei, X., Xu, X., Yan, Z., Yang, F., Zhong, X., Zhou, F., Zhu, Y., Zhang, Y., Ayyampalayam, S., Barkman, T., Nguyen, N.-P., Matasci, N., Nelson, D., Sayyari, E., Wafula, E., Walls, R., Warnow, T., An, H., Arrigo, N., Baniaga, A., Galuska, S., Jorgensen, S., Kidder, T., Kong, H., Lu-Irving, P., Marx, H., Qi, X., Reardon, C., Sutherland, B., Tiley, G., Welles, S., Yu, R., Zhan, S., Gramzow, L., Theissen, G. & Wong, G.K.-S. 2019. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature* 574: 679-685.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F. & De Clerck, O. 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 1-46.
- McCourt, R.M., Karol, K.G., Bell, J., Helm-Bychowski, K.M., Grajewska, A., Wojciechowski, M.F. & Hoshaw, R.W. 2000. Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemaphyceae) based on *rbcL* sequences. *Journal of Phycology* 36: 747-758.

- Meindl, U.** 1993. *Micrasterias* cells as a model system for research on morphogenesis. Microbiological Reviews 57: 415-433.
- Monteiro, L.R. & Reis, S.F.** 1999. Princípios de Morfometria Geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brasil. 189 p.
- Neustupa, J.** 2017. Asymmetry and integration of cellular morphology in *Micrasterias compereana*. BMC Evolutionary Biology 17(1): 1-16.
- Neustupa, J., Škaloud, P. & Št'astný, J.** 2010. The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. Journal of Phycology 46: 703-714.
- Neustupa, J. & Woodard, K.** 2020. Geometric morphometrics reveals increased symmetric shape variation and asymmetry related to lead exposure in the freshwater green alga *Micrasterias compereana*. Ecological Indicators 111: 106054.
- Oliveira, I.B.** 2011. Zygnematophyceae (Streptophyta) da Área de Proteção Ambiental Litoral Norte, Bahia, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 670 p.
- Prescott, G.W., Croasdale, H.T. & Vinyard, W.C.** 1977. A synopsis of North American desmids. University of Nebraska Press, Lincoln. Vol. 2(2). 413 p.
- Ralfs, J.** 1848. The British Desmidiaceae. Reeve, Benham & Reeve, London. 226 p.
- Rohlf, F.J.** 2017. Programs. Departament of Ecology and Evolution. Disponível em: life.bio.sunysb.edu/morph/
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F.** 1993. A revolution morphometrics. Trends in Ecology & Evolution 8(4): 129-132.
- Santos, M.A.** 2016. *Micrasterias* C.Agardh ex Ralfs emend. **Škaloud**, Nemjová, Veselá, Cerna & Neustupa (Desmidiaceae, Conjugatophyceae) da região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 146 p.
- Savriama Y., Neustupa J., Klingenberg C.P.** 2010. Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotata* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). Nova Hedwigia Suppl. 136 43-54
- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Cerná, K. & Neustupa, J.** 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 933-943.
- Škaloud, P., Št'astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Pouličková, A. & Neustupa, J.** 2012. Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). Plant Systematics and Evolution 298: 1281-1292.

- Škaloud, P., Steinová, J., Rídká, T., Vancurová, L. & Peksa, O.** 2015. Assembling the challenging puzzle of algal biodiversity: species delimitation within the genus *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 51: 507-527.
- Sormus, L.** 1980. Revisão dos grupos de espécies *arcuata* e *laticeps* do gênero *Micrasterias* (Zygnemaphyceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 204 p.
- Spijkerman, E., García-Mendoza, E., Matthijs, H. C., van Hunnik, E. & Coesel, P.F.M.** 2004. Negative effects of P-buffering and pH on photosynthetic activity of planktonic desmid species. *Photosynthetica* 42(1): 49-57.
- Šťastný, J., Škaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K. & Neustupa, J.** 2013. Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology* 49: 401-416.
- Wehr, J.D. & Sheat, R.G.** 2003. *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. 917 p. 1^a ed.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, C., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.-J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.-S. & Leebens-Mack, J.** 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(45): E4859-4868.
- Wodniok, S., Brinkmann, H., Glöckner, G., Heide, A.J., Philippe, H., Melkonian, M. & Becker, B.** 2011. Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? *BMC Evolutionary Biology* 11: 104.
- Zhou, H. & Schwartzberg, K.** 2020. Zygnematophyceae: from living algae collections to the establishment of future models. *Journal of Experimental Botany* 71: 3296-3304.
- Zhong, B., Xi, Z., Goremykin, V.V., Fong, R., Mclenachan, P.A., Novis, P.M., Davis, C.C. & Penny, D.** 2013. Streptophyte algae and the origin of land plants revisited using heterogeneous models with three new algal chloroplast genomes. *Molecular Biology and Evolution* 31(1): 177.

Justificativa, hipótese e objetivos

1. Justificativa

1.1. Perguntas

1. Os táxons infraespecíficos descritos para *M. denticulata* e *M. thomasi* representam unidades taxonômicas bem definidas do ponto de vista filogenético e molecular?
2. As análises morfológicas (medidas lineares e forma) serão capazes de diferenciar as espécies entre si assim como suas categorias infraespecíficas?
3. Com uso da abordagem polifásica haverá alguma alteração em relação a classificação e quantidade de táxons infraespecíficos registrados para cada uma das duas espécies estudadas?

1.2. Hipótese

Sob uma abordagem polifásica, os táxons infraespecíficos previamente descritos para *Micrasterias denticulata* e *Micrasterias thomasi* representam unidades taxonômicas definidas a partir de perspectivas filogenéticas e moleculares. Além disso, as análises morfológicas, incluindo medidas lineares e forma, são esperadas para demonstrar a capacidade de distinguir entre as espécies e suas categorias infraespecíficas. Como resultado dessa abordagem polifásica, é possível que ocorram modificações na classificação taxonômica e na quantidade de táxons infraespecíficos registrados para cada uma das duas espécies em estudo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Geral

Ampliar o conhecimento sobre a caracterização, variabilidade morfológica e filogenia de *M. denticulata* e *M. thomasi* e suas categorias infraespecíficas a partir da análise de dados provenientes da literatura clássica e de amostras mantidas sob condições de cultivo.

1.3.2. Específicos

- 1) Utilizar as morfometrias clássica e geométrica para avaliar os caracteres morfológicos e métricos em *M. denticulata* e *M. thomasi* a partir de dados da literatura e de condições de cultivo;

- 2) Isolar eventuais morfotipos e/ou unidades taxonômicas representativas das duas espécies de interesse;
- 3) Caracterizar filogeneticamente as cepas cultivadas;
- 4) Propor caracteres que melhor diferenciem as espécies; e
- 5) Revisar a taxonomia e a nomenclatura com base em evidências morfológicas e moleculares.

Capítulo 1

ANÁLISE TAXONÔMICA E NOMENCLATURAL DAS ESPÉCIES *MICRASTERIAS DENTICULATA* E *MICRASTERIAS THOMASIANA* (DESMIDIACEAE, ZYGNEMATOPHYCEAE)

1. INTRODUÇÃO

O termo taxonomia deriva do grego *táxis* (τάξις) “ordem” + *nomia* (νομία) “método” e refere-se à disciplina biológica que define os grupos de organismos biológicos com base em características comuns e dá nomes a esses grupos. É a ciência da identificação, a mais antiga e essencial desde os primórdios da humanidade, porém, não tão valorizada nos tempos atuais. Mesmo sendo fundamental e imprescindível, a taxonomia é frequentemente entendida como ultrapassada, enfrentando forte diminuição de seu reconhecimento (Bicudo 2002).

Para auxiliar na descrição taxonômica de um novo organismo na área da Botânica, foi criado um sistema simples e preciso para sua identificação, no qual os pesquisadores se baseiam quando lhes compete decidir como nomear corretamente uma determinada descoberta botânica (Rodrigues 2003).

O “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” constitui uma obra essencial no campo da taxonomia, pois fornece diretrizes para a criação e alteração de nomes de organismos (Turland *et al.* 2018). O Código teve origem nos aforismos apresentados por Linnaeus em 1737, os quais foram posteriormente expandidos nos “Princípios de Nomenclatura” em 1751. Linnaeus (1751) foi o primeiro autor a usar consistentemente a nomenclatura binomial, exigindo dois nomes para cada espécie, dos quais o primeiro é um substantivo e refere-se ao gênero e o segundo é um epíteto específico (Rodrigues 2003).

Entretanto, o “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” só começou a existir a partir do 1º Congresso Internacional de Botânica realizado em Paris, quando se discutiu e aprovou as “Lois de la nomenclature botanique” apresentadas por De Candolle (1867) e das quais surgiu o autêntico “Código Internacional de Nomenclatura Botânica”, conhecido também como Código de Paris (Greuter *et al.* 2003).

O processo para nomear um organismo na taxonomia envolve mais do que apenas escolher o nome. Exige um método rigoroso estabelecido no Código de Nomenclatura. Assim, um nome deve cumprir vários requisitos para ser reconhecido como validamente publicado (Turland *et al.* 2018), que incluem: (1) **descrição** detalhada do organismo, que deve ser suficientemente clara e precisa para permitir que os demais pesquisadores identifiquem precisamente e individualizem o organismo; (2) **ilustração** do organismo descrito para permitir um recurso visual para sua melhor identificação; (3) **espécie-tipo (tipo nomenclatural)** que é uma amostra específica ou ilustração, que serve como ponto de referência permanente para o nome; e (4) **localidade-tipo** ou registro do local onde o organismo foi primeiro encontrado, que possibilita contextualizar a espécie em seu hábitat natural e pode fornecer informação importante sobre sua ecologia e evolução (Turland *et al.* 2018).

A aplicação rigorosa das regras do Código Internacional de Nomenclatura é capital para a publicação de novos nomes de organismos, sendo imperativo seguir os procedimentos específicos descritos no Código (Turland *et al.* 2018).

O Código passa por revisões periódicas, a aproximadamente cada cinco anos, durante a chamada Sessão de Nomenclatura que imediatamente antecede um Congresso Internacional de Botânica. O último Congresso ocorreu em Shenzhen, China, em 2017; e o próximo acontecerá em Madrid, Espanha, em julho do corrente ano de 2024. Tais atualizações são fundamentais para garantir um sistema eficiente e padronizado de nomenclatura para a comunidade científica dos taxonomistas, mantendo a precisão e a consistência da nomenclatura taxonômica de algas, fungos e plantas. A cada atualização, os trabalhos publicados após a data de revisão do Código devem seguir as novas normas para torná-los validamente publicados (Turland *et al.* 2018).

O Código determina datas que dizem respeito à publicação dos nomes e as principais datas existentes no Código Internacional de Nomenclatura (ICN) relevantes para a nomenclatura das algas são:

- **1º de janeiro de 1753** é o ponto oficial de partida para a nomenclatura das algas, fungos e plantas e refere-se à data de publicação da primeira edição do “Species Plantarum” de Karl von Linné.
- **1º de janeiro de 1848** é o ponto oficial de partida para a nomenclatura das algas da família Desmidiaceae (John Ralfs, “The British Desmidiaceae”).
- **1º de janeiro de 1892** é o ponto oficial de partida para os estudos nomenclaturais das algas diatomáceas, coincidindo com a publicação de importante trabalho de van Heurck.
- **1º de janeiro de 1958** é ponto oficial de partida para os estudos nomenclaturais de alguns grupos de algas verdes e vermelhas.

A nomenclatura dos representantes da classe Zygnematophyceae apresentou, por muito tempo, divergências entre o termo Conjugatophyceae comumente utilizado na Europa Central e baseado no

tipo de reprodução sexuada (conjugação) apresentado pelos organismos incluídos nessa classe (Engler & Prantl 1892) e o termo Zygnemaphyceae utilizado em outras regiões do Globo e proposto por Round (1971) com referência ao gênero *Zygnema* C.Agardh, o mais antigo validamente publicado dentro da classe, o qual foi popularizado por van-den-Hoek *et al.* (1995) e amplamente utilizado pela comunidade científica.

Guiry (2013) providenciou a diagnose para o nome Conjugatophyceae validando-o, conforme os Art. 16.1 e 16.3 do Código Internacional de Nomenclatura (Biolo 2016, Turland *et al.* 2018). Na obra considerada ponto oficial de partida para estudos taxonômicos e nomenclaturais em Desmidiaceae, Ralfs (1848) listou e descreveu 13 espécies de *Micrasterias* caracterizadas pelo formato da célula e suas dimensões, além de citar os autores que originalmente as descreveram. Mencionou também os locais onde a presença desses organismos foi registrada e incluiu ilustração para cada uma das espécies validando, dessa forma, os nomes dos materiais descritos e publicados anteriormente (Sormus & Bicudo 1997).

O gênero *Micrasterias* foi proposto por Carl A. Agardh em 1827 e validado por John Ralfs em 1848. Seu nome deriva do grego e significa “pequena estrela”, fazendo referência à forma extremamente complexa de suas células. O gênero está incluído na classe Zygnematophyceae, ordem Desmidiales e família Desmidiaceae (Ralfs 1848, Guiry & Guiry 2024). Conforme registrado no banco de dados AlgaeBase existem, atualmente, 101 espécies e 311 táxons de níveis infraespecíficos (variedade e forma taxonômica) referentes ao gênero *Micrasterias* (Guiry & Guiry 2024).

Micrasterias furcata C.Agardh *ex* Ralfs é a espécie-tipo do gênero *Micrasterias*, uma decisão cujo objetivo foi fornecer uma referência precisa e clara sobre o que é o gênero (Sormus & Bicudo 1997).

Micrasterias denticulata foi descrita por Brébisson (1835: pl. 7, fig. 24), com base em material coletado em um lago em Falaise, França e, posteriormente, validada por Ralfs (1848: 269, pl. 7, fig. 1a célula inteira, 1b célula em divisão). *Micrasterias thomasi* foi descrita por Archer (1862) a partir de uma amostra coletada de uma grande lagoa perto de Old Gable, Featherbed Mountain, em Dublin, Irlanda. Nesse trabalho, Archer (1862) comparou a nova espécie com duas outras morfologicamente semelhantes, *Micrasterias rotata* Ralfs e *Micrasterias denticulata* Brébisson *ex* Ralfs destacando, inicialmente, suas semelhanças como a presença de projeções apiculadas na base dos segmentos e intumescências ornamentais superficiais, características estas comuns às três espécies. Em seguida, o referido autor descreveu as características diagnósticas de *M. thomasi* W.Archer e das outras duas espécies, além de indicar como principais diferenças entre sua espécie e as duas outras o tamanho da célula, a configuração dos lobos basais, a margem terminal do lóbulo de última ordem e a presença de intumescências na superfície da célula (Archer 1862).

Micrasterias denticulata Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer embora sejam atualmente reconhecidas como espécies distintas do ponto de vista morfológico (Ralfs 1848, Archer 1862) e do molecular (Škaloud *et al.* 2011), as duas apresentam forma celular bastante similar, o que dificulta, em vários casos, sua identificação e diferenciação precisas com base apenas nas características morfológicas e medidas celulares lineares.

Krieger (1939) reuniu as duas espécies e *M. verrucosa* Bisset em um grupo que denominou *denticulata*. Segundo o mesmo autor, as três espécies apresentam o ápice dos lobos polar e laterais levemente côncavos e dotados de denticulos (pequenos espinhos) angulares, de onde o epíteto *denticulata* (Krieger 1939).

Micrasterias denticulata Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer são consideradas um complexo de espécies devido à sua proximidade morfológica. A denominação “complexo” identifica um grupo de espécies intimamente relacionadas, isto é, que apresentam morfologia bastante semelhante, o que torna sua separação algumas vezes problemática e até mesmo impossível (Longo 2005). Essas espécies podem ser tão semelhantes morfolologicamente entre si que são comumente confundidas umas com as outras (West 1909, Borge 1918).

Além disso, existe o problema nomenclatural nessas duas espécies que perdura desde o século XIX, além do elevado número de variedades e formas taxonômicas documentadas para ambas (Guiry & Guiry 2024).

Conforme observado por Krieger (1939) quando realizou o inventário florístico das variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer ocorrentes na Alemanha, Áustria e Suíça, alguns autores consideraram as duas espécies sinônimos taxonômicos (heterotípicos). Assim, com exemplos, Jacobsen (1876) identificou *M. denticulata* Brébisson f. *thomasi* (W.Archer) Jacobsen e Dick (1930) *M. denticulata* Brébisson que Krieger (1939) considerou sinônimos de *M. thomasi* W.Archer. A própria variedade *M. thomasi* W.Archer var. *notata* proposta por Grönblad (1920) tem como basônimo *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *notata* Nordstedt que, segundo Krieger (1939), tem como sinônimos *M. denticulata* Jacobsen descrita por Jacobsen (1876) e *M. denticulata* Brébisson var. *subnotata* W.West descrita por West (1892) e registrada em West & West (1905).

No que diz respeito a *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs, existem alguns materiais que possuem certa relação morfológica com *M. thomasi* W.Archer (Krieger 1939) como, por exemplo, a variedade *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *intermedia* Nordstedt proposta em Nordstedt (1887) e registrada em Borge (1918) e Grönblad (1921); e a nova variedade proposta por Krieger (1939), *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger, que tem como basônimo *M. thomasi* W.Archer identificada em Taylor (1935).

De acordo com o banco de dados AlgaeBase, existe atualmente 37 registros entre variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs (Guiry & Guriy 2024). E para *M. thomasi* W.Archer há 17 registros entre variedades e formas taxonômicas (Guiry & Guiry 2024).

Dessa forma, devido ao elevado número de categorias infraespecíficas e a proximidade morfológica entre *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs e *M. thomasi* W.Archer faz-se necessária e urgente a revisão taxonômica e nomenclatural dessas espécies com base na análise dos requisitos propostos pelo “Código Internacional de Nomenclatura Botânica para Algas, Fungos e Plantas” (Turland *et al.* 2018).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado intenso levantamento bibliográfico das obras clássicas e mais recentes em que foram registradas as espécies, variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs e *M. thomasi* W.Archer consultando, entre tantas, obras como:

- The British Desmidiaceae (Ralfs 1848).
- Quarterly Journal of Microscopical Science. Descrição de uma nova espécie de *Micrasterias* (Archer 1862).
- British Desmids: a supplement to British freshwater Algae (Cooke 1887).
- Freshwater algae collected by Dr S. Berggren in New Zealand and Australia (Nordstedt 1888).
- Essai d’une monographie locale des Conjugées (Gay 1884).
- A contribution to the freshwater algae of Ceylon (West & West 1902).
- A Monograph of the British Desmidiaceae (West & West 1905).
- The Journal of the Linnean Society (West 1909).
- Finnlandische Desmidiaceen aus Keuru (Grönblad 1920).
- Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten (Krieger 1939).
- Le Naturaliste Canadien (Irénée-Marie 1951).
- Taxonomical studies on the genus *Micrasterias* with special reference to the species of Japan and its surrounding areas (Okada 1952).
- Indonesian Desmids (Scott & Prescott 1961).
- A Synopsis of North American Desmids, 2. Desmidiaceae: Placodermatae (Prescott *et al.* 1977).

Os dados obtidos através do banco de dados AlgaeBase foram tabulados em uma planilha Excel 2016 com a seguinte informação: nome da espécie e da variedade, autor do nome e ano da descrição original, além da descrição detalhada do organismo, do local de ocorrência e a ilustração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Classe Zygnematophyceae Round

Ordem Desmidiales (Meneghini) Pascher

Família Desmidiaceae Ralfs

Gênero *Micrasterias* C.Agardh ex Ralfs

Espécie *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs

3.1. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs

Micrasterias denticulata Brébisson, Algues de Environs de Falaise. 54, pl. 8. 1835.

Micrasterias denticulata Brébisson ex Ralfs, The British Desmidiaceae. 70, pl. 7, fig. 1a, b. 1848.

Descrição: célula orbicular, lisa, segmentos divididos em cinco lobos, lobos divididos dicotomicamente, as últimas subdivisões truncado-emarginadas, ângulos arredondados.

Medidas: comprimento 224,78 µm, largura 184,06 µm, largura do istmo 33-34 µm (Brébisson 1835).

Ilustração: Ralfs (1848: 70, pl. 7, fig. 1a).

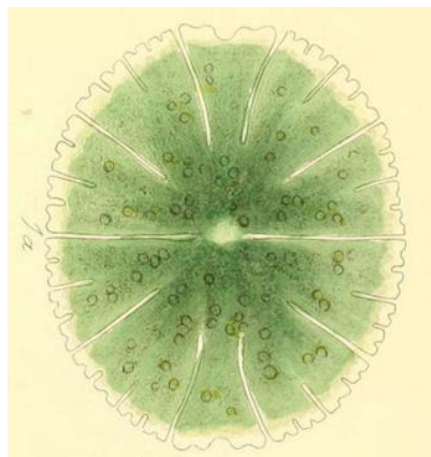


Figura 1. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs (Figura de Ralfs 1848).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *angulosa* (Hantzsch) West & G.S. West**

Transactions of the Royal Irish Academy: seção B, 32: 30. 1902.

Basiônimo: *Micrasterias angulosa* Hantzsch, Abhandlungen der Naturhistorischen Gesellschaft zu Nürnberg 3(2): 121, pl. 21. 1866.

Descrição: células mais angulares do que na variedade-tipo, muitas vezes pouco mais largas perto dos polos, lobos laterais divididos apenas por incisões primárias e secundárias, quatro subdivisões truncadas com ângulos arredondados, lobo polar retuso ou retuso-emarginado, parede celular distinta e densamente pontilhada.

Medidas: comprimento 210-282 µm, largura 184-230 µm, largura istmo 30-33 µm.

Localidade-tipo: lago Akibbon, Donegal, Irlanda.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 50, fig. 4).

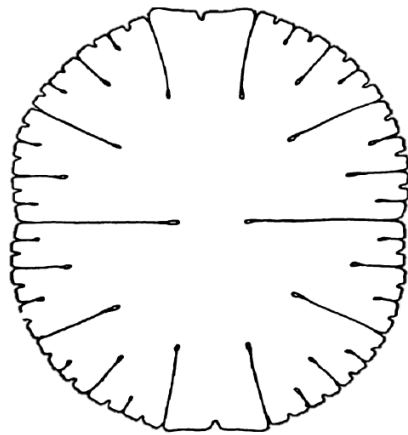


Figura 2. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *angulosa* (Hantzsch) West & G.S. West (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *angustosinuata* F.Gay**

Essai d'une monographie locale des Conjugées. 52, pl. 1, fig. 4. 1884.

Descrição: células mais angulosas que na variedade-tipo, incisões fechadas, muito estreitas, subdivisões dos lobos laterais variáveis, levemente emarginadas, arredondadas.

Medidas: comprimento 250-260 µm, largura 186-220 µm, largura do istmo 30 µm.

Localidade-tipo: lagoas e riachos de região montanhosa (vales de Aigoual, Saumail, Margeride, Châteauneuf-de Randon e Gourgons) Cévennes, França.

Ilustração: Gay (1884: pl. 1, fig. 4).

Comentários: Segundo West & West (1905), esta variedade pode ser mais adequadamente considerada um sinônimo taxonômico (heterotípico) da var. *angulosa* (Hantzsch) West & West da espécie, pois inclui formas angulares nas quais as incisões são fechadas e lineares. Os referidos autores consideraram sua distribuição geográfica mais ampla do que sugerem as localidades registradas, mas que sua catalogação, frequentemente, passa despercebida (West & West 1905).

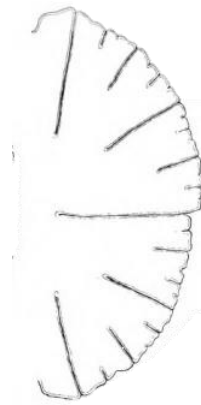


Figura 3. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *angustosinuata* F.Gay (Figura de Gay 1884).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *japonica* (R.Fujisawa) Y.Okada**

Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University 2(1): 113, pl. 6, fig. 1. 1952.

Basiônimo: *Micrasterias rotata* (Greville) Ralfs var. *japonica* R.Fujisawa, Natural History Magazine 14(58): 14, pl. 2, fig. 6 a, b. 1936.

Descrição: células com lobos polares pouco projetados além dos lobos laterais, lobo polar cuneiforme, pouco dilatado no ápice, levemente côncavo, ângulos apicais nitidamente truncados, pontiagudos.

Medidas: comprimento 246-259 μm , largura 212-227 μm , largura do istmo 30-59 μm .

Localidade-tipo: Vale Takadori, Japão.

Ilustração: Okada (1952: pl. 6, fig. 1).

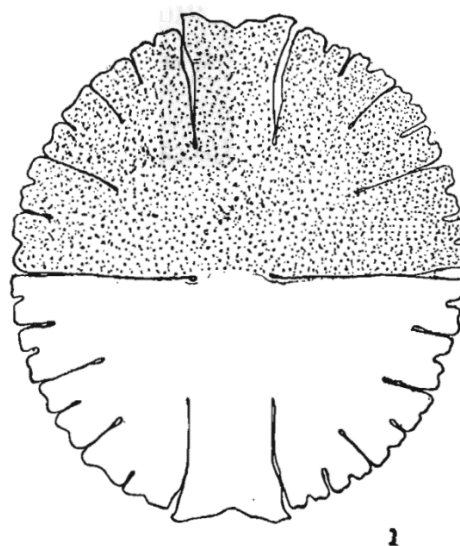


Figura 4. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *japonica* (R.Fujisawa) Y.Okada (Figura de Okada 1952).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *africana* Claassen**

Bothalia 7(3): 585, pl. 11, fig. 1-4, pl. 12, fig. 1. 1961.

Descrição: lobo polar mais largo e mais curto, incisões interlobares mais rasas.

Medidas: comprimento 234-248 μm , largura 196-220 μm , largura do istmo 32-40 μm .

Localidade-tipo: lagos de fazenda nos distritos de Warmbaths, Nylstroom e Naboom, África do Sul.

Ilustração: Claassen (1961: pl. 11, fig. 1).

Comentários: Difere da var. *angustosinuata* F.Gay por ter lobo polar mais curto e mais largo e incisões interlobares proporcionalmente mais rasas. Alguns exemplares (Claassen 1961: pl. 12, fig. 1) apresentaram os lobos polares levemente projetados.

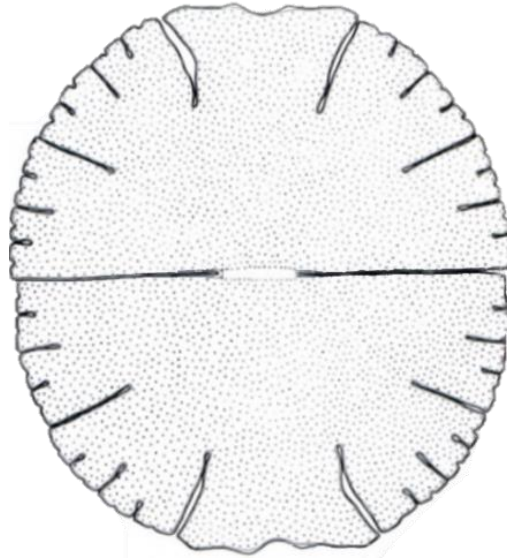


Figura 5. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *africana* Claassen (Figura de Claassen 1961).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger**

Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten 2(1): 108, pl. 137, fig. 7. 1939.

Descrição: as três intumescências supraistmiais são mais evidentes do que na variedade-tipo da espécie, intumescência central ampla e truncada.

Medidas: comprimento 226 µm, largura 188 µm, largura do istmo 26 µm.

Localidade-tipo: Newfoundland, Canadá.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 137, fig. 7).

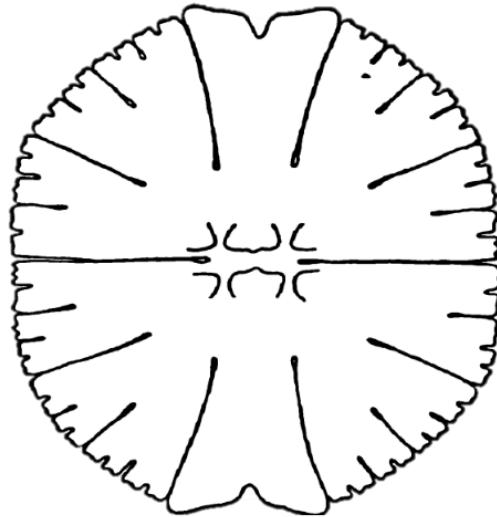


Figura 6. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger f. *mammillata* Prescott & Scott**

Transactions of the American Microscopical Society 71(3): 234, pl. 4, fig. 1. 1952.

Descrição: os representantes desta forma apresentam 2 intumescências proeminentes no lobo polar, 1 em cada lado da depressão mediana apical, 3 protuberâncias acima da região do istmo, célula amplamente elíptica, 5-lobada, base da semicélula em vista apical estreitamente elíptica, 3 intumescências proeminentes, amplamente convexas.

Medidas: comprimento 197-208 µm, largura 178-184 µm, largura do istmo 24-25 µm.

Localidade-tipo: Flórida, E.U.A.

Ilustração: Prescott & Scott (1952: pl. 136, fig. 2).

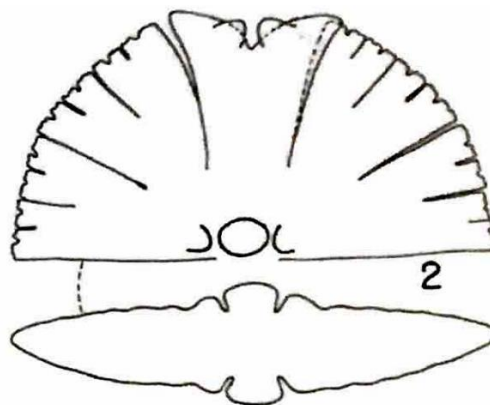


Figura 7. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger f. *mammillata* Prescott & Scott (Figura de Scott & Prescott 1952).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *basiprotuberans* C.Bullard**

In: Collins, Holden & Setchell, Phycotheca Boreali-Americana 40: n° 1724. 1914.

Descrição: célula com 3 projeções supraistmiais mais ou menos arredondadas em cada semicélula, às vezes 1 intumescência menor no lobo polar de cada lado da depressão apical.

Medidas: comprimento 227-230 µm, largura 195-205 µm, largura do istmo 38-46 µm.

Localidade tipo: Massachusetts, E.U.A.

Ilustração: Prescott *et al.* (1977: pl. 136, fig. 3, 4).

Comentários: Prescott *et al.* (1977) observaram material preservado seco que continha vários espécimes em condições não muito boas de preservação, mas identificáveis com os representantes de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e, provavelmente, com a alga posteriormente descrita como var. *taylorii* Willi Krieger da mesma espécie. Segundo Prescott *et al.* (1977), há dúvida sobre a nomenclatura correta para esta variedade. Se for confirmado que a variedade proposta por Collins *et al.* (1914) corresponde material idêntico ao da var. *taylorii* Willi Krieger, então o nome var. *basiprotuberans* C.Bullard tem prioridade sobre var. *taylorii* Willi Krieger em Krieger (1939) e este último seria um sinônimo heterotípico (taxonômico) da var. *basiprotuberans* C.Bullard.

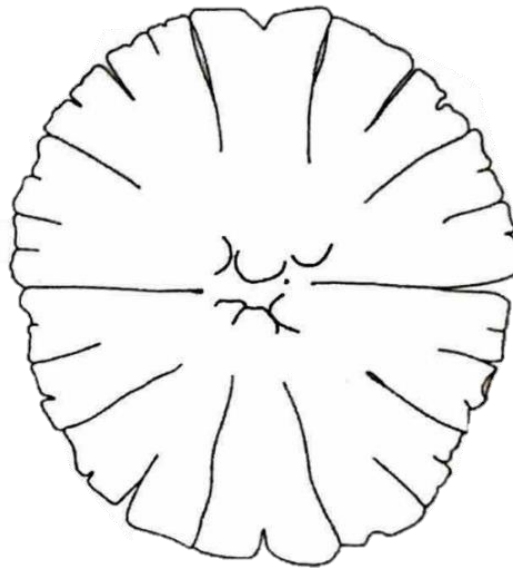


Figura 8. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *basiprotuberans* C.Bullard (Figura de Prescott et al. 1977).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *abrupta* Willi Krieger & P.Bourelly**

Ergebnisse der Deutschen limnologischen Venezuela-Expedition 1952, 1: 151. 1957.

Descrição: célula de tamanho grande, lobo polar bem desenvolvido, ângulos truncados, incisão mediana pouco marcada.

Medidas: comprimento 260-265 µm, largura 220-225 µm.

Localidade-tipo: Laguna de Macubaji, Venezuela.

Ilustração: Krieger & Bourrelly (1956: pl. 7, fig. 60, 61).

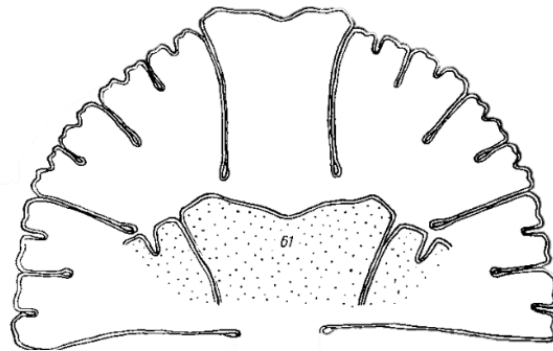


Figura 9. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *abrupta* Willi Krieger & P.Bourrelly (Figura de Krieger & Bourrelly 1956).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *intermedia* Nordstedt**

In: Wittrock & Nordstedt, *Algae Acquae Dulcis Exsiccatae* 8: n° 370. 1880.

Descrição: lobos basal e laterais da semicélula divididos dicotomicamente 3 vezes, extremidades das divisões aconcavadas (retusas), ângulos pontiagudos, porém, não denticulados, lobo polar com o ápice plano em ambos os lados da depressão mediana.

Medidas: comprimento 210-220 µm, largura 174-180 µm.

Localidade-tipo: São Paulo, Brasil.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 138, fig. 1-3).

Comentários: Segundo Nordstedt (1880), esta variedade aproxima-se morfológicamente de *M. thomasi* W.Archer por conta de seus lobos laterais divididos dicotomicamente três vezes, cujas extremidades de última ordem são retusas e os ângulos pontiagudos, porém, não denticulados. Além disso, o lobo polar tem a margem superior plana em ambos os lados da retusidade mediana. Krieger (1939) as diferiu por conta dos lobos laterais de última ordem terem os ângulos acuminados, entretanto, desprovidos de espinhos como na variedade-tipo da espécie.

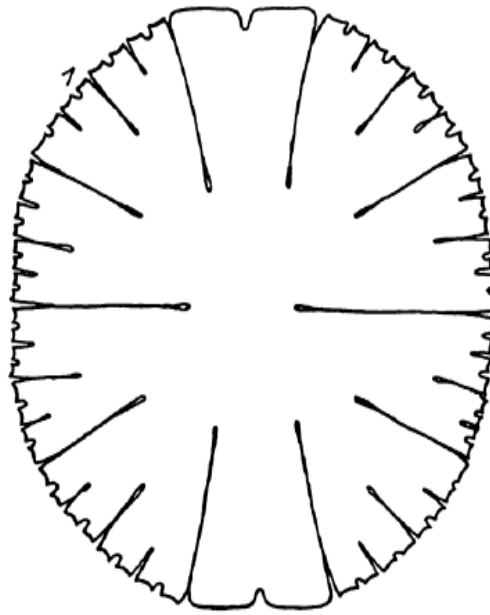


Figura 10. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *intermedia* Nordstedt (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *granulosa* Irénée-Marie**

Le Naturaliste Canadien 78: 183, pl. 1, fig. 5, 6. 1951.

Descrição: semicélulas com lobo polar mais curto, parede celular bastante granulosa, incisões interlobares fechadas em vista frontal, difíceis de observar nas células com pigmentação, incisões entre o lobo apical e os laterais bastante mais rasas, incisão apical profunda, margem dos lobos laterais do mesmo lado não formam uma curva regular, lóbulos muitas vezes formam ângulo entre si tirando da semicélula o aspecto semicircular, periferia celular densamente granulosa nas células com conteúdo protoplasmático, nas células vazias periferia mais definida.

Medidas: comprimento 159,5-196 μm , largura 138,5-177 μm , largura do istmo 29-32 μm , largura do lobo polar 54,7-62,8 μm .

Localidade-tipo: Québec, Canadá.

Ilustração: Irénée-Marie (1951: pl. 1, fig. 6).

Comentários: Segundo Irénée-Marie (1951), esta variedade é morfológicamente semelhante à típica da espécie, porém, menos alongada.

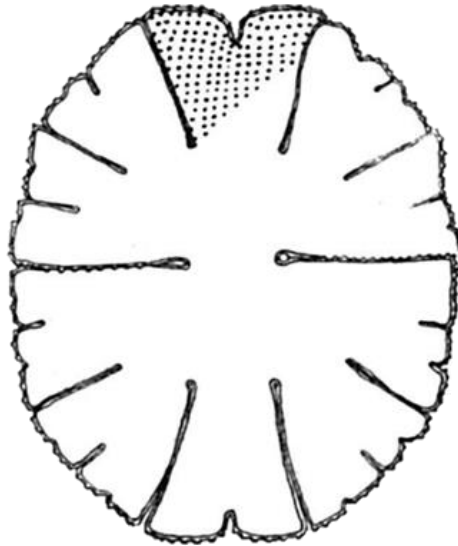


Figura 11. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *granulosa* Irénée-Marie (Figura de Irénée-Marie 1951).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *mucronata* Irénée-Marie**

Le Naturaliste Canadien 78: 182, pl. 1, fig. 4. 1951

Descrição: lobo polar menos profundamente escavado, 1 pequeno espinho quase horizontal em cada ângulo, lóbulos inteiros, não denticulados como na variedade-tipo, lóbulos inferiores apiculados de cada lado das incisões medianas, célula muito mais espessa no meio do que nas margens e não se mantém unida, nunca plana em uma preparação, estando sempre inclinada lateralmente, parede celular levemente granulada.

Medidas: comprimento 215-220 μm , largura 203-205 μm , largura do istmo 38-39,5 μm , largura do lobo polar 61-63 μm .

Localidade-tipo: Québec, Canadá.

Ilustração: Irénée-Marie (1951: pl. 1, fig. 4).

Comentários: Segundo Irénée-Marie (1951), o contorno celular nesta variedade é aproximadamente igual ao da variedade típica da espécie, mas difere pelo lobo polar menos profundamente escavado no ápice e terminando em um pequeno espinho quase horizontal em cada ângulo.

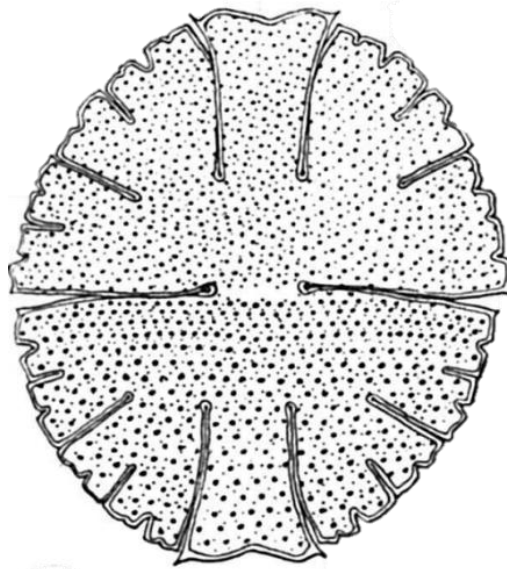


Figura 12. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *mucronata* Irénée-Marie (Figura de Irénée-Marie 1951).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *minnesotensis* W.B.Turner**

Journal of the Royal Microscopical Society: sér. 2, 5: 937, pl. 16, fig. 14. 1885.

Descrição: contorno geral da var. *minnesotensis* W.B.Turner segue de perto o da variedade-tipo da espécie, exceto pelo lobo polar, que tem extremidades pontiagudas e apresenta 1 intumescência terminal central ornamentada com 1 única série de poros ou grânulos arredondados.

Medidas: comprimento 266 μm , largura 252 μm , largura do istmo 39 μm , largura máxima do lobo polar 68 μm .

Localidade-tipo: Minnesota, E.U.A.

Ilustração: Turner (1885: pl. 26, fig. 14).

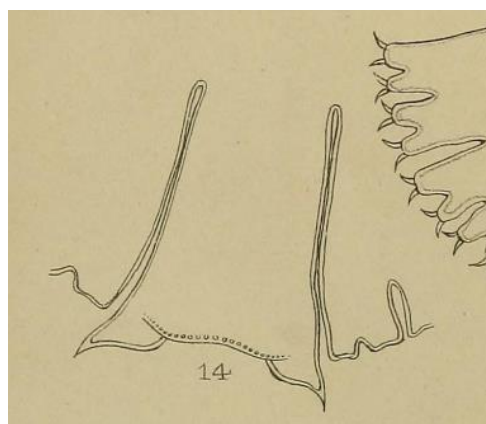


Figura 13. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *minnesotensis* W.B.Turner (Figura de Turner 1885).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *pseudojenneri* P.Bourrelly**

Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, sér. bot. 2: 30, pl. 8, fig. 1. 1957.

Descrição: célula de contorno alongado, elíptico ou retangular-arredondado, 1 vez mais longa que larga; lobo apical muito curto, 30-35 μm compr., 48-50 μm larg., 1 entalhe médio, por vezes emoldurado por 2 dentículos; lóbulos laterais de 3ª ordem na maioria das vezes ainda divididos, encimados por 4 dentículos; lobo lateral inferior de 1ª ordem altamente desenvolvido e, como resultado, a célula é alongada e assume a silhueta de *M. jenneri*; parte basal da semicélula com 1 protuberância saliente, pouco visível, logo acima do istmo.

Medidas: comprimento 180-190 μm , largura 122-125 μm , comprimento do lobo polar 30-35 μm , largura do lobo polar 48-50 μm .

Localidade-tipo: canal de irrigação, arredores de Kindia, Guiné, África.

Ilustração: Bourrelly (1975: pl. 8, fig. 1).

Comentários: esta variedade é morfológicamente próxima, principalmente, da var. *angulosa* (Hantzsch) West & G.S. West, embora também guarde certa semelhança com os representantes da var. *angulosinuata* F. Gay desta mesma espécie, porém, é menor em tamanho e apresenta os lobos mais recortados. Difere da var. *angulosa* por sua célula mais alongada, de contorno elíptico-retangular e margem dos lóbulos de 4ª ordem dos lobos basais.

A descrição original desta variedade data de 1957 e está em língua francesa, o que a torna validamente publicada, pois descrição e/ou diagnose em latim é exigida para as algas a partir de 1º de janeiro de 1958. Segundo Guiry & Guiry (2024), a entrada referente a esta variedade no AlgaeBase é preliminar e jamais foi verificada.

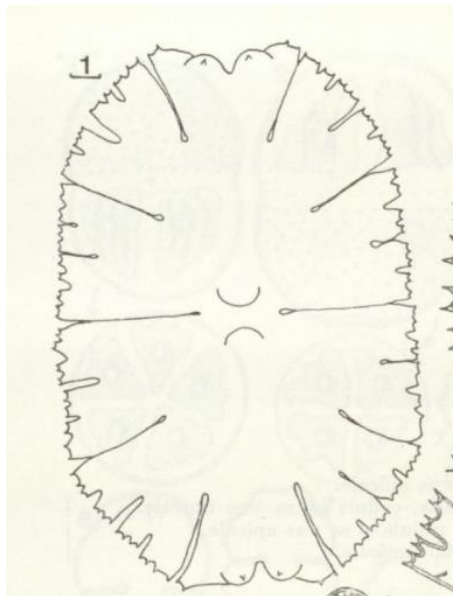


Figura 14. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *pseudojenneri* P. Bourrelly (Figura de Bourrelly 1975).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *lusitanica* J.Sampaio**

Brotéria 20: 35, pl. 1, fig. 2. 1922.

Descrição: difere da variedade típica da espécie por apresentar um pequeno círculo hialino distintamente delimitado no centro da célula.

Medidas: comprimento 250-280 µm, largura 210 µm.

Localidade-tipo: Alfena, região de Porto, Portugal.

Ilustração: Sampaio (1922: 24, pl. 1, fig. 2).

Comentários: Krieger (1939) não admitiu a existência desta variedade, identificando-a com a própria variedade-tipo da espécie.

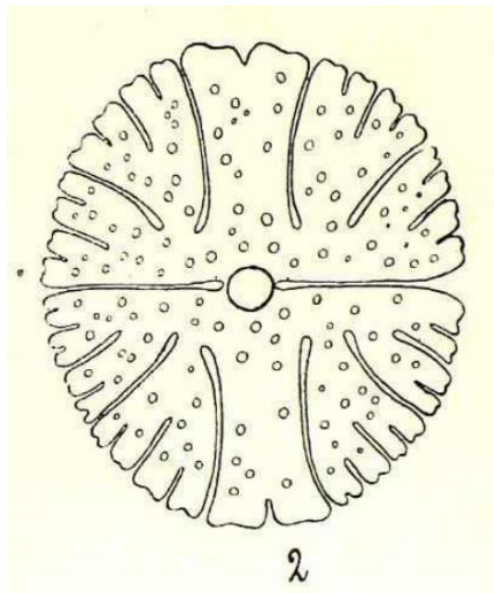


Figura 15. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *lusitanica* J.Sampaio (Figura de Sampaio 1922).

***Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *sexdentata* J. Roubal**

Studia Botanica Čechoslovaka 8: 45, pl. 5, fig. 1. 1947.

Descrição: Apresenta numerosas anomalias nas células em divisão e numerosas anomalias na forma, de modo que foi difícil determiná-la e localizá-la. Na forma e no tamanho lembra *M. verrucosa* Roy e *M. denticulata* Brébisson. Do primeiro, distingue-se pela ausência de verrugas observadas na parede celular e do segundo pela extremidade pontiaguda e não arredondada dos lóbulos de quarta ordem. Algumas formas tinham tubérculos rombudos distintos na reentrância do lobo apical, em outras a forma de pequenos espinhos pontiagudos e ainda em outras eram tão grandes que o lobo apical parecia dividido em quatro partes. Mas, também havia espécimes que não apresentavam qualquer elevação

no lobo apical, onde, às vezes, o lobo apical era tão pequeno que não atingia nem mesmo o comprimento dos dois lobos vizinhos.

Medidas: comprimento 209,3 μm , largura 184 μm , largura do istmo 34,6 μm , largura do lobo apical 51,75 μm .

Localidade-tipo: região montanhosa da Bulgária.

Ilustração: Roubal (pl. 5, fig. 1).

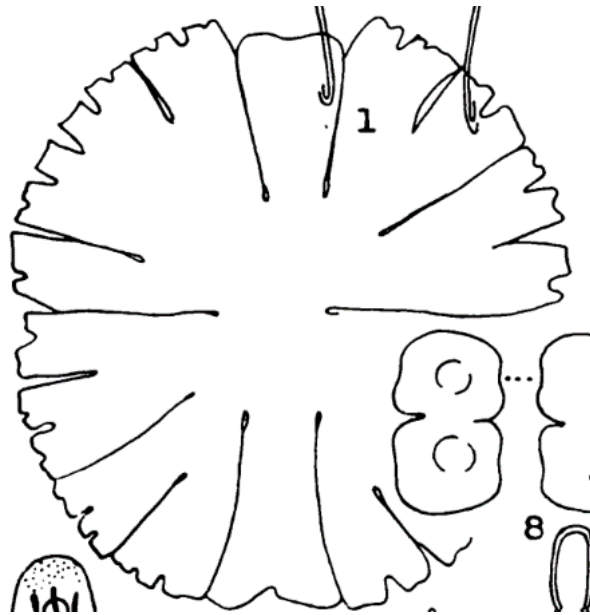


Figura 16. *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *sexdentata* J. Roubal (Figura J. Roubal 1947).

De acordo com a informação obtida dos 37 registros de variedades e formas taxonômicas documentadas para *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs em Guiry & Guiry (2024) e disponível na literatura clássica, apenas 14 correspondem, de fato, a variedades e formas descritas para a espécie. Por isso, algumas considerações taxonômicas e nomenclaturais devem ser feitas, como segue.

Três desses registros correspondem a variedades e formas taxonômicas inicialmente consideradas de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs, mas que após revisão providenciada ao longo dos anos tornaram-se sinônimos de *M. thomasi* W.Archer. Dois são: *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *subnotata* West e *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *subnotata* West f. *cornuta* M.I.Claassen. Além desses, a variedade *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *notata* Nordstedt proposta em Nordstedt (1880) deve ser considerada sinônimo de *M. thomasi* W.Archer var. *notata* (Nordstedt) Grönblad, segundo Grönblad (1920).

Porque Grönblad (1920) transferiu *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *notata* Nordstedt para *M. thomasi* W.Archer efetuando a combinação *M. thomasi* W.Archer var. *notata* (Nordstedt) Grönblad, a forma taxonômica *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *notata* Nordstedt f. *minor* Y.Okada descrita em Okada (1952), que difere da típica da var. *ornata* (Nordstedt) Grönblad quase que só pelo tamanho ao redor de dois-terços menor de sua célula, deve ser transferida para *M. thomasi* W.Archer. Grönblad (1920) também elevou a subespécie *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs subsp. *quadridentata* Nordstedt ao nível espécie efetuando a combinação *M. quadridentata* (Nordstedt) Grönblad.

Os onze registros restantes são considerados entidades taxonômicas distintas que possuem a palavra *denticulata* em sua nomenclatura.

Observou-se também a existência de duplicidade de nomes em alguns casos, tal como é o de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *intermedia* A.W.Bennett. Esta variedade foi proposta duas vezes, a primeira por Nordstedt (1880) e a segunda uma década depois por Bennett (1890). Entretanto, de acordo com West & West (1905) a var. *intermedia* A.W.Bennett é uma variedade taxonômica duvidosa por ser muito incompletamente descrita, o que a torna quase impossível identificá-la. Ainda segundo West & West (1905), já existe uma var. *intermedia* da mesma espécie descrita por Nordstedt (1880). Segundo o Art. 53.3 do Código Internacional de Nomenclatura, nomes de dois táxons infraespecíficos dentro da mesma espécie são homônimos se tiverem o mesmo epíteto final ou o epíteto final seja muito semelhante e, por isso, plausíveis de confusão. O último dos nomes é, por conseguinte, ilegítimo (Turland *et al.* 2018).

Micrasterias denticulata Brébisson ex Ralfs var. *lusitanica* J.Sampaio tornou-se sinônimo da variedade-típica de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs por não apresentar características que as diferenciassse. Krieger (1939) não admitiu a existência desta variedade e a considerou sinônimo de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *denticulata*. A única característica diferencial da variedade proposta em Sampaio (1922) é a existência de um pequeno círculo hialino, muito perfeito e distintamente delimitado no centro da célula que deve ser, obviamente, o espaço ocupado pelo núcleo no istmo celular e mostra a separação dos cloroplastídios das semicélulas.

Micrasterias denticulata Brébisson ex Ralfs var. *licmoides* A.W.Wills foi retirada da espécie por West & West (1905) por não apresentar qualquer característica que permitisse sua proposição como uma categoria infraespecífica de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs. Ainda segundo os mesmos autores, a dita variedade apresenta o lobo polar e os laterais bastante reduzidos como resultado, ao que tudo indica, da rápida sucessão de divisões celulares. Além disso, as semicélulas imperfeitamente desenvolvidas da var. *licmoides* A.W.Wills são comuns em populações de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs (West & West 1905). O mesmo pode ser observado no único trabalho disponível sobre *M.*

denticulata Brébisson ex Ralfs var. *laciniata* Brébisson, que afirma ser esta variedade idêntica à típica da espécie.

Embora o nome da forma taxonômica *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *capitulifera* C.A. esteja listado no banco de dados AlgaeBase (Guiry & Guiry 2024), não foi encontrado o trabalho referente à descrição original na literatura clássica.

Finalmente, ao realizar uma análise minuciosa da informação constante no protótipo de todas as variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs disponível na literatura, foi possível concluir que as categorias infraespecíficas representadas pelas variedades e formas taxonômicas então registradas diferem, basicamente, pela largura do lobo polar e a profundidade da incisão existente no centro da margem superior do lobo polar. Além disso, algumas variedades diferem quanto a presença de projeções e dentes no lobo polar.

3.2. *Micrasterias thomasi* W.Archer

Quarterly Journal of microscopical Science: nov. sér., 2: 239, pl. 12, fig. 1-10. 1862 (como ‘*Thomasi*’).

Descrição: célula orbicular, lisa, 5-lobada, ápice dos segmentos com 3 projeções robustas, proeminentes, porção mediana cônica, arredondada, externa afilada, curva, alongada, emarginada, divergente, lóbulos bem próximos uns dos outros, cada um apresentando 2-3 elevações apiculadas, disposição regular, ápices voltados para fora, lobos laterais divididos dicotomicamente, subdivisões finais 2-3-denticuladas, por vezes 4-denticuladas, não afiladas, lóbulo final totalmente incluído, fortemente emarginado, ângulos acuminados.

Medidas: comprimento 203,2 µm, largura 181,4 µm.

Localidade-tipo: Dublin, Irlanda.

Ilustração: Archer (1862: pl. 12, fig. 1).

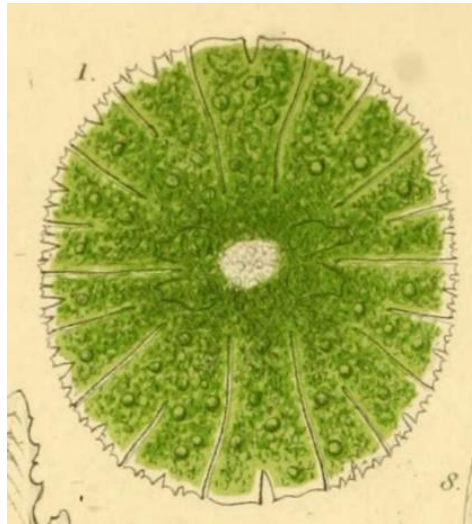


Figura 17. *Micrasterias thomasi* W.Archer (Figura de Archer 1862).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *javanica* R.Gutwinski**

Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie: sér. Ciênc. Mat. & Nat., 39: 603, pl. 39, fig. 57. 1902 (como '*Thomasi* var. *javanica*').

Descrição: apresenta 1 intumescência supraistmial pequena, central, espinhos terminais, projeções de cada lado cônicas, pontiagudas, incisão entre os lobos laterais e polar levemente expandida, grande extensão cônica na base de cada lado dos lobos laterais, parte apical mais delgada, mais larga na extremidade, 1 projeção cônica, pontiaguda de cada lado da incisão apical angular, parede celular porosa, numerosos pequenos espinhos distribuídos irregularmente.

Medidas: comprimento 198-205 μm , largura 165-163 μm , largura do istmo 20-24 μm .

Localidade-tipo: conhecida apenas de Java.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 140, fig. 5).

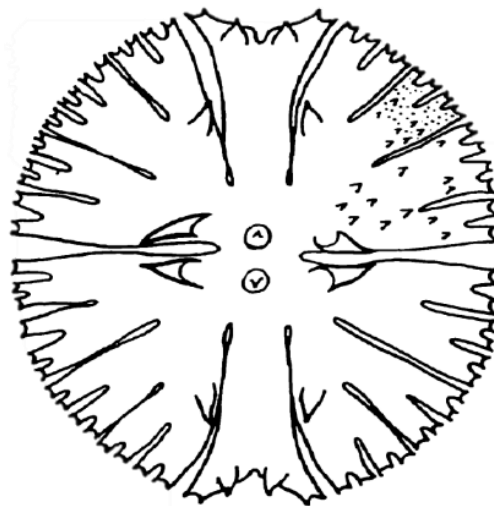


Figura 18. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *javanica* R.Gutwinski (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *pulcherrima* G.S.West**

Journal of the Linnean Society: sér. Bot. 39: 58, pl. 4, fig. 1. 1909.

Descrição: semicélulas com 1 processo 2-dentado na base de cada lobo lateral, curto, curvado para fora, dentículo grande abaixo da incisão do lobo lateral superior, 2 grandes processos laterais na base dos dentículos, munidos de 1 grande dentículo superior, dentículos no interior dos lobos laterais, 32 dentículos na vista frontal de uma célula, presentes exatamente como no tipo, 1 dentículo adicional próximo da base de cada lobo lateral superior, alguns dentículos extras perto da margem de cada lobo polar, processos laterais maiores na base de cada semicélula, curvados para fora, cada um com 1 dentículo extra dorsal de grande tamanho.

Medidas: comprimento 219 µm, largura 197 µm, largura do istmo 30 µm.

Localidade-tipo: reservatório Toorourrong, Austrália.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 139, fig. 5).

Comentários: difere notavelmente de todas as variedades e formas taxonômicas de *M. thomasi* W.Archer por possuir 16 processos curtos, 2-dentados, situados um na base de cada par de lóbulo lateral de 1ª ordem.

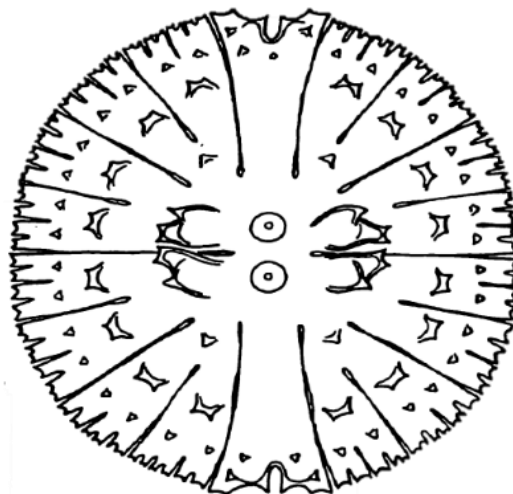


Figura 19. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *pulcherrima* G.S.West (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger**

Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten 13(1): 112. 1939.

Basiônimo: *Micrasterias rotata* Ralfs var. *ornata* F.E.Fritsch, Anales de Biologie Lacustre 7: 47, pl. 1, fig. 17, 18. 1914.

Descrição: célula ca. 1,3 vezes mais longa que larga, intumescência central ausente, 1 processo amplo, 2-4-denticulado, na base dos lóbulos laterais de 2ª ordem, 1 processo de cada lado da incisão apical, ângulos do lobo polar pontiagudos.

Medidas: comprimento 255 µm, largura 195 µm, largura do istmo 30 µm.

Localidade-tipo: conhecida apenas de Madagascar (Analamagoha).

Ilustração: Krieger (1939: pl. 141, fig. 1).

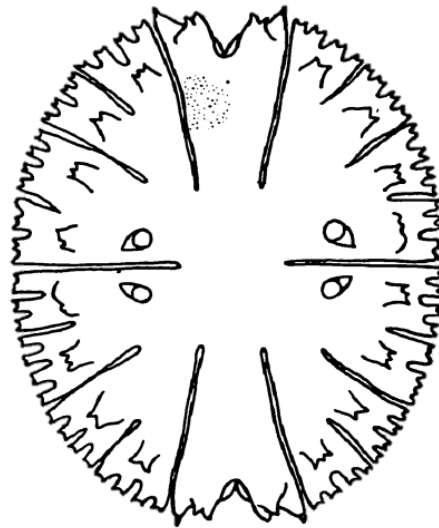


Figura 20. *Microsterias thomasiana* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).

***Microsterias thomasiana* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *africana* P.Bourrelly**

Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire: sér. A, Sci. Nat. 23(2): 338, pl. 16, fig. 4, 5. 1961 (como 'var. *ornata* f. *africana*')

Descrição: difere da var. *ornata* por possuir 2 apêndices adicionais, margens onduladas, lóbulos bastante visíveis, pequenas projeções tubulares, ápice 2-3-denticulados, lobo lateral próximo ao lobo polar, 1 apêndice em cada um dos 2 lóbulos, 1 apêndice mediano, lobo basal com 1 apêndice em cada um dos 2 lóbulos, parte central túmida, desprovida de ornamentação, intumescência basal visível apenas em vista apical, situada entre 2 apêndices, cada semicélula com 3 semicírculos de apêndices, semicírculo externo com 8, semicírculos mediano e central com 2 apêndices, lobo apical semelhante a estrela hexagonal (6 braços).

Medidas: comprimento 260 µm, largura 210 µm, largura do istmo 30 µm.

Localidade-tipo: Grand-Bassam, Costa do Marfim, África.

Ilustração: Bourrelly (1961: pl. 16, fig. 4).

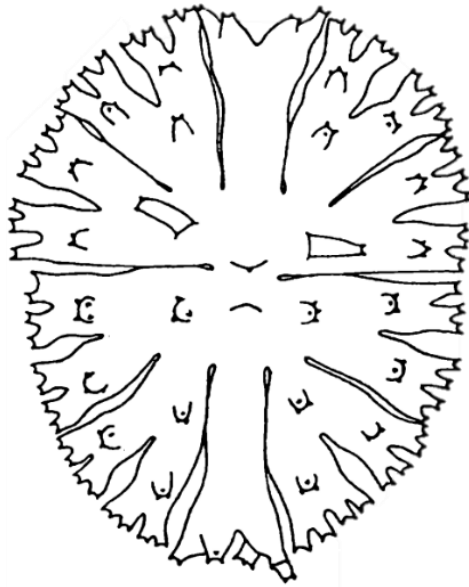


Figura 21. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *africana* P.Bourrelly (Figura de Bourrelly 1961).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *evoluta* Willi Krieger**

Archiv für Hydrobiologie, Suppl. 11: 219, pl. 25, fig. 2. 1932.

Descrição: 1 processo truncado de borda serrilhada substitui a intumescência central, processos de cada lado divididos em 2 partes, extremidade 2-denticulada, processos grandes, 2-3-denticulados na base dos lobos laterais, 1 forte processo 3-denticulado de ambos os lados do ápice.

Medidas: comprimento 216 µm, largura 180 µm, largura do istmo 32 µm.

Localidade-tipo: Sumatra, Indonésia.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 141, fig. 2).

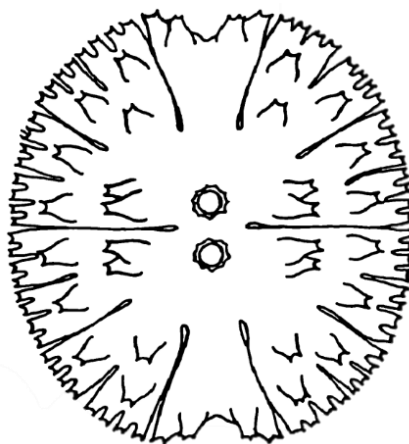


Figura 22. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *evoluta* Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *notata* (Nordstedt) Grönblad**

Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica 47(4): 38. 1920.

Basiônimo: *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *notata* Nordstedt, Botaniska Notiser 1887: 155. 1888.

Descrição: lobos polares e margens dos lobos polar e laterais iguais aos da variedade típica da espécie, da qual difere apenas pela ausência de processos e espinhos na parede celular.

Descrição: comprimento 203-287 µm, largura 170-236 µm, largura do istmo 24-30 µm.

Localidade-tipo: Nova Zelândia.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 140, fig. 4).

Comentários: segundo Krieger (1939), é possível observar 1-3 intumescências mais ou menos desenvolvidas na face das semicélulas.

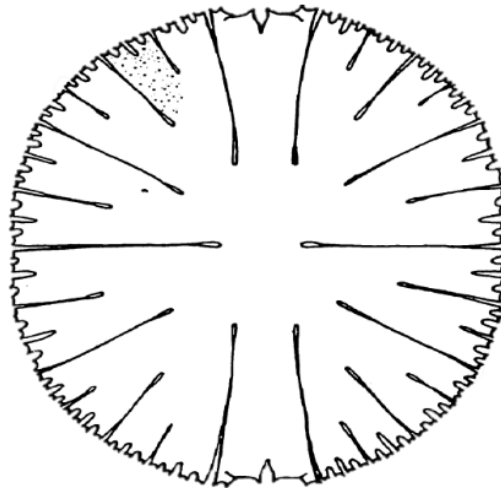


Figura 23. *Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *notata* (Nordstedt) Grönblad (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *torneensis* Willi Krieger**

Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten 2(1): 112, pl. 141, fig. 3. 1939.

Descrição: contorno corresponde aproximadamente ao da var. *notata*, mas existem alguns pequenos espinhos na parede celular ao longo das incisões mais profundas.

Medidas: comprimento 240 µm, largura 220 µm.

Localidade-tipo: encontrada apenas na Lapônia sueca, em empoçados na área de Torne-Träsk.

Ilustração: Krieger (1939: pl. 141, fig. 3).

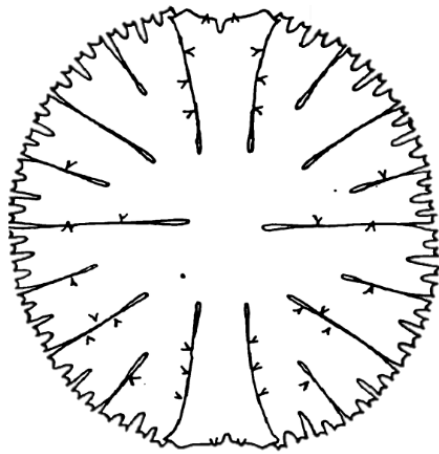


Figura 24. *Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *torneensis* Willi Krieger (Figura de Krieger 1939).

***Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *madagascariensis* P.Bourrelly & A.Couté**

Bibliotheca Phycologica 86: 51, pl. 23, fig. 3. 1991.

Descrição: célula de contorno alongado, 5-lobada, muito recortado, lobo apical e lóbulos laterais sem espinhos, margem apical do lobo apical com 2 pequenas protuberâncias, superfície da célula fortemente porosa, semicélula possui 5 protuberâncias: 3 supraistmais e 2 na base dos lobos laterais de 1ª ordem.

Medidas: comprimento 200-310 µm. largura 165-240 µm.

Localidade-tipo: Madagascar.

Ilustração: Bourrelly & Couté (1991: pl. 23, fig. 3).

Comentários: os espécimes observados por Bourrelly & Couté (1991) são muito próximos daqueles da var. *simplex* Skuja da espécie e de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *taylorii* Willi Krieger f. *mamillata* Prescott & Scott (1952) identificada como forma taxonômica, cujos espécimes representantes são menores em tamanho e apresentam o lobo polar não denticulado.

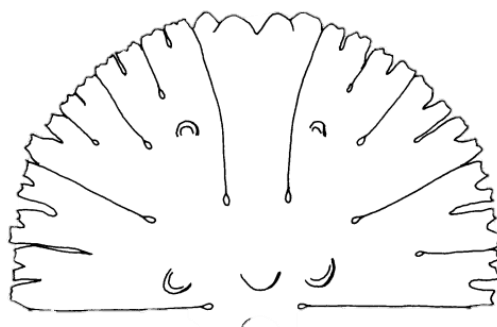


Figura 25. *Micrasterias thomasiana* W.Archer var. *madagascariensis* P.Bourrelly & A.Couté (Figura de Bourrelly & Couté 1991).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *andamanensis* B.N.Prasad & P.K.Misra**

Freshwater algal flora of Andaman and Nicobar Islands 2: 146, pl. 1, fig. 3. 1992.

Descrição: células suborbiculares, profundamente constritas na parte média, senos estreitamente lineares, semicélulas 5-lobadas, incisões entre lobos estreitas, lineares, lobo polar estreitamente cuneado, lados levemente côncavos, não salientes, margem apical levemente retusa, incisão mediana profunda, ângulos de cada lado da incisão apical com pequena projeção pontiaguda, curva, ângulos externos emarginados, 2 processos pontiagudos, lobos laterais e basais iguais em tamanho, lobo lateral separado por uma incisão secundária menos profunda, 2 incisões terciárias resultando em 8 divisões finais, cada divisão com 2-3 projeções afiladas, pontiagudas, parede celular lisa.

Medidas: comprimento 229-245 µm, largura 219-226 µm, largura do istmo 22.5-24 µm.

Localidade-tipo: depositado na Coleção de Algas da Universidade Lucknow sob nº AN568.

Ilustração: Prasad & Misra (1992: pl. 1, fig. 3).

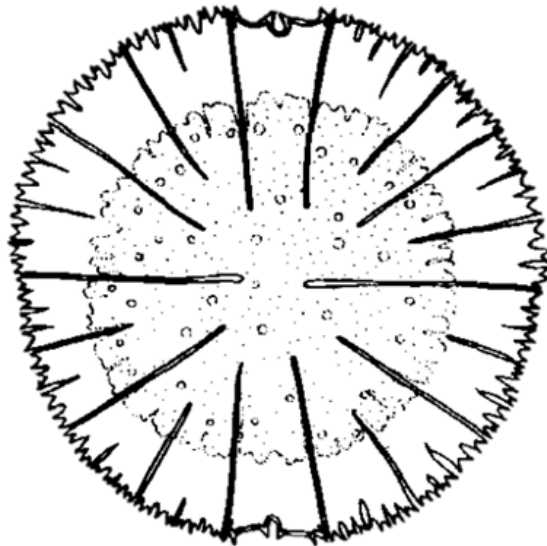


Figura 26. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *notata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *andamanensis* B.N.Prasad & P.K.Misra (Figura de Prasad & Misra 1992).

***Micrasterias thomasi* W.Archer var. *maxima* C.Bernard**

Sur quelques algues unicellulaires d'eau douce récoltées dans le Domaine Malais. 68, pl. 5, fig. 113. 1909.

Descrição: difere da variedade-tipo da espécie, principalmente, pelas maiores dimensões celulares e ausência de poros na parede celular, mas também pelas células subcirculares, pouco mais longas que largas e os apêndices do lobo apical e dos situados perto do istmo pouco mais acuminados.

Medidas: comprimento 310 µm, largura 260 µm, largura do istmo 35 µm.

Localidade-tipo: lago muito pequeno, muito raso, perto da estação Meester Cornelis, Batávia, Países Baixos.

Ilustração: Bernard (1909: pl. 5, fig. 113).

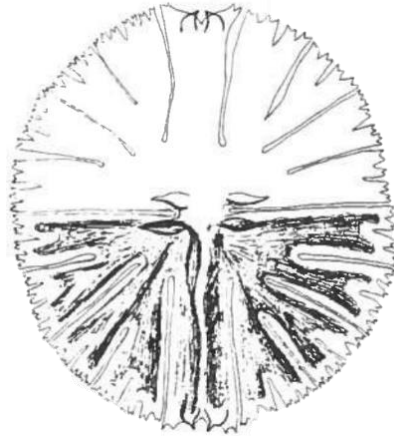


Figura 27. *Micrasterias thomasi* W.Archer var. *maxima* C.Bernard (Figura de Bernard 1909).

***Micrasterias thomasi* W.Archer f. *punctata* Rosa**

Studia Botanica Czechoslovaca 12(3): 212, pl. 14, fig. 16a-b. 1951.

Descrição: Difere do tipo pela membrana densamente coberta por poros finos.

Medidas: Não mencionadas.

Localidade-tipo: Blatná, República Checa.

Ilustração: Rosa (1951: pl. 14, fig. 16).

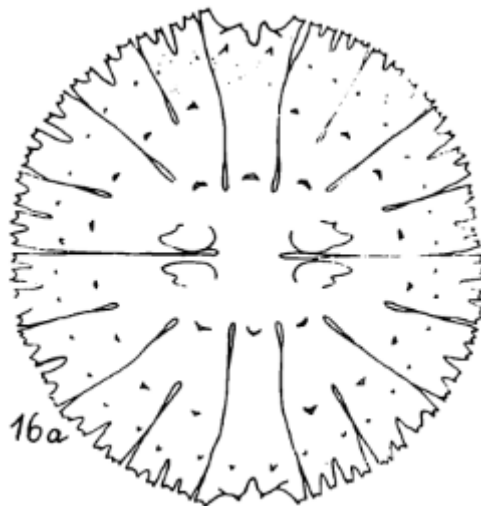


Figura 28. *Micrasterias thomasi* W.Archer f. *punctata* Rosa (Figura de Rosa 1951).

Ao revisar os nomes das variedades e formas taxonômicas propostas em literatura para *M. thomasi* W.Archer, observou-se que do total de 17 registros disponíveis no banco de dados AlgaeBase (Guiry & Guiry 2024), 16 correspondem a variedades e formas taxonômicas efetivamente

associadas a esta espécie. Isto porque a variedade *M. thomasi* W.Archer var. *schweinfurthii* (Cohn) Playfair retornou ao nível espécie, *M. schweinfurthii* Cohn.

As variedades e formas taxonômicas de *M. thomasi* W.Archer diferem, fundamentalmente, pela presença de processos na face da semicélula e a largura relativa do lobo polar. Outras características que diferem as variedades desta espécie são a presença de projeções na célula, principalmente, acima da região do istmo e na base dos lobos laterais. Assim, por exemplo, as var. *pulcherrima* G.S.West, var. *evoluta* Willi Krieger e var. *javanica* R.Gutwinski apresentam processos, praticamente, em toda célula, enquanto que as demais variedades apresentam-nos somente na região imediatamente acima do istmo (supraistmial).

Devido à semelhança morfológica entre *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer, a var. *notata* (Nordstedt) Grönblad foi inicialmente proposta por Nordstedt (1888) como uma variedade de *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs. No entanto, Grönblad (1920) contestou a situação argumentando que a var. *notata* Nordstedt apresentava características morfológicas diagnósticas e circunscrição que melhor se enquadravam nas de *M. thomasi* W.Archer. Grönblad (1920) baseou seu argumento na observação de que o formato das células da var. *notata* Nordstedt era idêntico ao da forma típica de *M. thomasi* W.Archer, com os lobos polares e as margens dos demais lobos semelhantes. As únicas diferenças visíveis na célula seriam as intumescências faciais. Em contraste, *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs é claramente diferente por características distintas do lobo polar e de todas suas margens.

West (1892) propôs *M. thomasi* W.Archer f. *major* West distinguindo-a, basicamente, pelo menor tamanho celular comparado ao tipo de *M. thomasi* W.Archer var. *thomasi*). No entanto, essa única diferença de tamanho foi considerada insuficiente por Krieger (1939) para justificar a proposição de uma nova forma taxonômica na espécie, o que o levou a sugerir que *M. thomasi* W.Archer f. *major* West fosse reconhecida como um sinônimo heterotípico (taxonômico) de *M. thomasi* W.Archer.

De maneira semelhante, a var. *polonica* R.Gutwinski da referida espécie foi descrita e proposta por Gutwinski (1896) devido à presença de dentículos na região do lobo polar. No entanto, Krieger (1939) também questionou a relevância dessa característica para distinguir uma nova variedade taxonômica da espécie. Krieger (1939) propôs, consequentemente, que a var. *polonica* R.Gutwinski fosse igualmente considerada um sinônimo heterotípico (taxonômico) de *M. thomasi* W.Archer var. *thomasi* reforçando a ideia de que variações dessa magnitude não justificariam, obrigatoriamente, a proposição de novas formas ou variedades taxonômicas na espécie.

Embora esteja listada no banco de dados Algaebase (Guiry & Guiry 2024), *M. thomasi* W.Archer var. *simplex* Skuja não foi encontrada nos trabalhos disponíveis na literatura clássica ou em artigos pesquisados.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CAPÍTULO

A tabela abaixo apresenta as variedades e formas taxonômicas documentadas na literatura para *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs e *M. thomasi* W.Archer e a revisão dos nomes nela citados com as datas de sua proposição e os respectivos requisitos estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Turland *et al.* 2018).

Tabela 1. Variedades e formas taxonômicas registradas na literatura para *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasi* W.Archer conforme os requisitos estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Turland et al. 2018).

Variedade e forma taxonômica	Autor	Revisão do CIN
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>intermedia</i>	Nordstedt (1880)	1º de janeiro de 1848
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>angulosa</i>	Reinsch (1866), West & West (1902)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>angustosinuata</i>	Gay (1884)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>minnesotensis</i>	Turner (1885)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>basiprotuberans</i>	Collins <i>et al.</i> (1914)	1º de janeiro de 1912 - Art. 20.2
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>taylorii</i>	Krieger (1939)	1º de janeiro de 1935 a 31 de dezembro de 2011 – Art. 39.1
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>granulosa</i>	Irénée-Marie (1951)	
<i>Micrasterias denticulata</i> Bréb. f. <i>mucronata</i>	Irénée-Marie (1951)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>japonica</i>	Okada (1952)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>taylorii</i> f. <i>mammillata</i>	Prescott & Scott (1952)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>abrupta</i>	Krieger & Bourrelly (1956)	
<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>africana</i>	Claassen (1961)	

Variedade e forma taxonômica	Autor	Revisão do CIN
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>polonica</i>	Gutwinski (1896)	1º de janeiro de 1848
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>javanica</i>	Gutwinski (1902)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>maxima</i>	Bernard (1909)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>notata</i>	Grönblad (1920)	1º de janeiro de 1912 - Art. 20.2
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>pulcherrima</i>	West (1909)	1º de janeiro de 1935 a 31 de dezembro de 2011 – Art. 39.1 1º de janeiro de 1953 – Art. 36.3, 37.1, 37.2, 38.13, 41.3 e 41.5 1º de janeiro de 1958 – Art. 40 1º de janeiro de 1958 a 31 de dezembro de 2011 Art. 44.1
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>ornata</i>	Krieger (1939)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>evoluta</i>	Krieger (1939)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>torneensis</i>	Krieger (1939)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>ornata</i> f. <i>africana</i>	Bourrelly (1961)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>madagascariensis</i>	Bourrelly & Couté (1991)	
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>andamanensis</i>	Prasad & Misra (1992)	

O Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Shenzhen) diz no Art. 13.1 que o ponto oficial de partida para os estudos nomenclaturais para as algas Desmidiaceae é 1º de janeiro de 1848; e que Ralfs (1848) é o de partida para a publicação válida dos nomes de táxons de desmídias tanto sacodermes quanto placodermes (Guiry 2013).

A partir de 1º de janeiro de 1908, inclusive, apenas uma ilustração com análise, em vez de uma descrição ou diagnose, não é mais aceita para a validação do nome de um novo táxon de nível gênero ou inferior (Turland *et al.* 2018: Art. 38.7 e 38.8). Collins *et al.* (1914) descreveu e propôs *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs var. *basiprotuberans* C. Bullard de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura ao apresentar descrição contendo a diferença com a variedade-tipo da espécie.

O nome de uma nova espécie, variedade ou forma taxonômica de fungos e plantas (exceto fósseis) só é validamente publicado no período entre 1º de janeiro de 1935 e 31 de dezembro de 2011

se for acompanhado por uma descrição ou diagnose em latim (Turland *et al.* 2018: Art. 39.1). Para um nome publicado antes de 1º de janeiro de 1935, entretanto, sua descrição ou diagnose poderá estar em qualquer idioma vivo. O nome de uma alga não-fóssil publicado no período de 1º de janeiro de 1958 a 30 de dezembro de 2011 também deve ser acompanhado, obrigatoriamente, por uma descrição ou diagnose em latim ou pela referência a uma descrição ou diagnose publicada anteriormente de forma válida (Turland *et al.* 2018: Art. 44.1).

Quase todos os trabalhos ora analisados apresentaram a descrição original da alga em latim, exceto os de Bourrelly (1961), quando propôs *M. thomasiانا* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *africana* P.Bourrelly, de Bourrelly & Couté (1991) em que propuseram *M. thomasiانا* W.Archer var. *madagascariensis* P.Bourrelly & A.Couté e Roubal (1947) quando propôs *Micrasterias denticulata* Brébisson ex Ralfs f. *sexdentata* Roubal. Nos dois trabalhos de Bourrelly as descrições originais constaram em francês e no de Roubal em inglês. De acordo com o ICN vigente na época em que essas novas variedades e formas foram propostas, o Artigo 39.2 estipulava que, para se tornarem válidas, as descrições precisavam ser redigidas em latim.

Ao examinar os nomes das novas variedades e formas taxonômicas propostas para *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs e *M. thomasiانا* W.Archer, viu-se que as principais características utilizadas foram: (1) formato e ornamentação dos lobos celulares polar e laterais, (2) formato da célula, (3) incisão entre os lobos polar e lateral, (4) profundidade das incisões em geral e (5) projeções e espinhos na parede celular. Alguns autores utilizaram também as medidas lineares do comprimento máximo da célula, de sua largura máxima, da largura do istmo e, em alguns casos, também da largura do ápice do lobo polar da célula para diferir variedades.

As principais características morfológicas observáveis especificamente em *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs são: (1) margens arredondadas e largas do lobo polar e de sua margem apical, (2) ausência de processos e/ou apêndices faciais na célula, (3) incisão mediana não tão profunda e as interlobares mais rasas e (4) recorte mais arredondado da célula. *Micrasterias thomasiانا* W.Archer apresenta, por sua vez, (1) a margem apical do lobo polar denticulada, (2) a incisão mediana de cada lado do lobo polar ornada com um ou mais denticulos, (3) o lobo polar relativamente mais estreito e comprido, (4) as incisões interlobares mais profundas, (5) o recorte da célula mais denteado e (6) processos e/ou apêndices presentes, principalmente, na região facial central das semicélulas, logo acima do istmo.

A partir da revisão efetuada ao longo do presente estudo, viu-se que a maioria dos táxons de nível infraespecífico de ambas as espécies apresenta ilustração, descrição, medidas e indicação da localidade da coleta original, porém, para alguns poucos essa informação não segue os requisitos do Código Internacional de Nomenclatura (Turland *et al.* 2018). É útil lembrar também que as datas para

vigor de artigos no Código são marcadores fundamentais para tornar o nome do táxon validamente publicado.

Todas as variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs atualmente examinadas estão de acordo com os requisitos estabelecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Turland *et al.* 2018). Observou-se, entretanto, que as proposições da var. *granulosa* e da f. *mucronata* em Irénée-Marie (1951) não incluíram o local onde cada uma foi originalmente encontrada (localidade-tipo). Essa informação destaca a importância da citação precisa do local de coleta ao descrever um novo táxon por contribuir para a precisão e rastreabilidade dos registros taxonômicos.

Observou-se que as var. *basiprotuberans* C.Bullard, var. *taylorii* Willi Krieger e a f. *mammilata* Prescott & Scott de *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs apresentaram as mesmas características diferenciais, quais sejam: (1) três projeções supraistmiais (pouco comuns na espécie), (2) menores projeções na margem apical do lobo polar (uma de cada lado) e (3) contorno arredondado da célula. O comprimento e a largura celular de ambas também são bem semelhantes, em torno de 197-230 µm de comprimento e 180-185 µm de largura.

Com base nas observações mencionadas, as diferenças entre as duas variedades e a forma taxonômica acima referidas não parecem ser suficientemente significativas para justificar a proposição de categorias infraespecíficas distintas. Isto posto, considerando que a var. *basiprotuberans* C.Bullard foi descrita em Collins *et al.* (1914) sugerimos, de acordo com o Art. 11 do Código Internacional de Nomenclatura (Turland *et al.* 2018), que a var. *taylorii* Willi Krieger e a f. *mammilata* Prescott & Scott sejam consideradas sinônimos heterotípicos (taxonômicos) de *M. denticulata* Brébisson *ex* Ralfs var. *basiprotuberans* C.Bullard, o que será formalmente proposto em artigo científico a ser preparado e submetido à publicação em “Notulae Algarum”.

Em relação à revisão taxonômica de *M. thomasiana* W.Archer viu-se que a maior parte de suas variedades está em conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura (Turland *et al.* 2018), com exceção daquelas em Bourrelly (1961) e Bourrelly & Couté (1991) baseadas em material africano. A partir de 1º de janeiro de 1958, inclusive, as descrições das algas devem ser obrigatoriamente apresentadas em latim. No entanto, os trabalhos de Bourrelly (1961) e Bourrelly & Couté (1991) apresentaram descrições em francês, o que leva à não validação dos nomes *M. thomasiana* W.Archer var. *madagascariensis* P.Bourrelly & A.Couté e *M. thomasiana* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *africana* P.Bourrelly.

Propõe-se, ainda, que a var. *maxima* introduzida por Bernard (1909) seja considerada sinônimo heterotípico (taxonômico) da var. *javanica* descrita por Gutwinski (1902). Tal sugestão baseia-se na semelhança morfológica entre as duas variedades, que diferem apenas no tamanho de seus indivíduos representantes e por considerar que esta diferença é bastante tênue.

Além disso, foi observado que *M. thomasi* W.Archer var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger f. *africana* P.Bourrelly exibe características distintivas suficientes para ser reconhecida em nível variedade e não como forma taxonômica contrariando, assim, a proposição de Krieger (1939). Isso se deve porque a f. *africana* P.Bourrelly difere da var. *ornata* (F.E.Fritsch) Willi Krieger por apresentar o lobo polar relativamente mais estreito, existência de projeções nos lóbulos de primeira e segunda ordens e maior separação entre lobos e lóbulos, além das medidas do comprimento e da largura celulares bastante diferentes, pois a f. *africana* P.Bourrelly é mais larga que comprida. Com base nas diferenças morfológicas significativas, recomenda-se que esta forma taxonômica seja elevada ao nível variedade (uma nova variedade de *M. thomasi* W.Archer).

5. REFERÊNCIAS CITADAS

- Archer, W.** 1862. Description of a new species of *Micrasterias* (Ag. et Aliorum, non Ehr.), with remarks on the distinctions between *Micrasterias rotata* (Ralfs) and *M. denticulata* (Bréb.). Quarterly Journal of Microscopical Science, nov. sér. 2: 236-247.
- Bernard, C.** 1909. Sur quelques algues unicellulaires d'eau douce récoltées dans le Domaine Malais par Ch. Bernard. Imprimerie du Département, Buitenzorg. 94 p.
- Bicudo, C.E.M.** 2002. Taxonomia. Biota Neotropica 4(1): Editorial.
- Biolo, S.** 2016. O gênero *Cosmarium* Corda ex Ralfs (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) no estado de São Paulo: levantamento taxonômico das formas com parede celular decorda. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 357 p.
- Borge, O.** 1918. Die von Dr. A. Löfgren in São Paulo gesammelten Süßwasseralgen. Arkiv för Botanik 15: 1-108.
- Bourrelly, P.** 1961. Algues d'eau douce de la Republique de Côte d'Ivoire. Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire, série A, Sci. Nat. 2: 283-374.
- Bourrelly, P.** 1975. Algues d'eau douce du Soudan Français, region du Macina (A.O.F.). Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire, sér. A. 19(1): 1047-1102.
- Bourrelly, P. & Couté, A.** 1991. Desmidiées de Madagascar (Chlorophyta, Zygnophyceae). Bibliotheca Phycologica 86: 1-349.
- Brébisson, A.** 1835. Liste des Desmidiées observées en Basse-Normandie. Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de *Cherbourg* 4: 113-162, 301-304.
- Claassen, M.I.** 1961. A contribution to our knowledge of the freshwater algae of the Transvaal Province. Bothalia 7: 559-666.
- Collins, F.S., Holden, I. & Setchell, W.A.** 1914. Phycoteca Boreali-Americana, a collection of dried specimens of algae of North America. Distribuídas pelo Herbário do The New York Botanical Garden, New York.

- Cooke, M.C.** 1887. British desmids: a supplement to British freshwater algae. Williams & Norgate, London. 205 p.
- De Candolle, A.** 1867. Lois de la nomenclature botanique adoptees par de Congrès International de Botanique tenu à Paris em août 1867. J.-B. Bailliere et Fils, Paris. 70 p. (2^a edição.
- Dick, J.** 1930. Pfälzische Desmidiaceen. Mitteilungen des Pfälzischen Vereins für Naturkunde Pollichia 3: 93-144.
- Engler, A. & Prantl, K.** 1892. In die Natürlichen Pflanzenfamilien. Wilhelm Engelmann, Leipzig. Vol. p. 138-178.
- Gay, F.** 1884. Essai d'une monographie locale des Conjugées. Boehm et Fils, Montpellier. 112 p.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P. & Turland, N.J.** 2003. Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Saint Louis, 2000). Winner Graph, São Carlos. 162 p. (Tradução para o português por C.E.M. Bicudo e J. Prado).
- Grönblad, R.** 1920. Finnländische Desmidiaceen aus Keuru. Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica 47: 1-98.
- Grönblad, R.** 1921. New desmids from Finland and northern Russia. Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica 49(7): 1-78.
- Guiry, M.D.** 2013. Taxonomy and nomenclature of the Conjugatophyceae (= Zygnematophyceae). Algae 28: 1-29.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** 2024. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Gutwinski, R.** 1896. De nonnullis algis novis vel minus cognitis. Rozpr wydz mat.-przys 33: 32-63.
- Gutwinski, R.** 1902. De algis a Dre Raciborski anno 1899 in insula Java collectis. Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie, Classe Sci. Math. Nat. 1902: 575-617.
- Irénée-Marie, Fr.** 1951. Desmidiées de la région de Quebec. Naturaliste Canadien 78: 177-221.
- Jacobsen, M.J.P.** 1876. Aperçu systématique et critique sur les desmidiacées du Danemark. Botansk Tidskrift 4: 143-215.
- Krieger, W.** 1932. Die Desmidiaceen der Deutschen limnologischen Sunda-Expedition. Archiv für Hydrobiologie, suppl. 11: 129-230.
- Krieger, W.** 1939. Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten in Dr. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol. 13, fasc. 1(2). Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig. 117 p.
- Krieger, W. & Burrell, P.** 1956. Desmidiacees des Andes du Venezuela. Ergebnis deutsche limnologische Venezuela-Expedition 1932. Vol. 1. p. 141-195.
- Linnaeus, C.** 1751. Philosophia botanica. Editoria?, Stockholm. 362 p

- Longo, D.** 2005. Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 81 p.
- Nordstedt, C.F.O.** 1880. De Algis et Characeis, 1: de algis nonnullis, praecipue Desmidiéis, inter *Utricularias* Musei Lugduno-Batavi. Acta Universitatis Lundensis 16: 1-13.
- Nordstedt, C.F.O.** 1887. Desmidiaceae. In: Warming, E. (Ed.), Symbolae ad floram Brasiliae centralis cognoscendam, 5: Fam. 18. Videnskabelige Meddelelser fra *Dansk naturhistorisk Forening* i Kjøbenhavn 1887: pl. 2-4.
- Nordstedt, C.F.O.** 1888. Desmidieer från Bornholm, samlade och delvis bestämda af R.T. Hoff, granskade af O. Nordstedt. Videnskabelige Meddelelser Naturhistorische Forening i Kjøbenhavn 1888: 182-213.
- Okada, Y.** 1952. Taxonomical studies on the genus *Micrasterias* with special reference to the species of Japan and its surrounding areas. Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University 2: 93-140.
- Prasad, B.N. & Misra, P.K.** 1992. Freshwater algal flora of Andaman and Nicobar Islands. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun. Vol. 2. 254 p.
- Prescott, G.W., Croasdale, H.T. & Vinyard, W.C.** 1977. A synopsis of North American desmids. University of Nebraska Press, Lincoln. Vol. 2(2). 413 p.
- Prescott, G.W. & Scott, A.M.** 1952. The algal flora of southeastern United States, 5: additions to our knowledge of the desmid genus *Micrasterias*, 2. Transactions of the American Microscopical Society 71: 229-252.
- Ralfs, J.** 1848. The British Desmidiaceae. Reeve, Benham & Reeve, London. 226 p.
- Rosa, K.** 1951. Algenflora von Südböhmen, 1: Die Algen der Umgebung von Blatná. Studia Botanica Čechoslovaca 12(3): 173-232.
- Reinsch, P.F.** 1866. Die Algenflora des mittleren Theiles von Franken. Verlag von Wilhelm Schmid, Nürnberg. 238 p.
- Rodrigues, W.A.** 2003. Revisão da nomenclatura botânica: datas importantes na história da nomenclatura botânica pós-Linneana. Universidade Estadual de Ponta Grossa, série Ciênc. Biol. Saúde 9: 73-82.
- Round, F.E.** 1971. The taxonomy of the Chlorophyta, 2. British Journal of Phycology 6(2): 235-264.
- Roubal, J.** 1947. The Desmidiaceae of the Pirin planina, a High-Mountain Region in Bulgaria. Studia Botanica Čechoslovaca (1): 1-68.
- Sampaio, J.** 1922. Desmidiáceas do Pôrto e arredores. Brotéria 20: 26-48.
- Scott, A.M. & Prescott, G.W.** 1961. Indonesian desmids. Hydrobiologia 27: 1-132.

- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Cerná, K. & Neustupa, J.** 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 933-943.
- Sormus, L. & Bicudo, C.E.M.** 1997. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 10: Zygnemaphyceae (Desmidiaceae, Micrasterias). *Hoehnea* 24: 75-87.
- Taylor, W.R.** 1935. Alpine algae from the Santa Marta mountains, Colombia. *American Journal of Botany* 22(9): 763-781.
- Turland, N.J., Wiersema, J.H., Barrie, F.R., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Heredeen, P.S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, De-Z., Marhold, K., May, T.W., McNeill, J., Monro, A.M., Prado, J., Price, M.J. & Smith, G.F.** 2018. Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Shenzhen). RiMa Editora, São Carlos. 254 p. (tradução para o português de Bicudo, C.E.M., Prado, J. & Hirai, R.Y.).
- Turner, W.B.** 1885. On some new and rare desmids. *Journal of the Royal Microscopical Society* 25: 933-940.
- van-den-Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M.** 1995. Algae: an introduction to phycology. University of Cambridge Press, Cambridge. 627 p. (reimpressão).
- West, G.S.** 1909. The Algae of the Yan Yean Reservoir, Victoria: a biological and ecological study. *The Journal of the Linnean Society* 39: 1-88.
- West, W.** 1892. A contribution to the freshwater algae of West Ireland. *Journal of the Linnean Society: sér. Bot.* 29: 103-216.
- West, W. & West, G.S.** 1902. A contribution to the freshwater algae of the north of Ireland. *Transactions of the Royal Irish Academy: sér. B*, 32: 1-100.
- West, W. & West, S.G.** 1905. A monograph of the British Desmidiaceae. The Ray Society, London. Vol. 2. 204 p.
- Wittrock, V. & Nordstedt, O.** 1880. Algae aquae dulcis exsiccatae praecipue scandinavicae... O.L. Svanbäcks Boktryckeri-Artiebolag, Stockholm. Fasc. 8: exsic. 350-400.

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CEPAS DE *MICRASTERIAS DENTICULATA* E *MICRASTERIAS THOMASIANA* (DESMIDIACEAE, ZYGNEMATOPHYCEAE) ATRAVÉS DO USDO DE MORFOMETRIA LINEAR E GEOMÉTRICA

1. INTRODUÇÃO

Espécies são unidades fundamentais para a biologia e conhecer sua delimitação é essencial para entender os ecossistemas e a biodiversidade, questões estas fundamentais para tomar decisões eficazes sobre a conservação. A taxonomia ajuda, como uma linguagem científica, a divulgar a diversidade, a ecologia, a distribuição e a evolução dos organismos vivos. No entanto, as espécies evoluem ao longo do tempo e não são entidades fixas (Škaloud *et al.* 2015).

As desmídias são algas verdes unicelulares ou que formam falsos filamentos (*Micrasterias foliacea*), apresentam morfologia celular complexa e são compostas por duas metades simétricas (semicélulas) que apresentam, em geral, formas bilateralmente simétricas. A maioria das espécies de desmídias ocorre em áreas úmidas ácidas de água doce, como pântanos e turfeiras (Brook 1981).

A taxonomia das desmídias está fundamentada, principalmente, em características morfológicas das células, como: forma, dimensões e simetria, ornamentação da parede celular e tipo, número e localização dos cloroplastídios na célula (Brook 1981, Šťastný *et al.* 2013). No entanto, muitas espécies nesse grupo mostram variação morfológica considerável entre os representantes de uma mesma população e entre populações, levando a confusão taxonômica com a consequente descrição de várias variedades e formas taxonômicas (Gontcharov & Melkonian 2010).

O gênero *Micrasterias* é caracterizado por células usualmente grandes, de formato espetacular e bem ornamentais. As células são achatadas e constituídas por duas semicélulas idênticas e simétricas. Cada semicélula possui um lobo polar, dois lobos laterais e dois basais. Os lobos laterais e basais são divididos em lóbulos. Conforme o número de lobos, as *Micrasterias* estão divididas em trilobadas

(três lobos e duas incisões) e pentalobadas (cinco lobos e quatro incisões). Os lóbulos podem ser classificados em lóbulos de primeira até quarta ordem (Sormus 1980, Škaloud *et al.* 2011).

Uma das características morfológicas mais proeminentes do gênero é a sucessiva bifurcação dos lobos laterais e basais. A presença dos lóbulos de primeira à quarta ordem tem sido considerada um dos caracteres taxonômicos morfológicos mais importantes dentro do gênero (Krieger 1939, Prescott *et al.* 1977, Škaloud *et al.* 2011).

O gênero *Micrasterias* compreende, atualmente, cerca de 60 espécies (Guiry & Guiry 2024) e várias centenas de categorias subespecíficas (variedades e formas taxonômicas), sendo a maior parte desses táxons descrita nos meados do século XIX (Krieger 1939, Růžička 1981) e apenas ao redor de 30% deles foram adicionados durante o século XX (Škaloud *et al.* 2011).

Micrasterias denticulata é uma microalga pentalobada que pode apresentar lóbulos até de quarta ordem. Sua célula é composta por duas semicélulas “idênticas” uma à outra e apresentam o formato circular com o bordo de toda célula denticulado (Ralfs 1848). Segundo Ralfs (1848), *M. denticulata* foi proposta com base na morfologia de suas células e nas medidas do comprimento (ca. 224,78 µm) e da largura (ca. 184,06 µm) celulares. São conhecidos presentemente 26 registros (entre variedades e formas taxonômica), conforme o banco de dados AlgaeBase (Guiry & Guiry 2024), todos propostos com base na sua morfologia (Guiry & Guiry 2024).

A espécie foi coletada em quase todos os continentes e encontra-se amplamente registrada nos Estados Unidos da América, Canadá, na Inglaterra e em outros continentes (Prescott *et al.* 1977). Segundo a lista de espécies da Flora do Brasil, sua ocorrência foi documentada nas regiões brasileiras Nordeste (Alagoas e Maranhão), Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná) (Flora do Brasil 2020).

Micrasterias thomasi é uma desmídia pentalobada, que apresenta lóbulos de até quarta ordem. A célula é constituída por duas semicélulas “idênticas” uma à outra e tem formato subcircular, parede celular lisa ou finamente pontuada e apresenta intumescências ou projeções na superfície de cada semicélula (Archer 1862).

Segundo Archer (1862), os espécimes de *M. thomasi* foram descritos com base na morfologia celular e um dos principais caracteres para sua identificação é a presença de projeções na superfície da célula. Apresentam comprimento de ca. 203,2 µm e largura de ca. 181,43 µm. Atualmente, são encontrados 17 registros no banco de dados AlgaeBase, cujas variedades e formas taxonômicas foram identificadas com base na morfologia da célula.

Geograficamente, a espécie é mais restrita em sua distribuição do que *M. denticulata* havendo sido encontrada, principalmente, na Europa, Ásia e América do Norte, mas também em outros continentes (Guiry & Guiry 2024). No Brasil, segundo a lista de espécies da Flora do Brasil, a

ocorrência essa espécie foi registrada nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná) do país (Flora do Brasil 2020).

A morfometria definida como o estudo da variação da forma (Daly 1985, Monteiro & Reis 1999) abrange um conjunto de técnicas amplamente utilizado em várias disciplinas, como citologia, entomologia, geologia e paleontologia (Daly 1985). E pode ser analisada através da morfometria tradicional (linear) e da morfometria geométrica (Rohlf & Marcus 1993).

Na morfometria tradicional (linear), as análises são realizadas por meio de medidas de distâncias lineares entre pontos anatomicamente homólogos (Rohlf & Marcus 1993). Por meio desta técnica, é possível verificar a variação métrica a partir de uma matriz de dados de medidas de distância, onde os resultados são mostrados numericamente. Muitas vezes, porém, essas análises não são capazes de captar toda a informação de um organismo, especialmente em relação à forma de suas células. Isto ocorre porque as variáveis utilizadas não fornecem a posição geométrica, somente as distâncias lineares de cada medida estabelecida.

A morfometria geométrica é um método quantitativo para avaliar formas biológicas e está baseado na sobreposição de Procrustes (Zelditch *et al.* 2004). É uma técnica utilizada para analisar a forma dos organismos e suas estruturas morfológicas e visa à descrição e representação da geometria das formas, bem como descrever e localizar regiões onde ocorram mudanças e reconstituir tais mudanças na forma (Fornel 2005).

Os métodos de sobreposição, também conhecidos como métodos de Procrustes, visam a sobrepor imagens de espécimes alinhando pontos de referência homólogos de maneira ótima. A análise de resíduos revela diferenças na forma, as quais são expressas como vetores de deslocamento em cada ponto de referência. O ajuste resistente é preferido em casos de mudança de forma localizada. Desenvolvimentos estatísticos aprimoraram a avaliação desses métodos. A possibilidade de alinhar amostras com diferenças devidas a transformações afins destaca variações em pontos de referência, embora seja desafiador mostrar a covariação nos deslocamentos. A análise de empenamento relativo destaca essa covariação como uma vantagem significativa (Rohlf & Marcus 1993).

Taxonomistas de microalgas estão utilizando, atualmente, essa abordagem para melhor compreender a morfologia dos organismos, principalmente, dos organismos das Zynematophyceae, como pode ser visto, por exemplo, nos trabalhos de Savriama *et al.* (2010), Neustupa *et al.* (2010), Neustupa (2017) e Neustupa *et al.* (2023).

Devido à sua morfologia muito semelhante, as espécies *M. denticulata* e *M. thomasiana* frequentemente confundem os taxonomistas. Os trabalhos publicados sobre cada espécie revelaram que as principais diferenças estabelecidas pelos autores ao classificarem as variedades e formas taxonômicas de cada uma estão baseadas na largura e no comprimento máximos da célula e na largura

do istmo. Além dessas medidas, alguns autores também consideraram a largura do ápice do lobo polar como um critério distintivo.

A limitação desses poucos atributos morfológicos utilizados para separar espécies acabou por gerar confusão taxonômica, especialmente devido à ampla variação morfológica verificada em muitos espécimes dessas espécies. Isso resultou na descrição de inúmeros táxons de níveis infraespecíficos, como variedades e formas taxonômicas, dificultando a identificação precisa a nível populacional e a não-existência de características morfológicas diagnósticas que possam aprimorar a descrição das espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Ampliar o conhecimento morfológico e métrico em populações de *M. denticulata* e *M. thomasiana* a partir da análise de material em condições de cultivo e da literatura clássica.

2.2. Específicos

- Utilizar as medidas lineares (morfometria clássica) para avaliar os caracteres morfológicos e métricos em *M. denticulata* e *M. thomasiana* em condições de cultivo.
- Utilizar a forma celular (morfometria geométrica) para avaliar os caracteres morfológicos em populações de *M. denticulata* e *M. thomasiana* a partir de dados da literatura e de condições de cultivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento, cultivo e manutenção das cepas

As cepas utilizadas neste estudo provieram da Universidade de Hamburgo (“Microalgae and Zygnematophyceae Collection, MZCH”), Alemanha, representadas pelos números de tombo MZCH08, MZCH32, MZCH50, MZCH77, MZCH216, MZCH244 e MZCH675. As cepas CCAC1026 e CCAC2253 foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas da Universidade de Essen (“Central Collection of Algal Cultures, CCAC”), também na Alemanha, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Cepas utilizadas para o desenvolvimento do projeto.

CEPAS	GÊNERO	ESPÉCIE	VARIEDADE	LOCAL
MZCH08	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	---	Alemanha
MZCH32	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	---	Finlândia
MZCH50	<i>Micrasterias</i>	<i>denticulata</i>	<i>angulosa</i>	Alemanha
MZCH77	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	---	Noruega
MZCH216	<i>Micrasterias</i>	<i>denticulata</i>	<i>angulosa</i>	Suécia
MZCH244	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	---	Áustria
MZCH675	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	---	Alemanha
CCAC1026	<i>Micrasterias</i>	<i>thomasi</i>	<i>notata</i>	Alemanha

Os isolados foram mantidos em frascos de ensaio contendo meio de cultivo DY-IV (Andersen *et al.* 1997) ou meio WC (Andersen *et al.* 2005) em condições específicas de luminosidade e fotoperíodo (intensidade luminosa de $\sim 40 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro), na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA/UFSCar) e no Laboratório de Cultivo de Macroalgas e Cianobactérias do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA).

O material biológico foi analisado ao microscópio óptico binocular (Axioskop 2, Zeiss) equipado com câmera fotográfica Canon EOS 600 e ferramentas de imagem (Canon EOS Utility software).

Para efetuar o estudo morfométrico das espécies e táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e *M. thomasi* foram analisados os materiais mencionados na literatura clássica onde estes táxons infraespecíficos foram originalmente descritos, que é: Ralfs (1848), Archer (1862), Nordstedt (1880), Gay (1884), Gutwinski (1902), West & West (1902), Bernard (1909), West (1909), Grönblad (1920), Krieger (1932, 1939), Irénée-Marie (1951), Okada (1952), Krieger & Bourrelly (1956), Bourrelly (1961), Prescott *et al.* (1977), Bourrelly & Couté (1991) e Prasad & Misra (1992).

3.2. Morfometria linear (ML)

Para obter as medidas lineares foram utilizados nove atributos morfológicos. Três desses atributos são comumente utilizados na literatura clássica e são: **CT** (comprimento total da semicélula), **LT** (largura total da célula) e **IW** (largura do istmo). Os novos atributos ora propostos foram: **CM** (comprimento médio da célula), **CLP** (comprimento do lobo polar), **Lapic** (largura do ápice da célula), **LBPolar** (largura do lobo polar), **LLat 1** (largura do lobo lateral 1), **LLat 2** (largura do lobo lateral 2) (Fig. 1).

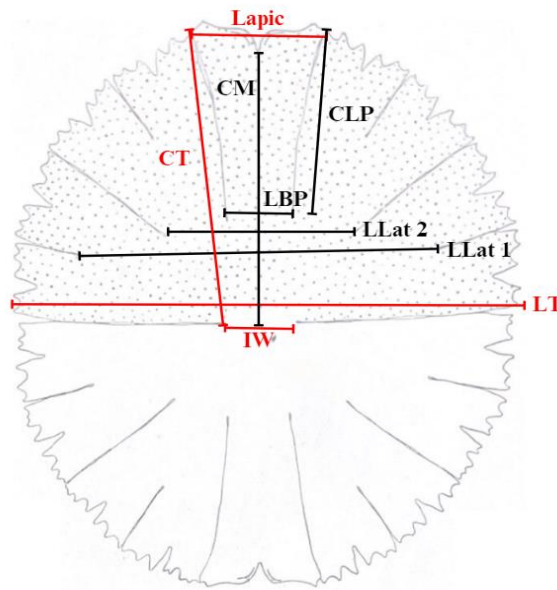


Figura 129. Esquema das medidas lineares obtidas em populações de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*. Em vermelho, estão listadas as medidas comumente usadas na literatura e em preto as propostas no presente estudo.

As medidas lineares foram obtidas utilizando o programa ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Posteriormente, todas as medidas referentes aos nove atributos morfológicos foram tabeladas, analisadas pelo programa Excel 2023 e importadas para o software RStudio v.1.4.1 (R Core Team 2019). Os gráficos do tipo “box-plot” foram gerados utilizando o pacote *ggplot2* (v3. 3.3, Wickham, 2016).

3.3. Morfometria geométrica (MG)

Para a análise da morfometria geométrica foram utilizados 39 marcos anatômicos (“landmarks”) de acordo com Neustupa *et al.* (2023), os quais foram situados ao longo do contorno celular (fig. 2). O “landmark” 20 está localizado no ponto central ou ponto médio de cada semicélula. O ponto central ajuda a definir a orientação das estruturas celulares em relação ao centro da célula, permitindo uma análise detalhada da distribuição espacial dos demais marcos anatômicos, lados celulares e simetria bilateral.

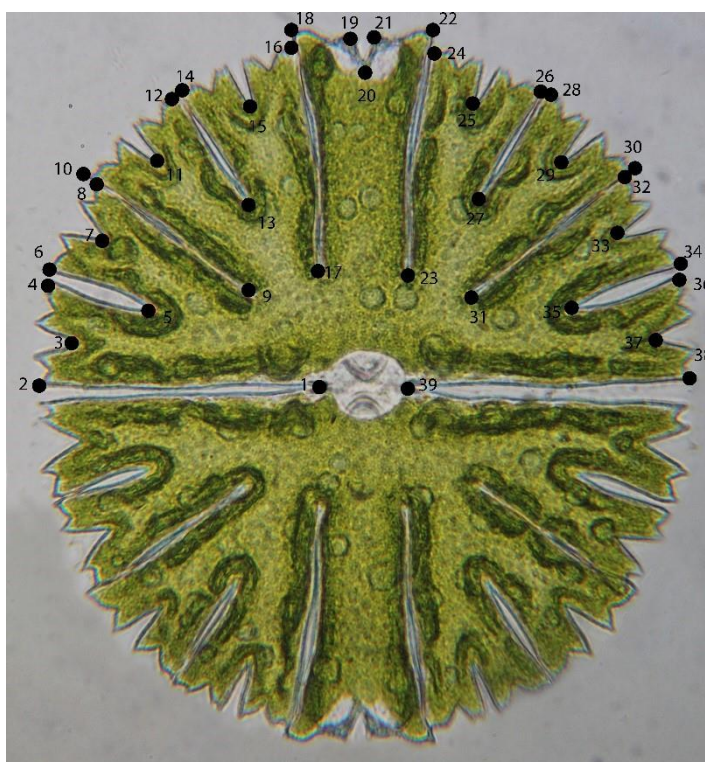


Figura 2. Posição dos 39 marcos anatômicos (“landmarks”) distribuídos ao longo do contorno da semicélula de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

A análise da morfometria geométrica foi conduzida utilizando os programas TpsUtil1.61 (Rohlf 2015) usado para converter e juntar todas as fotomicrografias à disposição em um único arquivo com formato TPS e o programa TpsDig 2.32 (Rohlf 2005) para digitalizar os marcos anatômicos (“landmarks”) ou pontos de referência ao longo do contorno da semicélula, sendo que para cada imagem ou indivíduo analisado foi utilizada uma escala padronizada em micrometros (μm), de forma a calibrar essas imagens.

Posteriormente, o arquivo contendo todos os marcos anatômicos foi importado para o “software” RStudio v.1.4.1 (RStudio Team 2020) e aberto no pacote *Geomorph* R (Adams & Otárola-Castillo 2013). Os dados foram alinhados a partir da Análise Generalizada de Procrustes (GPA) e simetrizados. No procedimento de superposição de Procrustes ou Análise Generalizada de Procrustes, as configurações das semicélulas foram superpostas, para eliminar o efeito da posição, do tamanho e da orientação (Rohlf 1990, Zelditch *et al.* 2000).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para conhecer a variação da forma celular entre os indivíduos ao longo de um morfoespaço. A Análise de Discriminante Linear (LDA) foi realizada para avaliar a discriminação dos grupos de indivíduos por probabilidade de reatribuição (McLachlan 1992). Para tanto, foram utilizados todos os valores não zerados obtidos através dos

escores da PCA e esses dados foram analisados no “software” RStudio v.1.4.1 (R Core Team 2019), através do pacote MASS (Venables & Ripley 2002).

Para avaliar possíveis diferenças significativa entre as formas celulares dos indivíduos analisados através da morfometria geométrica, foi realizada uma Análise de Variância Multivariada não paramétrica (NP-MANOVA) a partir da matriz de distância euclidiana no “software” Past v. 2.17 (Hammer *et al.* 2001).

3.3.1. Morfometria geométrica do material da literatura clássica

Para fins de determinação taxonômica das cepas estudadas, foi realizada a análise de morfometria geométrica em 23 figuras representativas de cada táxon infraespecífico descrito na literatura clássica para *M. denticulata* e *M. thomasi*. Além disso, foi utilizada uma figura representativa pertencente à cepa CCAC2253 identificada como *Micrasterias thomasi* cf. var. *notata*, uma das poucas cepas em que se dispôs de dados moleculares para a espécie *M. thomasi*, conforme tabela 2.

Tabela 2. Tabela com os táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e *M. thomasi* propostos na literatura e na cepa CCAC2253.

Imagens da literatura para MG	
<i>Micrasterias thomasi</i>	<i>Micrasterias denticulata</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> W.Archer	<i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>javanica</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>angulosa</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>pulcherrima</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>angustosinuata</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>notata</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>africana</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>ornata</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>japonica</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>ornata</i> f. <i>africana</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>taylorii</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>evoluta</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>intermedia</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>torneensis</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>basiprotuberans</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>madagascariensis</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> var. <i>granulosa</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>andamanensis</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> f. <i>mucronata</i>
<i>Micrasterias thomasi</i> var. <i>maxima</i>	<i>Micrasterias denticulata</i> f. <i>mamillata</i>
Cepa 2253	---

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de morfometria linear (ML)

A análise de morfometria linear foi realizada em 79 indivíduos distribuídos em oito cepas. Na fig. 3, estão representadas as semicélulas de cada indivíduo pertencente a cada uma das oito cepas analisadas.

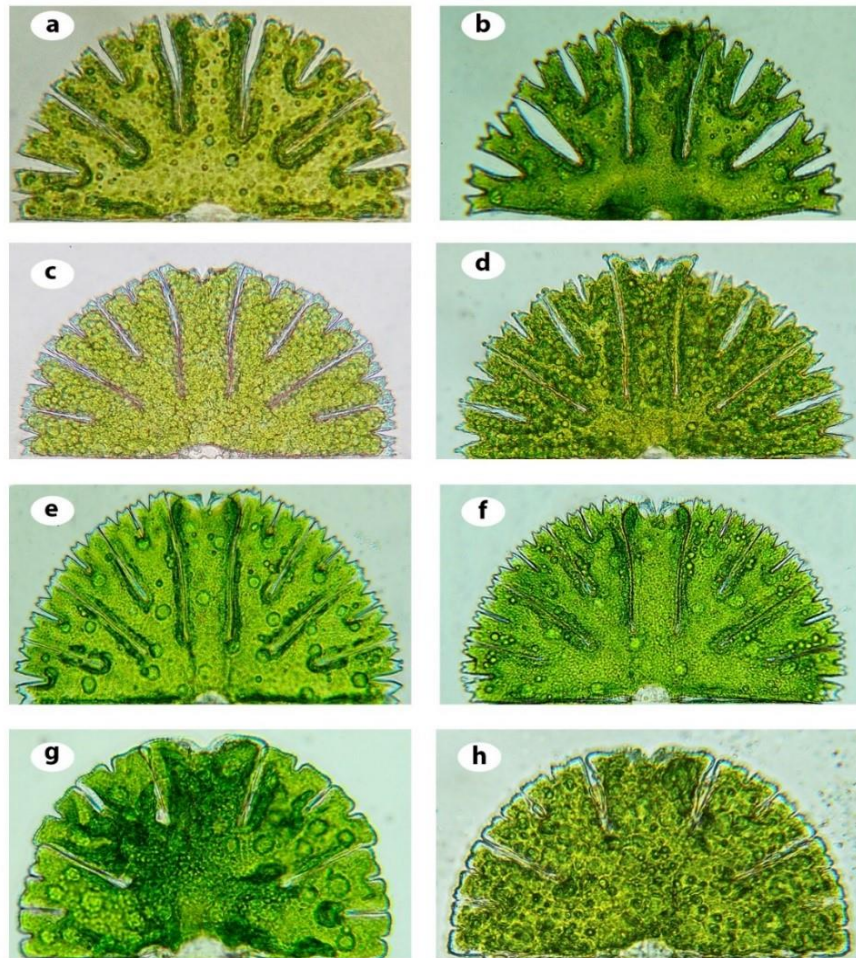


Figura 30. Semicélulas de *Micrasterias*. Fig. a-f. *M. thomasiانا* (a. cepa MZCH08, b. cepa MZCH32, c. MZCH77, d. MZCH244, e. cepa MZCH675, f. cepa CCAC1026); fig. g-h. *M. denticulata* (g. cepa MZCH50, h. cepa MZCH216).

4.1.1. Comprimento total da semicélula (CT)

O comprimento total da semicélula (CT) apresentou variação significativa em todas as cepas analisadas (fig. 4).

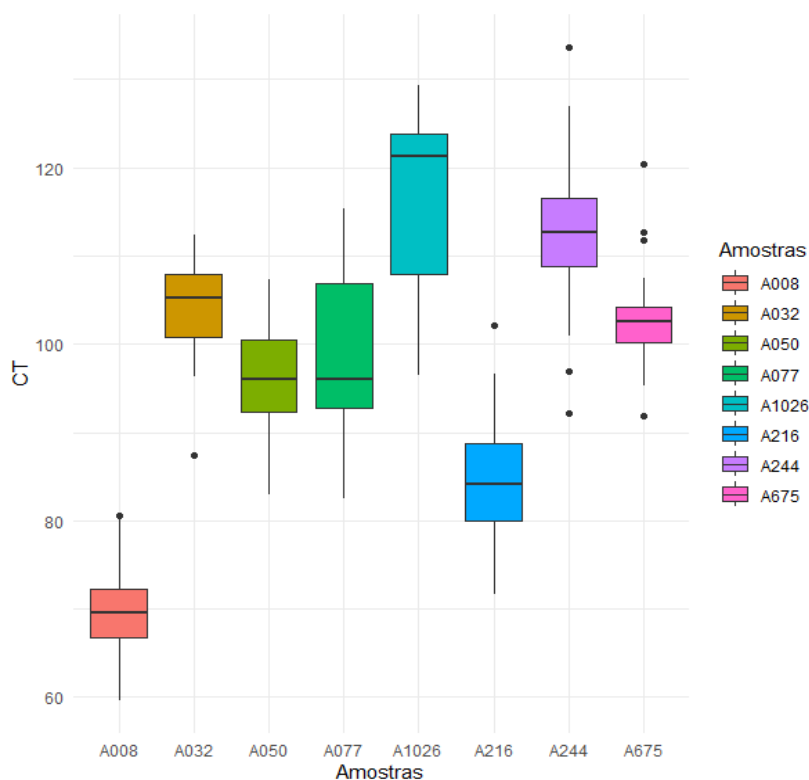


Figura 4. Comprimento total da semicélula (CT) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

Em relação às cepas identificadas como *M. denticulata*, a cepa MZCH50 apresentou o valor mínimo 82 μm e o máximo 109 μm ; e a maioria dos valores, a mediana crescente de 93 μm a 100 μm . A cepa MZCH216 apresentou valor mínimo 72 μm e máximo 97 μm e foi observado um ‘outlier’ com valor 102 μm . A mediana apresentou distribuição simétrica, com os dados concentrados ao seu redor (entre os limites 72 μm e 97 μm).

As seis cepas identificadas como *M. thomasiiana* apresentaram, por seu turno, ampla variação métrica em relação ao atributo comprimento celular total (CT). A cepa MZCH08 apresentou o menor valor quando comparada com as outras, tanto de *M. thomasiiana* quanto de *M. denticulata*. Os indivíduos analisados demonstraram um intervalo de variação relativamente estreito, com valor mínimo de 60 μm e máximo de 80 μm .

As cepas MZCH32 e MZCH675 apresentaram valores similares para o atributo comprimento celular total (CT). A cepa MZCH32 apresentou valor mínimo 98 μm e máximo 112 μm . E a maioria dos valores concentrou-se entre 101 μm e 109 μm , refletindo uma tendência crescente em relação à mediana.

A cepa MZCH675 apresentou valor mínimo 95 μm e máximo 108 μm , significando que a maioria dos valores está mais concentrada em torno da mediana. Foram observados quatro ‘outliers’, sendo que a maioria deles está acima do valor máximo e apenas um ficou abaixo do valor mínimo. A mediana apresentou tendência crescente, ficando com o valor 103 μm .

As cepas MZCH77, CCAC1026 e MZCH244 apresentaram valores próximos e são as cepas que incluíram os maiores indivíduos de *M. thomasi*.

A cepa MZCH77 apresentou valores mínimo 82 μm e máximo 116 μm e não incluiu ‘outlier’; e a média dos dados foi 96 μm e a maioria deles entre 92 μm e 117 μm . A cepa CCAC1026 apresentou valores mínimo 98 μm e máximo 129 μm . A maioria dos valores concentrou-se na faixa de 109 μm a 124 μm , destacando a dominância dos tamanhos maiores dos organismos nesse intervalo específico.

A cepa MZCH244 apresentou valores mínimo 101 μm e máximo 127 μm . Foram observados três ‘outliers’ tanto em valores acima do máximo quanto abaixo do mínimo. A mediana apresentou distribuição simétrica, com os dados concentrados em torno da mediana. A maioria dos valores obtidos dessa cepa esteve entre 109 μm e 117 μm .

4.1.2. Comprimento celular médio (CM)

Ao analisar os resultados do comprimento celular médio (CM), foi possível perceber a existência de variação significativa entre as cepas estudadas, tanto as da mesma espécie *M. denticulata* (cepas MZCH50 e MZCH216) quanto as de *M. thomasi* (cepas MZCH08, MZCH32, MZCH77, MZCH244, MZCH675 e CCAC1026) (fig. 5).

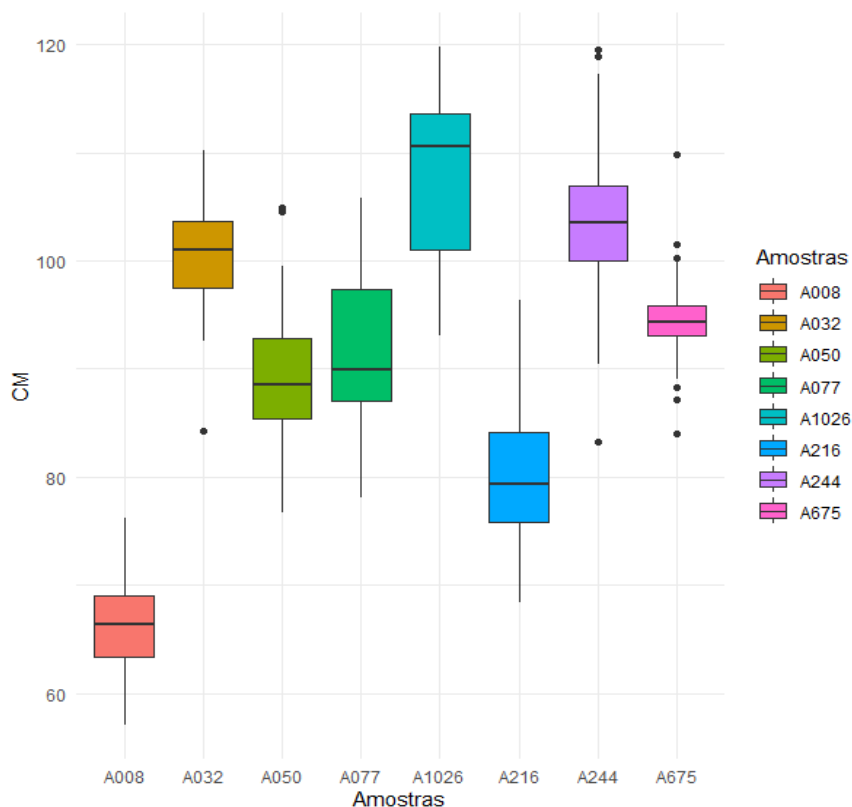


Figura 5. Comprimento celular médio (CM) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

As cepas de *M. denticulata* ora estudadas apresentaram medidas lineares diferentes. A cepa MZCH50 apresentou valor mínimo 78 μm e máximo 99 μm . A mediana apresentou leve tendência decrescente e os dados ficaram entre 86 μm e 94 μm , tendo como média 89 μm .

As cepas de *M. thomasi* apresentaram medidas lineares distintas em relação ao atributo comprimento celular médio (CM). A cepa MZCH08 exibiu os menores valores quando comparada com as outras cepas da mesma espécie. O valor mínimo foi 56 μm e o máximo 77 μm . A mediana apresentou tendência crescente, os valores ficaram entre 64 μm e 69 μm e a média dos organismos 67 μm .

As cepas MZCH32, MZCH244 e CCAC1026 apresentaram valores do comprimento celular médio (CM) muito próximos uns dos outros e foram os organismos que apresentaram maior valor quando comparados com os das outras cepas.

A cepa MZCH32 exibiu valor mínimo 93 μm e máximo 110 μm . A mediana apresentou tendência crescente e os valores ficaram entre 98 μm e 104 μm , sendo que média dessa cepa foi 102 μm .

A cepa MZCH244 apresentou valor mínimo 91 μm e máximo 118 μm . Apresentou três valores discrepantes ('outliers'), sendo que um deles esteve abaixo do valor mínimo e os demais dois acima do valor máximo. A maioria dos valores esteve entre 100 μm e 107 μm .

A cepa CCAC1026 exibiu valor mínimo 101 μm e máximo 113 μm . Mostrou alta variabilidade dos dados e a mediana apresentou tendência crescente dos valores com o valor 111 μm . A maioria dos valores esteve entre 101 μm e 114 μm .

A cepa MZCH77 apresentou valor mínimo 79 μm e máximo 106 μm . A mediana apresentou tendência decrescente, com o valor 90 μm . A cepa 675 apresentou, contudo, valor mínimo 89 μm e máximo 100 μm . A mediana apresentou tendência central, sendo que todos os valores estiveram próximos da mediana que ficou em 95 μm .

4.1.3. Comprimento do lobo polar (CLP)

Relativo ao comprimento do lobo polar (CLP, fig. 6), observou-se ampla variação entre as diferentes cepas analisadas. As cepas MZCH08, MZCH50 e MZCH216 destacaram, por um lado, por apresentar os menores valores, variando entre 32 μm e 43 μm . Por outro lado, as cepas MZCH32, CCAC1026 e MZCH244 exibiram os maiores comprimentos, variando entre 59 μm e 91 μm .

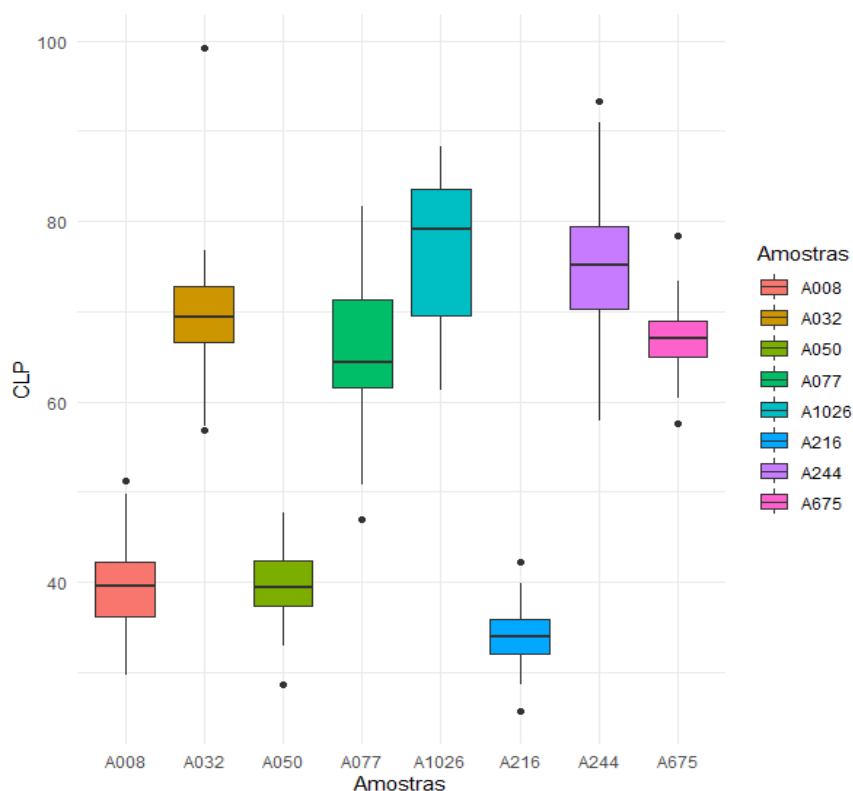


Figura 6. Comprimento do lobo polar (CLP) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

As cepas MZCH50 e MZCH216 de *M. denticulata* apresentaram valores diferentes entre si. A cepa MZCH50 apresentou valor mínimo 33 µm e máximo 48 µm, com apenas um valor ‘outlier’ abaixo do mínimo mencionado, sendo que a maioria das medidas obtidas ficou entre 38 µm e 43 µm, apresentando baixa variabilidade dos dados. A cepa MZCH216 apresentou valor mínimo 29 µm e máximo 40 µm, com dois ‘outliers’, um dos quais foi acima do valor máximo e o outro abaixo do valor mínimo. A mediana ficou centralizada e seu valor foi 35 µm.

A cepa MZCH08 apresentou valores mínimo 30 µm e máximo MZCH50 µm, com um ‘outlier’ acima do valor máximo (51 µm). A maioria dos valores obtidos ficou concentrada entre 36 µm e 42 µm, apresentando baixa variabilidade dos dados.

As cepas MZCH32, MZCH244 e CCAC1026 apresentaram os maiores valores do comprimento do lobo polar. A cepa MZCH32 apresentou 58 µm como valor mínimo e 77 µm como valor máximo e apresentou um ‘outlier’ que ficou abaixo do valor mínimo, enquanto a maioria dos valores obtidos ficou centrada entre 67 µm e 73 µm.

A cepa MZCH244 apresentou, por seu turno, valor mínimo 58 µm e máximo 91 µm, com um ‘outlier’ acima do valor máximo. E a cepa CCAC1026 apresentou o valor mínimo 61 µm e o máximo 89 µm, sendo que a maioria dos dados ficou concentrada entre 79 µm e 84 µm.

A cepa MZCH77 exibiu o valor mínimo 51 µm e máximo M2 µm, com um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo. E, por fim, a cepa MZCH675 mostrou valor mínimo 61 µm e máximo 69 µm. No

entanto, ocorreram dois ‘outliers’, um acima do valor máximo e o outro abaixo do valor mínimo, sugerindo ligeira dispersão nos dados.

4.1.4. Largura do lobo polar (LBPolar)

A largura do lobo polar (LBPolar, fig. 7) apresentou variação na grande maioria das cepas ora estudadas. As cepas MZCH08 e MZCH675 exibiram, de forma destacada, os valores mais baixos, enquanto a cepa MZCH216 apresentou os valores mais elevados.

As cepas MZCH32 (*M. thomasi*) e MZCH50 (*M. denticulata*) mostraram, contudo, valores próximos entre si, assim como as cepas MZCH77 e CCAC1026 de *M. thomasi*, que igualmente exibiram resultados semelhantes.

No entanto, outras cepas (MZCH216, MZCH244 e MZCH675) apresentaram variação significativa em relação a este atributo morfológico. Destaque-se que as cepas MZCH50 e MZCH216 de *M. denticulata* foram as que apresentaram os maiores valores referentes à largura do lobo polar (LBPolar).

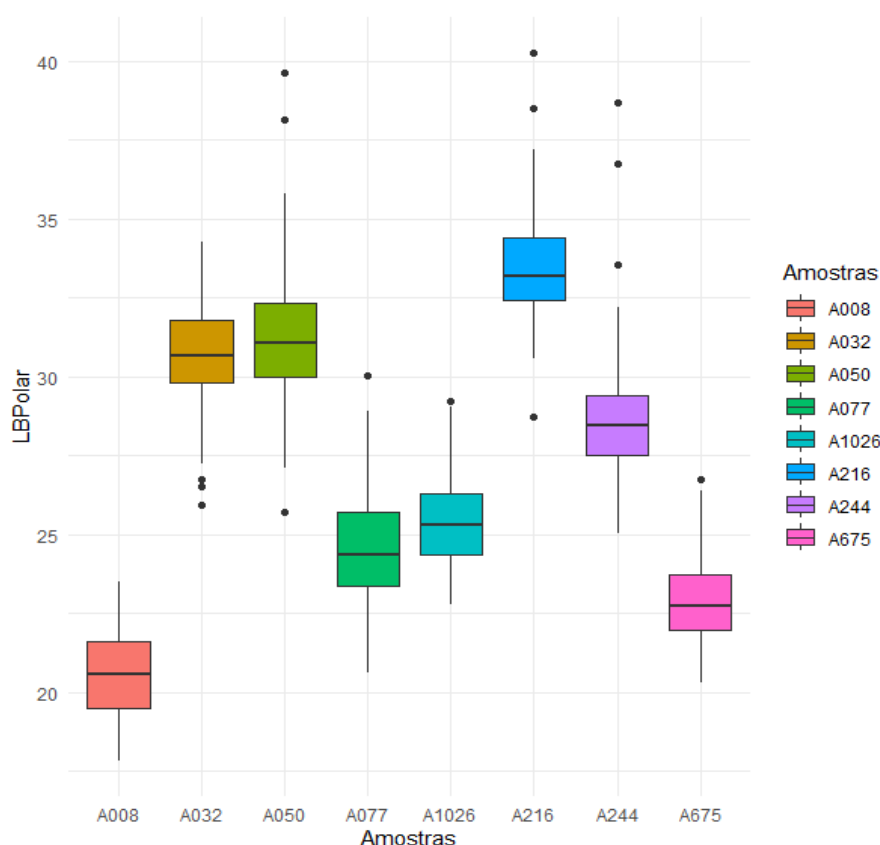


Figura 7. Largura do lobo polar (LBPolar) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

A cepa MZCH50 registrou amplitude de 29 μm a 37 μm , com a maioria dos valores concentrada entre 30 μm e 32 μm . Neste intervalo, foram identificados três valores discrepantes ('outliers'), dois dos quais acima do valor máximo e um abaixo do mínimo. A cepa MZCH216 apresentou, entretanto, variação de 31 μm a 37,4 μm , com a maioria dos valores concentrada entre 32,5 μm e 34,8 μm . Também foram observados três valores discrepantes, sendo dois acima do máximo e um abaixo do mínimo.

A cepa MZCH08 apresentou valores que variaram entre 16 μm e 23,5 μm , sem a existência de 'outliers', com baixa variação nos dados. Por outro lado, a cepa MZCH32 mostrou amplitude maior, variando de 27,4 μm a 36,3 μm , com a maioria dos valores entre 30 μm e 32,3 μm . Foram observados 'outliers' abaixo do valor mínimo e a mediana indicou tendência decrescente em torno de 31,3 μm , com baixa variação.

As cepas MZCH77 e CCAC1026 exibiram valores muito próximos entre si e mesmo sobrepostos. A cepa MZCH77 apresentou valores que variaram de 21 μm a 29 μm e a segunda (cepa CCAC1026) valores entre 23 μm e 28,5 μm . Ambas incluíram a presença apenas de um 'outlier' acima do valor máximo.

A cepa MZCH244 apresentou faixa de valores que variaram entre 25 μm e 32 μm . Destacaram três 'outliers' acima do valor máximo, enquanto a mediana centralizou em torno de 28,5 μm , indicando baixa variabilidade dos dados.

Por fim, a cepa MZCH675 exibiu uma amplitude menor, variando de 21 μm a 26 μm . Foi observado apenas um 'outlier' acima do valor máximo.

4.1.5. Largura apical (Lapic)

Ao examinar os resultados do atributo largura apical (Lapic, fig. 8), foi possível detectar certa proximidade dos valores obtidos, tanto entre as cepas da mesma espécie quanto entre as das diferentes espécies.

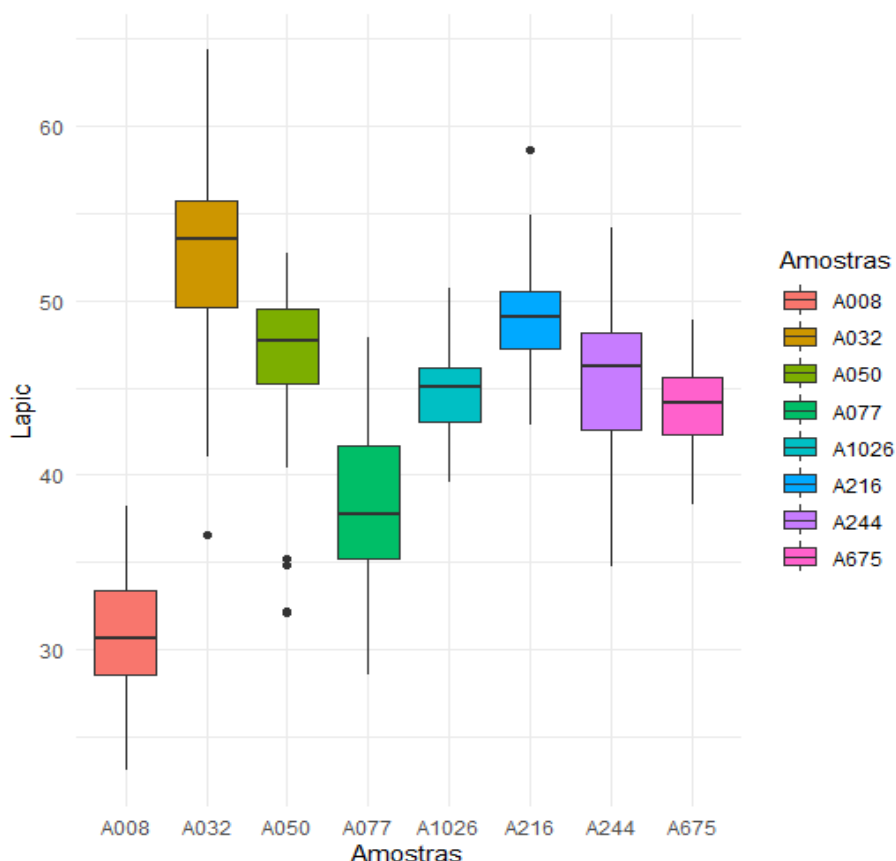


Figura 8. Largura apical (Lapic) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

As cepas de *M. denticulata* apresentaram valores semelhantes e sobrepostos. A cepa MZCH50 incluiu o valor mínimo 41 μm e o máximo 56 μm , incluindo três ‘outliers’ abaixo do valor mínimo. A cepa MZCH216 apresentou o valor mínimo 43 μm e o máximo 55 μm , incluindo apenas um ‘outlier’ acima do valor máximo.

As cepas de *M. thomasiiana* apresentaram variação nos valores desse atributo. Algumas cepas incluíram valores muito próximos e sobrepostos (cepas MZCH244, MZCH675 e CCAC1026). Exceto a cepa MZCH32, que apresentou os maiores valores medidos para este atributo, mas foi seguida pelas cepas MZCH77 e MZCH08, que apresentaram os menores valores.

A cepa MZCH08 exibiu o valor mínimo 25 μm e o máximo 38 μm . A cepa MZCH32 apresentou o valor mínimo 41 μm e o máximo 64 μm e a maioria dos resultados esteve concentrada entre 49 μm e 51 μm , apresentando apenas um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo.

A cepa MZCH77 apresentou o valor mínimo 29 μm e máximo 42 μm e a maioria dos resultados ficou concentrada entre 35 μm e 43 μm , não apresentando ‘outliers’. A cepa CCAC1026 apresentou, por sua vez, o valor mínimo 39 μm e o máximo 51 μm , a maioria dos resultados concentrada entre 44 μm e 46 μm , sem apresentar ‘outliers’. A variação dos dados foi baixa e a mediana apresentou tendência crescente, com o valor de 45 μm .

As cepas MZCH244 e MZCH675 apresentaram resultados próximos, sendo que a cepa MZCH244 apresentou maior variação desses dados, com o valor mínimo 35 μm e o máximo 54 μm . A maioria dos dados esteve concentrada entre 44 μm e 48 μm . Já na cepa MZCH675 o valor mínimo foi 39 μm e o máximo 48 μm , a maioria dos dados concentrada entre 44 μm a 46 μm .

4.1.6. Largura celular total (LT)

No que tange ao atributo morfológico largura celular total (LT, fig. 9), as cepas de *M. denticulata* apresentaram os menores valores quando comparadas com as de *M. thomasi*, onde os resultados variaram bastante, mas quase todos apresentando valores altos.

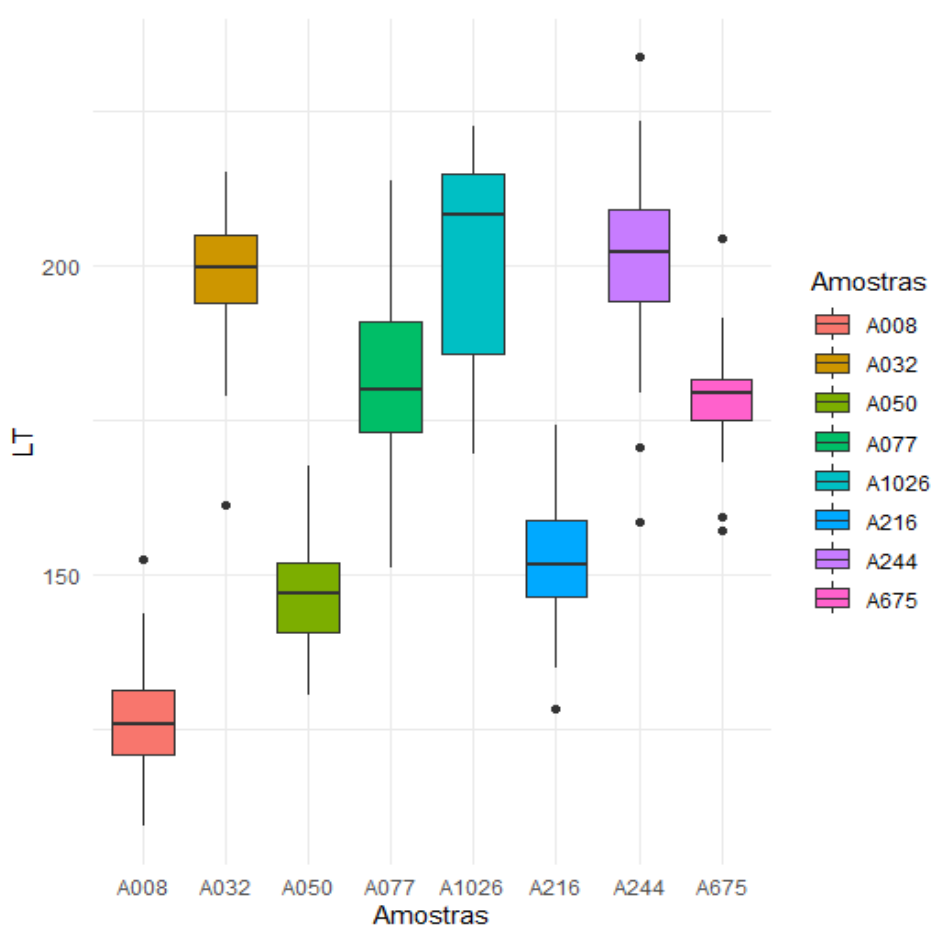


Figura 9. Largura celular total (LT) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

As cepas de *M. denticulata* apresentaram valores próximos de LT. A cepa MZCH50 apresentou o valor mínimo 130 μm e o máximo 167 μm , com a maioria dos valores concentrada entre 180 μm e 152 μm . A cepa MZCH216 exibiu o valor mínimo 140 μm e o máximo 174 μm e a maioria dos dados concentrada entre 145 μm e 165 μm , incluindo apenas um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo.

A cepa MZCH08 apresentou o valor mínimo 109 μm e o máximo 143 μm , incluindo apenas um acima do valor máximo e a maioria concentrada entre 117 μm e 130 μm .

A cepa MZCH32 apresentou o valor mínimo 180 μm e o máximo 215 μm , apenas um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo e a maioria concentrada entre 180 μm e 210 μm .

A cepa MZCH77 apresentou o valor mínimo 152 μm e o máximo 213 μm , não incluiu ‘outlier’ e a maioria dos dados esteve concentrada entre 167 μm e 190 μm . A cepa CCAC1026 exibiu o valor mínimo 169 μm e o máximo 222 μm , nenhum ‘outlier’ e a maioria dos dados concentrada entre 185 μm e 215 μm .

A cepa MZCH244 apresentou o valor mínimo 180 μm e o máximo 220 μm , incluiu três ‘outliers’, sendo um deles acima do valor máximo e dois abaixo do mínimo. A cepa MZCH675 apresentou, por fim, o valor mínimo 165 μm e o máximo 190 μm , três ‘outliers’, um dos quais acima do valor máximo e dois abaixo do mínimo.

4.1.7. Largura do lobo lateral 1 (LLat1)

De acordo com os valores obtidos para o atributo morfológico largura do lobo lateral 1 (LLat1) e apresentados na fig. 10, observou-se que a grande maioria das cepas de *M. thomasi* apresentou valores muito próximos e sobrepostos (cepas MZCH77, CCAC1026, MZCH244 e MZCH675). Destacam-se, entretanto, as cepas MZCH08 e MZCH32 que apresentaram, respectivamente, os menores e os maiores valores para este atributo morfológico.

Ao analisar as cepas de *M. denticulata*, observou-se diferenças significativas entre elas, embora o valor máximo da cepa MZCH50 sobreponha os valores mínimos da cepa MZCH216.

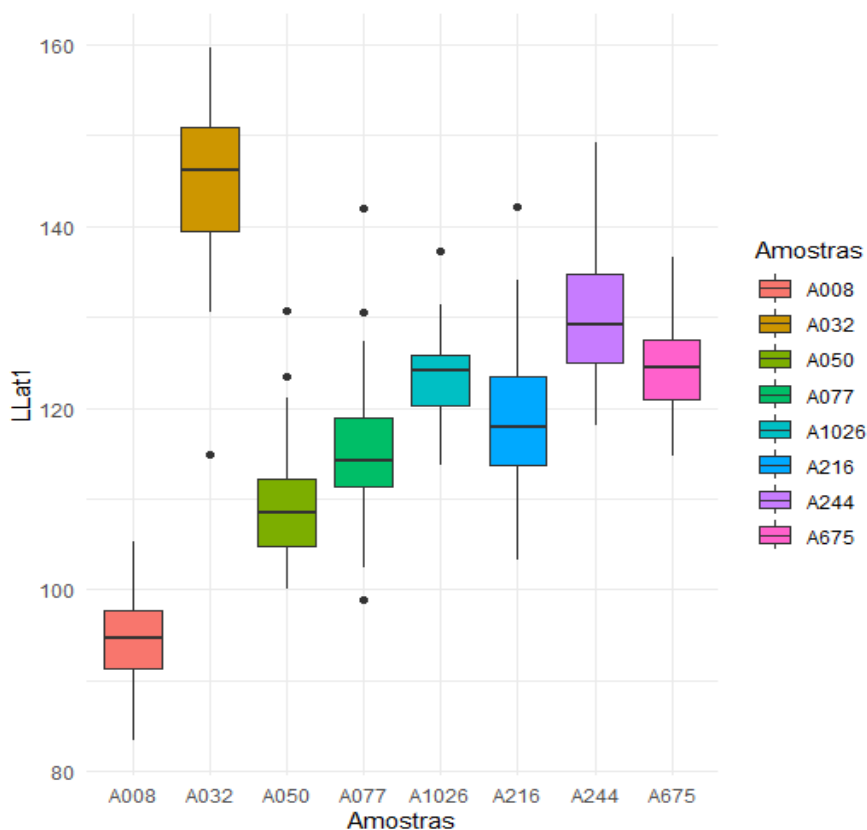


Figura 10. Largura do lobo lateral 1 (LLat1) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

A cepa MZCH50 mostrou amplitude que variou de 100 μm a 121 μm , com a ocorrência de dois ‘outliers’ acima do valor máximo. A maioria dos dados concentrou-se entre 105 μm e 113 μm . Por outro lado, a cepa MZCH216 apresentou a amplitude da largura do lobo lateral 1 entre 103 μm e 124 μm , com apenas um ‘outlier’ acima do valor máximo. A maior parte dos valores ficou entre 114 μm e 124 μm , indicando alta variabilidade.

Ao analisar as cepas de *M. thomasiiana*, observou-se grande discrepância nos resultados da largura do lobo lateral 1. A cepa MZCH08 exibiu amplitude entre 83 μm e 105 μm , sem incluir ‘outliers’, e a maioria dos valores medidos concentrou-se entre 92 μm e 98 μm . A variação foi baixa e a mediana indicou tendência crescente, aproximando-se de 95 μm .

A cepa MZCH32 apresentou, por seu turno, valores variando de 121 μm a 159 μm , com apenas um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo. A maior parte das medidas agrupou-se entre 139 μm e 151 μm , evidenciando alta variabilidade. A mediana apresentou tendência crescente, aproximando-se de 146 μm .

A cepa MZCH77 exibiu amplitude de 103 μm a 128 μm , com três ‘outliers’, sendo um abaixo do valor mínimo e dois acima do máximo. A maioria dos dados concentrou-se entre 112 μm e 119 μm .

A cepa CCAC1026 apresentou valores que variaram de 114 μm a 122 μm , com um ‘outlier’ acima do valor máximo. A maioria dos dados concentrou-se entre 121 μm e 126 μm , demonstrando baixa variabilidade.

A cepa MZCH244 exibiu amplitude de 119 μm a 149 μm , sem ‘outliers’. A maioria dos dados agrupou-se entre 114 μm e 123 μm . A cepa MZCH675 apresentou, afinal, amplitude de 114 μm a 136 μm , sem ‘outliers’. A maioria dos valores medidos concentrou-se entre 121 μm e 127 μm .

4.1.8. Largura do lobo lateral 2 (LLat2)

Os valores observados da largura do lobo lateral 2 (LLat2, fig. 11) retrataram o mesmo comportamento registrado para o atributo morfológico largura do lobo lateral 1 (LLat1, fig. 10).

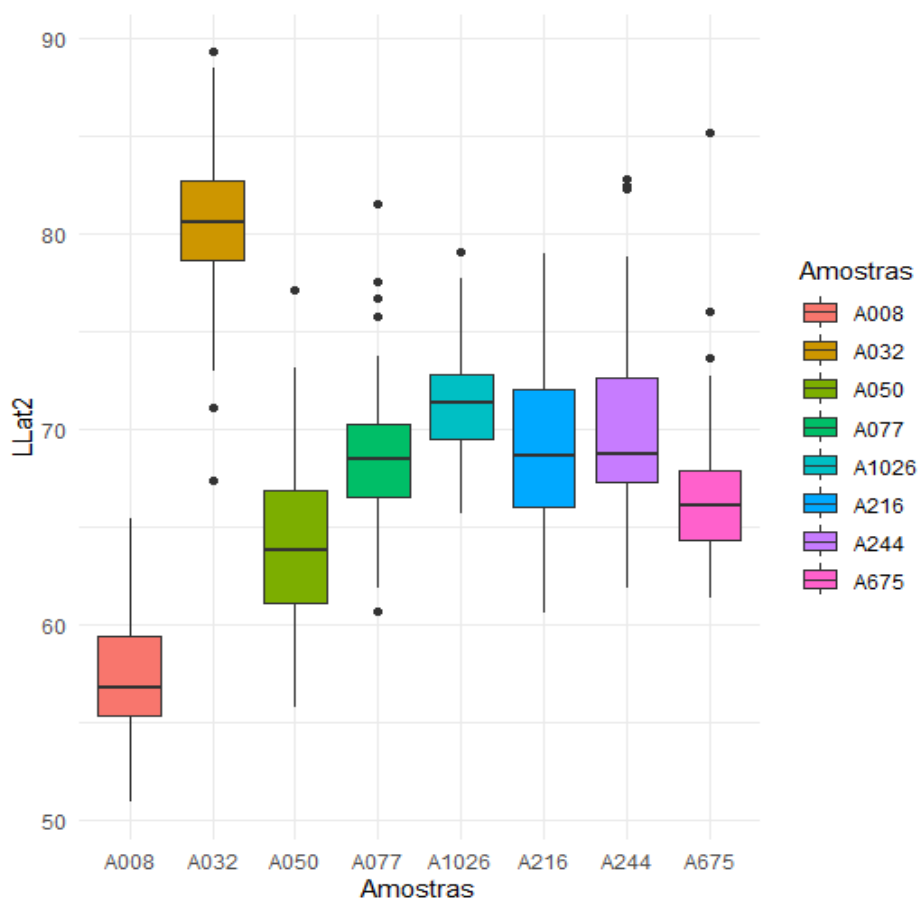


Figura 11. Largura do lobo lateral 2 (LLat2) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiana*.

Com relação às cepas de *M. denticulata*, a MZCH50 apresentou o valor mínimo 56 μm e o máximo 74 μm , a maioria dos valores agrupada entre 62 μm e 67 μm e apresentaram apenas um ‘outlier’ acima do valor máximo. Já a cepa MZCH216 apresentou o valor mínimo 62 μm e o máximo 79 μm , a maioria dos dados agrupada entre 66 μm e 73 μm , sem apresentar ‘outliers’.

Foram observadas diferenças nos valores obtidos, especialmente, das cepas 8 e MZCH32 de *M. thomasi*. A cepa MZCH08 mostrou o menor valor registrado para o referido atributo morfológico, sendo o mínimo 51 μm e o maior valor máximo 66 μm . A maioria dos valores agrupou-se entre 56 μm e 59 μm , sem ‘outliers’.

A cepa MZCH32 exibiu o valor mínimo 74 μm e o máximo 88 μm , a maioria desses valores agrupada entre 79 μm e 83 μm .

As cepas MZCH77, CCAC1026, MZCH244 e MZCH675 apresentaram valores próximos e sobrepostos variando entre 54 μm e 74 μm . A cepa MZCH77 apresentou o valor mínimo 63 μm e o máximo 74 μm , a maioria desses valores agrupada entre 66 μm e 71 μm , incluindo cinco ‘outliers’, dos quais quatro foram acima do valor máximo e apenas um abaixo do valor mínimo.

A cepa CCAC1026 apresentou o valor mínimo 66 μm e o máximo 77 μm , a maioria dos valores agrupando-se entre 69 μm e 74 μm e apresentando apenas um ‘outlier’ acima do valor máximo. A cepa MZCH244 apresentou o valor mínimo 63 μm e o máximo 79 μm , a maioria dos valores obtidos agrupada entre 67 μm e 73 μm , incluindo dois ‘outliers’ acima do valor máximo.

Por fim, a cepa MZCH675 apresentou o valor mínimo 62 μm e o máximo 74 μm , a maioria dos valores agrupada entre 64 μm a 68 μm e apresentando três ‘outliers’ acima do valor máximo.

4.1.9. Largura do istmo (IW)

A largura do istmo (IW, fig. 12) foi o atributo morfológico cuja maioria das cepas apresentou valores mínimos e máximos muito próximos e/ou sobrepostos. Isto ocorreu tanto para as cepas MZCH50 e MZCH216 pertencentes a *M. denticulata*, quanto para as cepas MZCH32, MZCH77, CCAC1026, MZCH244 e MZCH675 de *M. thomasi*. Apenas a cepa MZCH08 (*M. thomasi*) apresentou os menores valores registrados para este atributo morfológico. Esta cepa exibiu, entretanto, os valores médio e máximo sobrepostos àqueles registrados nas outras cepas atualmente analisadas.

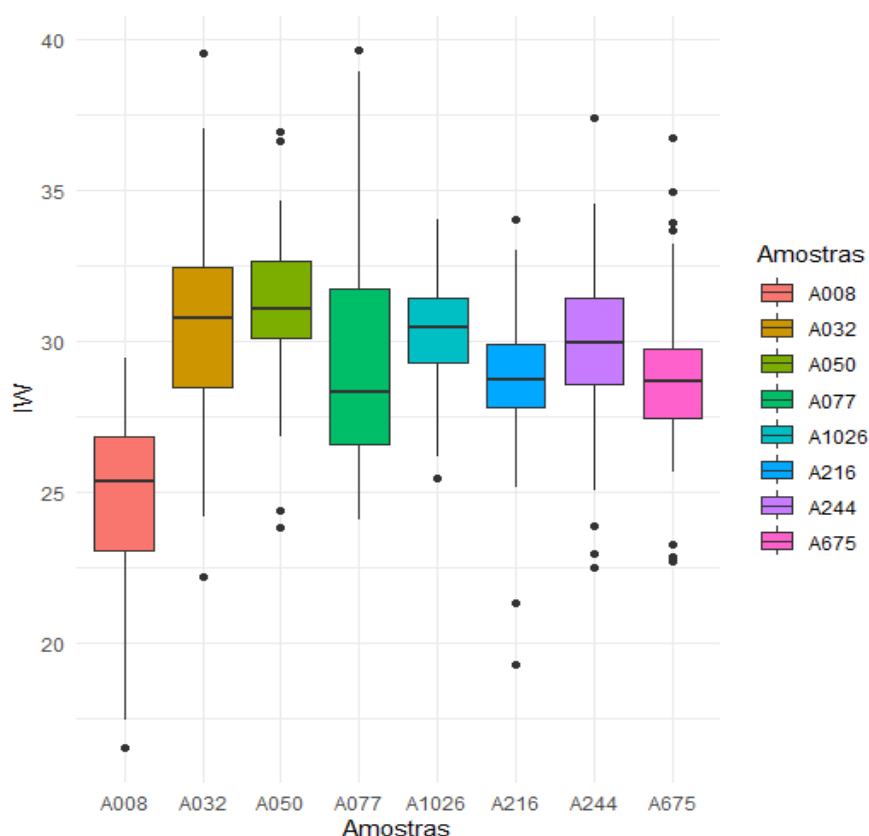


Figura 31. Largura do istmo (IW) das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

No que diz respeito às cepas de *M. denticulata*, a de número MZCH50 apresentou o valor mínimo 24 μm e o máximo 36,5 μm , a maioria desses valores concentrada entre 30 μm e 32,5 μm e incluindo quatro ‘outliers’, sendo dois deles acima do valor máximo e os demais dois abaixo do mínimo. A cepa MZCH216 apresentou o valor mínimo 25 μm e o máximo 33 μm , a maioria dos resultados concentrada entre 26 μm e 30 μm , incluindo três ‘outliers’, dos quais dois foram abaixo do valor mínimo e um acima do máximo. A variação foi baixa e a mediana dos valores apresentou tendência decrescente, com o valor 27,5 μm .

Com relação às cepas de *M. thomasiiana*, a cepa MZCH08 apresentou os menores valores, com o mínimo de 15 μm e o máximo de 29,5 μm e somente um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo. Nesta cepa, a maioria dos resultados ficou concentrada entre 23 μm e 26,5 μm e apresentou só um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo.

As cepas MZCH32, MZCH77, CCAC1026, MZCH244 e MZCH675 apresentaram valores próximos entre si, com variação entre 24,5 μm e 27,5 μm . Embora tenham sido observadas diferenças na variação desses valores entre essas cepas, todas mostraram relativa consistência em suas medidas.

Na cepa MZCH32, os valores variaram de 24,5 μm a 36,5 μm e a maioria entre 28 μm e 32,5 μm . A presença de ‘outliers’ tanto abaixo quanto acima do valor máximo indicou alta variabilidade. A cepa MZCH77 apresentou os resultados variando de 24,5 μm a 38,5 μm , com a maioria dos dados entre 26 μm e 31,5 μm , porém, apenas um ‘outlier’ acima do valor máximo.

A cepa CCAC1026 apresentou esses valores variando entre 26 μm e 34,5 μm e a maioria desses dados entre 29 μm e 32 μm . A presença de apenas um ‘outlier’ abaixo do valor mínimo sugeriu uma

variação mais baixa nos valores. A cepa MZCH244 exibiu uma faixa de valores entre 25 μm e 34,5 μm , com a maioria das medidas concentrada na faixa 28-31,5 μm . A presença de quatro ‘outliers’, três dos quais abaixo do valor mínimo e um acima do máximo, indicou certa variabilidade nos dados.

A cepa MZCH675 mostrou variação de 25,5 μm a 33 μm , com a maioria dos dados entre 27,5 μm e 29,8 μm . A presença de sete ‘outliers’ distribuídos tanto abaixo quanto acima dos valores extremos, sugeriu uma ampla variação desses dados.

4.2. Análise de morfometria geométrica (MG)

A Análise de Morfometria Geométrica foi realizada para o total de 632 indivíduos, ou seja, para 79 indivíduos em cada uma das oito cepas estudadas.

A partir da Análise de Procrustes Generalizada (GPA) foi obtida a configuração “ótima” ou a forma ‘consensus’ (média) de todos os indivíduos analisados (fig. 13). Isto indica que foram capturadas, de forma eficaz, as principais características morfológicas e as variações presentes nos espécimes, eliminando a influência do tamanho, da posição e da orientação.

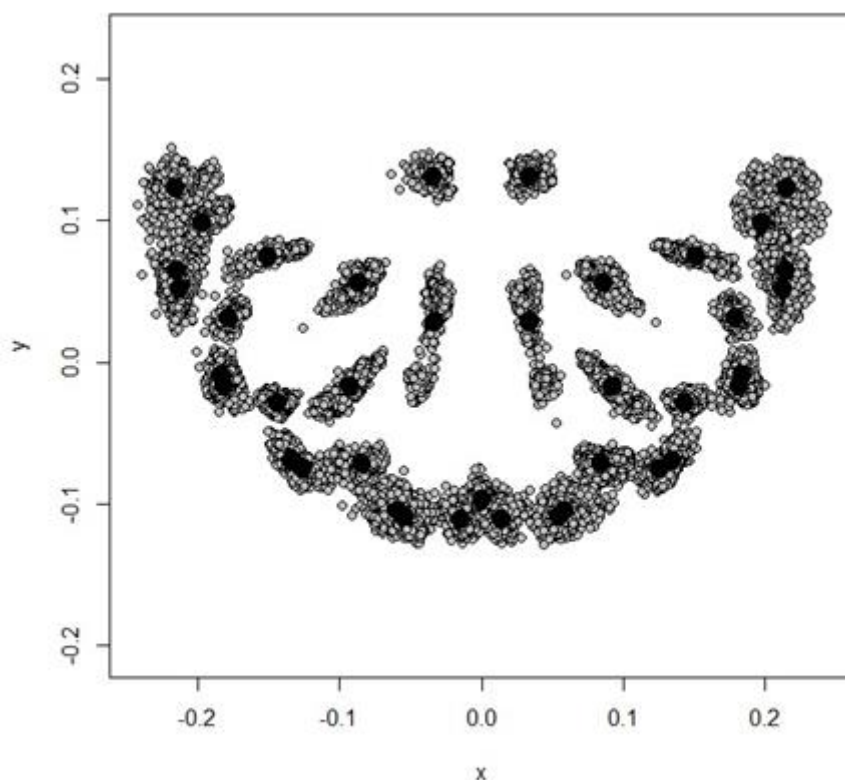


Figura 13. Forma ‘consensus’ obtida através da Análise de Procrustes Generalizada (GPA) ilustrando a configuração “ótima” dos 39 “landmarks” plotados ao longo da semicélula dos indivíduos de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

A Análise de Componentes Principais (PCA, fig. 14) apontou que os dois primeiros eixos foram responsáveis por 80,17% de variação na forma das semicélulas dos componentes das populações de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

A partir da configuração gráfica de cada indivíduo ao longo do morfoespaço, foi possível observar a formação de cinco grupos, além da separação dos indivíduos representantes das duas espécies, *M. denticulata* e *M. thomasi*.

O componente principal 1 (PC 1) abrangeu 55,35% da variação (fig. 14) e foi o eixo com maior influência na representação dos dados. Nesse eixo, foi possível observar as mudanças ao longo da forma celular relacionadas ao comprimento e à largura do lobo polar, à largura lateral e às incisões dos lobos laterais da semicélula. O componente principal 2 (PC 2) representou 24,82% de variação e descreveu as mudanças relacionadas, principalmente, na largura da célula, largura apical e largura do lobo polar.

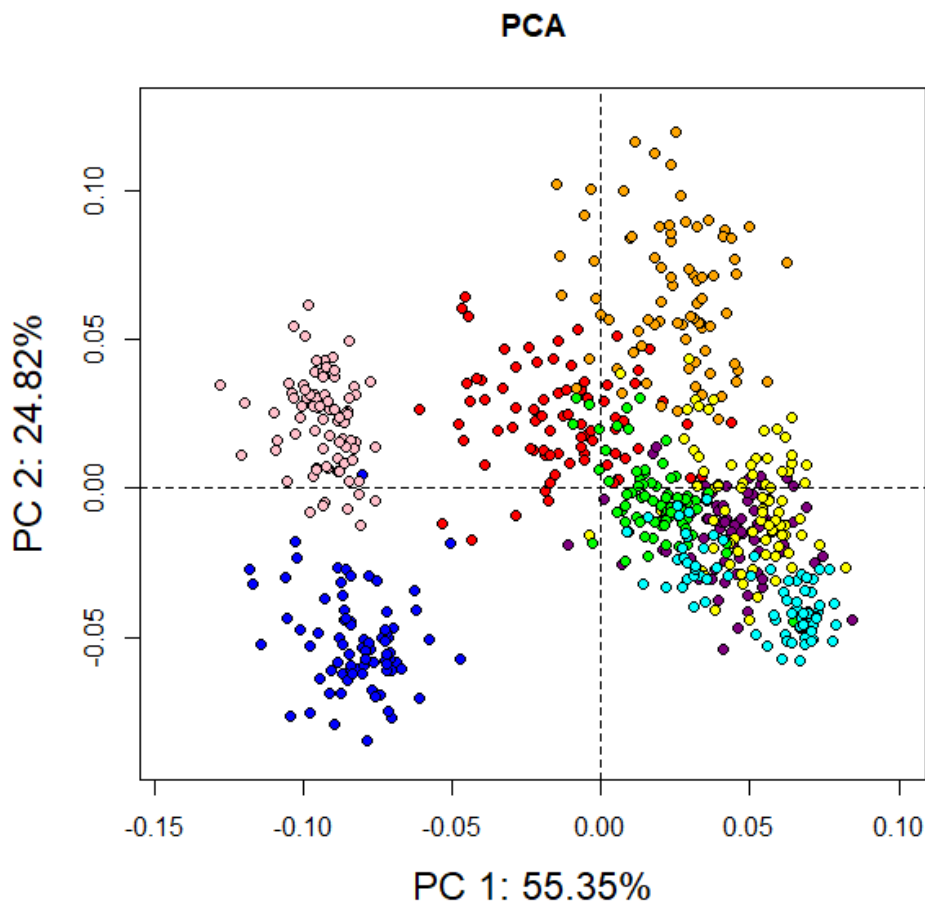


Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) das cepas estudadas. Legenda: rosa claro (cepa MZCH216), vermelho (cepa MZCH08), amarelo (cepa MZCH244), laranja (cepa MZCH32), roxo (cepa MZCH77), verde (cepa MZCH675), azul claro (cepa CCAC1026) e azul escuro (cepa MZCH50).

No lado negativo do eixo 1, estão localizadas as cepas MZCH216 (rosa claro) e MZCH50 (azul escuro), ambas de representantes de *M. denticulata*, assim como alguns indivíduos pertencentes à cepa MZCH08 (vermelho, *M. thomasiiana*). Entretanto, a grande maioria das cepas de *M. thomasiiana* localizou-se no lado positivo do eixo 1, tais como: cepa MZCH675 (verde), cepa MZCH77 (roxo), cepa MZCH244 (amarelo) e cepa CCAC1026 (azul claro). Os indivíduos pertencentes a essas quatro cepas estiveram misturados ao longo do morfoespaço gráfico da PCA, formando um grupo com formas morfológicas semelhantes.

No lado positivo do eixo 2, está localizada a grande maioria dos indivíduos da cepa MZCH08 (vermelho) e da cepa MZCH32 (laranja), além de alguns organismos das cepas MZCH244 e CCAC1026, estas duas de *M. thomasiiana*. Além disso, ainda no lado positivo do eixo 2 estão localizados os indivíduos pertencentes à cepa MZCH216 (rosa claro, *M. denticulata*). No lado negativo do eixo 2, situaram-se todos os indivíduos das cepas MZCH50 (azul escuro, *M. denticulata*) e CCAC1026 (azul claro, *M. thomasiiana*).

A partir dos resultados obtidos através da PCA e da configuração de cada indivíduo ao longo do morfoespaço, foi possível obter os ‘grids’ de deformação, ou seja, a forma exata apresentada por cada indivíduo ao longo do morfoespaço.

De acordo com a configuração do ‘grid’ de deformação referente ao eixo 1 mínimo (lado negativo do eixo 1, fig. 15), verificou-se que os organismos que apresentaram essa forma possuem células pouco a levemente largas, com as incisões dos lobos laterais mais rasas e o lobo polar mais largo e curto.

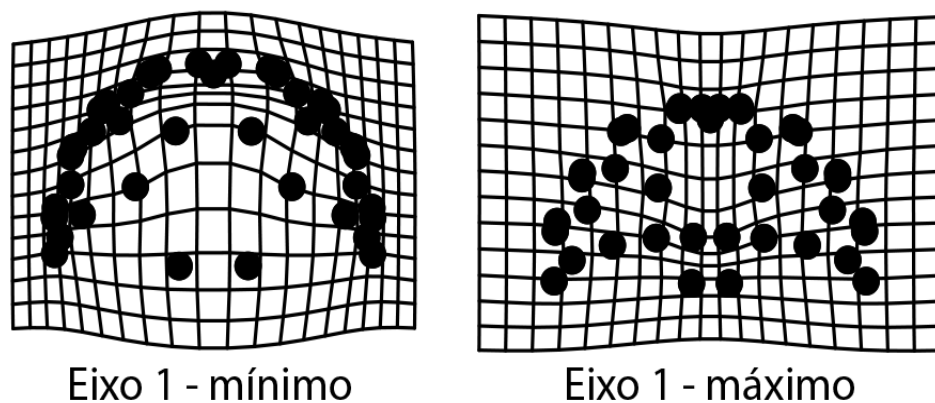


Figura 32. ‘Grids’ de deformação obtidos através do eixo 1 (mínimo e máximo) para as cepas de *M. denticulata* e *M. thomasiana*.

Os indivíduos pertencentes à cepa MZCH216 apresentaram a forma do eixo 1 mínimo. De acordo com essa configuração, os organismos mostraram a largura celular menor, além de incisões mais rasas e lobo polar mais largo e curto (fig. 16).

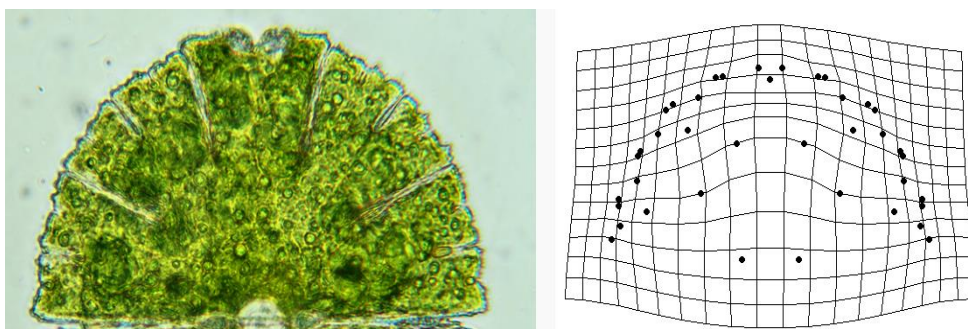


Figura 1633. ‘Grid’ de deformação obtido para os indivíduos pertencentes à cepa MZCH216.

Em relação ao ‘grid’ de deformação do eixo 1 máximo (lado positivo do eixo 1, fig. 15), os organismos apresentaram lobo polar mais longo e mais estreito, além de incisões celulares mais

profundas e menor largura do istmo (fig. 17). Os indivíduos das cepas MZCH77, MZCH244, MZCH675 e CCAC1026 melhor representaram a forma do eixo 1 máximo.

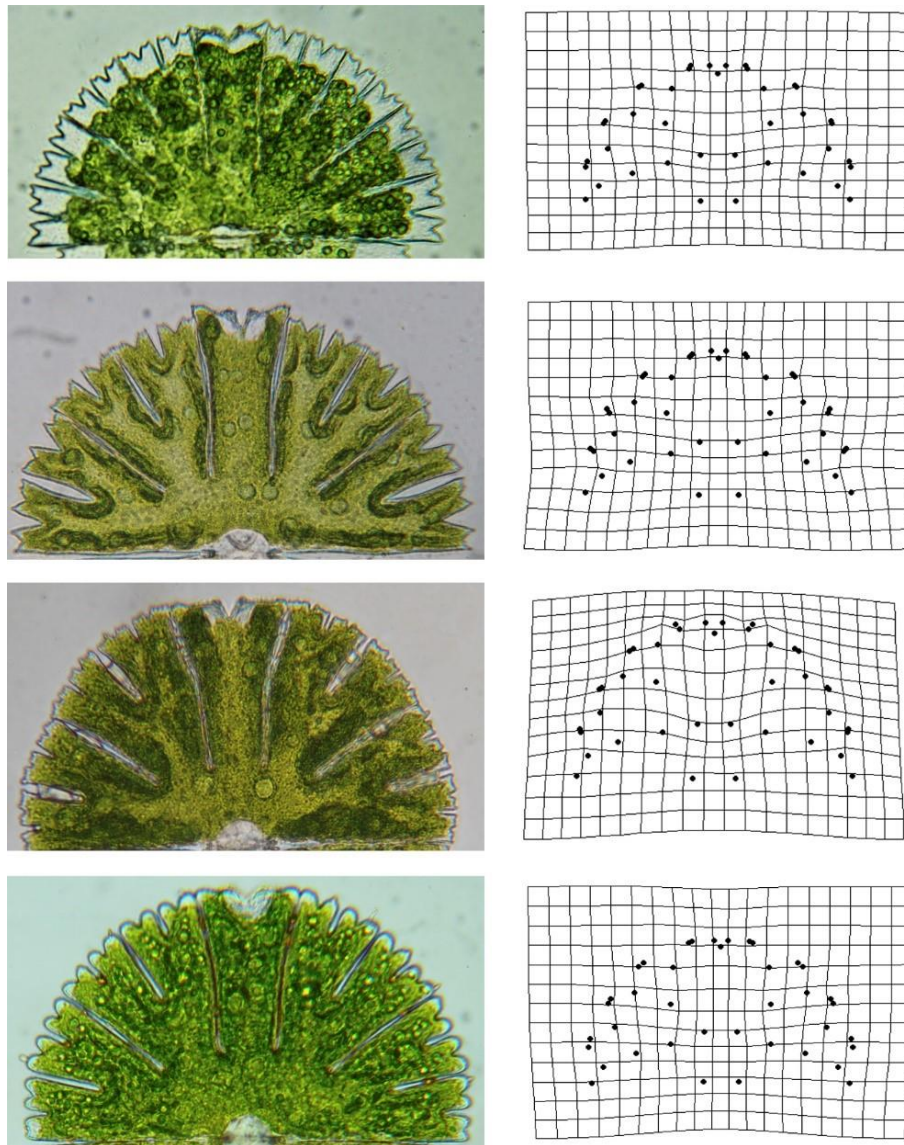


Figura 17. ‘Grids’ de deformação obtidos para as cepas MZCH77, MZCH244, MZCH675 e CCAC1026, respectivamente.

No ‘grid’ de deformação do eixo 2 mínimo (lado negativo do eixo 2, fig. 18) estão localizados os organismos que apresentaram semicélula com formato mais circular, células mais largas que longas, incisões dos lobos laterais menos profundas e lobo apical mais largo.

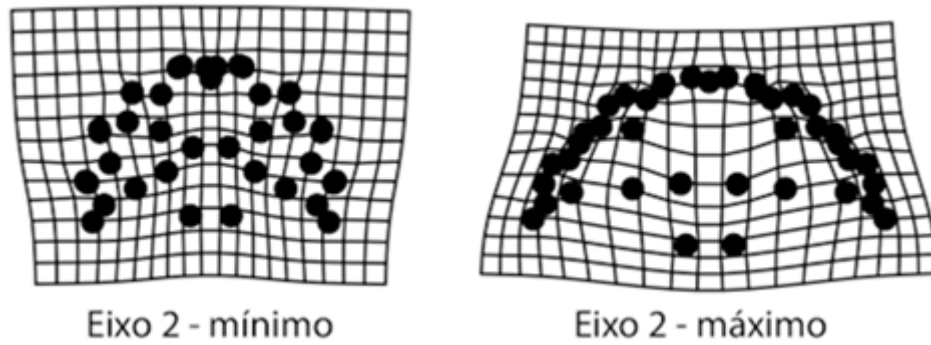


Figura 34. ‘Grids’ de deformação do eixo 2 das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

Os indivíduos pertencentes à cepa MZCH50 apresentaram a forma representada pelo eixo 2 mínimo (fig. 19).

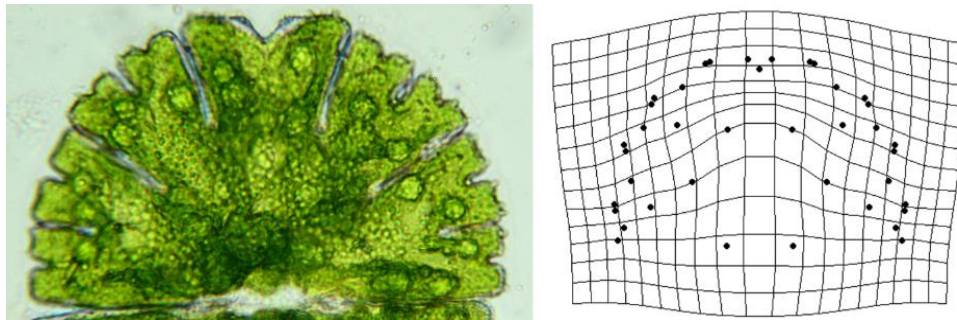


Figura 19. ‘Grids’ de deformação obtidos para os indivíduos pertencentes à cepa MZCH50.

No ‘grid’ de deformação do eixo 2 máximo (lado positivo do eixo 2, fig. 18) estão representados os organismos pertencentes às cepas MZCH08 e MZCH32 (fig. 20). Tais indivíduos apresentaram o lobo lateral mais longo e estreito e o lobo apical largo.

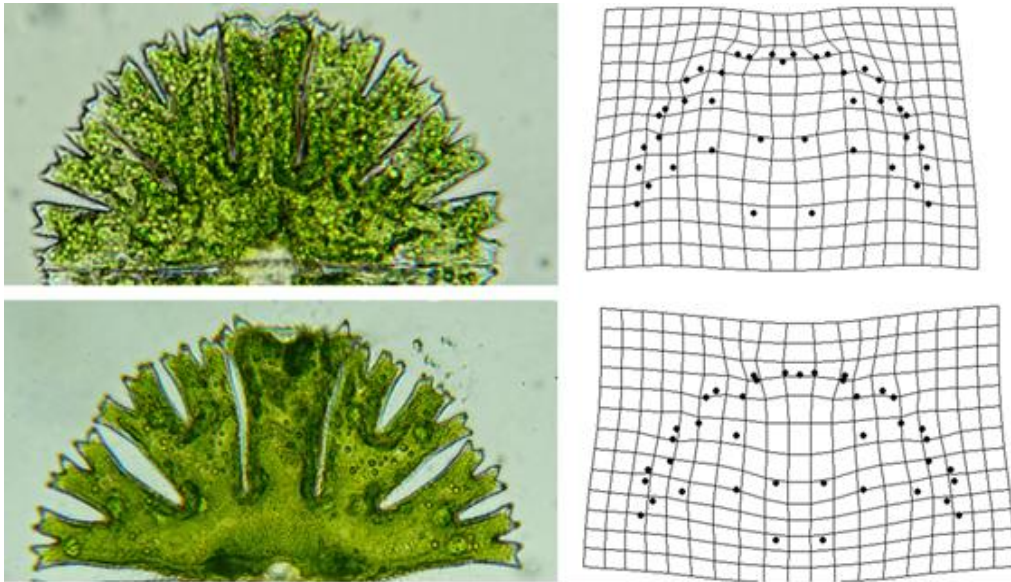


Figura 20. ‘Grids’ de deformação obtidos para as cepas MZCH08 e MZCH32.

A Análise de Discriminante Linear (LDA, fig. 21) mostrou a separação dos indivíduos em quatro grupos, sendo três visualmente muito bem distintos pertencentes às cepas de *M. denticulata* (cepa MZCH216 rosa claro e cepa MZCH50 azul escuro), além dos organismos pertencentes à cepa MZCH32 (laranja) e os demais à *M. thomasi*.

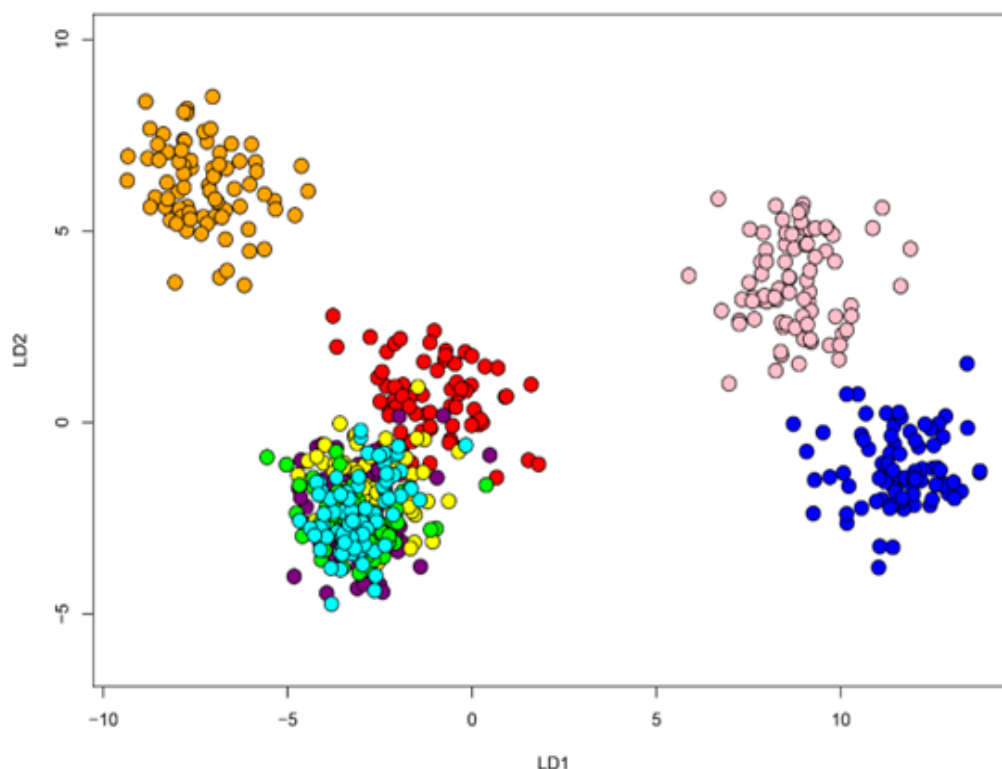


Figura 21. Análise de discriminante linear (LDA). Legenda de cores: rosa claro (cepa MZCH216), vermelho (cepa MZCH08), amarelo (cepa MZCH244), laranja (cepa MZCH32), roxo (cepa MZCH 77), verde (cepa MZCH675), azul claro (cepa CCAC1026) e azul escuro (cepa MZCH50).

Considerando a matriz de correta classificação por predição e reatribuição das cepas (tab. 1 anexa a este capítulo) obtida através da LDA, observou-se que os indivíduos pertencentes às cepas MZCH32, MZCH50, MZCH216, MZCH244 e CCAC1026 não compartilharam características com os indivíduos pertencentes às outras cepas e apresentaram, consequentemente, 100% de correta classificação. A cepa 8 apresentou 99% de correta classificação para os indivíduos pertencentes à referida cepa, apresentando apenas um organismo (0,96371% de correta classificação) compartilhado com a cepa CCAC1026. A cepa MZCH675 apresentou 99% de correta classificação, compartilhando um único indivíduo (1,0) com a cepa CCAC1026.

A cepa MZCH77 apresentou 97% de correta classificação entre seus indivíduos, sendo que três desses indivíduos compartilharam características com a cepa MZCH244 (0,9846%) e a cepa CCAC1026 (0,7195% e 0,9376%).

Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos organismos que apresentaram características compartilhadas com indivíduos de outras cepas foram os previamente identificados como

representantes da espécie *M. thomasi* e todos eles compartilharam características com indivíduos da cepa CCAC1026.

4.2.1. Identificação taxonômica das cepas

A Análise de Morfometria Geométrica (MG) foi realizada em populações de *M. denticulata* e *M. thomasi* em condições de cultivo, juntamente com as figuras representantes de cada táxon infraespecífico (variedade e forma taxonômica) documentado na literatura.

Considerando a matriz de correta classificação/predição das 23 figuras de literatura e as cepas estudadas (tab. 3) gerada a partir da Análise de Discriminante Linear (LDA), observou-se que as cepas MZCH32 e MZCH244 previamente identificadas como *M. thomasi* não compartilharam semelhanças com qualquer ilustração da literatura, o mesmo acontecendo com a cepa MZCH50 (*M. denticulata*).

Tabela 3. Tabela com a matriz de predição e de posterior probabilidade das variedades/formas encontradas em literatura e as cepas.

Táxon	A008	A032	A050	A077	A1026	A216	A244	A675
<i>Micrasterias thomasi</i>								
Archer	7,66E-07	2,86E-29	1,3E-40	0,988948	2,77E-16	8,92E-27	0,011051	2,01E-11
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>andamanensis</i>	1,79E-21	5,34E-20	1E-70	0,984453	0,014224	2,69E-55	0,001324	6,53E-08
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>maxima</i>	3,7E-19	2,72E-39	3,83E-42	1	1,19E-08	3,92E-35	4,13E-08	5,96E-11
<i>Micrasterias thomasi</i> cf.								
var. <i>notata</i> (Cepa 2253)	1,63E-13	2,22E-22	1,37E-51	0,036292	0,963707	1,23E-40	3,61E-09	1,26E-06
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>javanica</i>	1,77E-19	8,63E-20	2,16E-78	1	1,1E-10	2,24E-65	3,98E-21	1,98E-17
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>pulcherrima</i>	2,37E-25	5,62E-29	1,08E-65	1	2,29E-11	2,65E-46	6,34E-15	1,12E-17
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>notata</i>	5,59E-24	1,55E-45	3,27E-64	1	2,6E-25	5,58E-41	2,21E-10	9,7E-30
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>ornata</i>	2,88E-12	2,04E-33	3,88E-54	1,47E-19	2,53E-13	1,55E-55	3,18E-25	1
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>ornata</i> f. <i>africana</i>	3,48E-14	2,56E-16	3,93E-56	3,02E-14	3,54E-10	6E-56	2E-13	1
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>evoluta</i>	0,999992	1,38E-28	6,49E-16	7,66E-06	1,33E-08	8,32E-14	1,12E-12	1,97E-07
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>torneensis</i>	1,2E-13	7E-24	5,22E-50	0,999999	1,41E-06	1,54E-35	1,66E-11	1,58E-08
<i>Micrasterias thomasi</i>								
var. <i>madagascariensis</i>	7,09E-12	9,95E-32	4,06E-26	0,906371	0,093607	3,41E-27	2,15E-05	4,46E-09
<i>Micrasterias denticulata</i>								
Brébisson	7,05E-26	1,77E-67	1,19E-19	1,12E-31	6,47E-44	1	1,09E-27	3,74E-39
<i>Micrasterias denticulata</i> f.								
<i>mucronata</i>	0,24635	1,31E-16	6,32E-40	4,53E-07	2,55E-06	1,18E-20	2,44E-13	0,753637
<i>Micrasterias denticulata</i> f.								
<i>mamillata</i>	2,42E-13	2,51E-20	4,71E-46	0,999998	2,44E-09	3,55E-28	1,66E-07	1,58E-06
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>angulosa</i>	9,54E-14	8,59E-60	0,123266	5,79E-18	6,03E-27	0,876734	2,24E-21	1,76E-36
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>angustosinuata</i>	1,86E-53	7,86E-91	2,01E-10	1,53E-78	1,15E-64	1	5,83E-72	9,65E-66
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>africana</i>	1,93E-21	4,14E-36	1,87E-28	9,24E-28	8,56E-34	1	3,46E-33	2,04E-38
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>japonica</i>	3,11E-07	2,56E-32	8,88E-19	1,08E-30	7,99E-16	1	4,96E-44	9,25E-24
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>taylorii</i>	8,37E-12	1,28E-38	1,2E-39	1	1,2E-17	3,74E-27	2,03E-12	4,12E-13
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>intermedia</i>	1,43E-07	1,67E-24	9,25E-47	1	8,96E-11	1,36E-26	2,19E-08	4,83E-15
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>basiprotuberans</i>	0,144312	1,43E-23	7,47E-17	0,785317	0,001837	0,000951	2,74E-07	0,067583
<i>Micrasterias denticulata</i>								
var. <i>granulosa</i>	3,59E-22	4,06E-67	9,15E-14	2,49E-20	3E-40	1	2,81E-25	3,88E-21

A cepa MZCH08 compartilhou semelhanças com *M. thomasi* var. *evoluta* (0,9999%), a cepa 77 com 12 táxons infraespecíficos tanto de *M. thomasi* quanto de *M. denticulata*, tais como: *M. thomasi* (0,98895%), *M. thomasi* var. *andamanensis* (0,98445%), *M. thomasi* var. *madagascariensis* (0,90637%) e *M. denticulata* var. *basiprotuberans* (0,78532%). As variedades que apresentaram 100% de semelhança foram: *M. thomasi* var. *maxima*, *M. thomasi* var. *javanica*, *M. thomasi* var. *pulcherrima*, *M. thomasi* var. *notata*, *M. thomasi* var. *torneensis*, *M. denticulata* f. *mamillata*, *M. denticulata* var. *taylorii* e *M. denticulata* var. *intermedia*.

A cepa CCAC1026 compartilhou semelhanças apenas com a ilustração pertencente à cepa CCAC2253 (0,96371%), a cepa MZCH216 com alguns táxons infraespecíficos de *M. denticulata*, como *M. denticulata* var. *angulosa* (0,87673%), mas, também com *M. denticulata*, *M. denticulata* var. *angustosinuata*, *M. denticulata* var. *africana*, *M. denticulata* var. *japonica* e *M. denticulata* var. *granulosa*, todas estas apresentando 100% de posterior probabilidade.

A cepa MZCH675 compartilhou 100% de semelhanças com *M. thomasi* var. *ornata* e *M. thomasi* var. *ornata* f. *africana* e com *M. denticulata* f. *mucronata* (0,7536%).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

As cepas trabalhadas nesta pesquisa exibiram ampla variedade de resultados tanto em relação às medidas lineares quanto à análise da forma celular (morfometria geométrica) das espécies *M. denticulata* e *M. thomasi*.

Os resultados obtidos através das medidas lineares revelaram diferenças significativas entre as cepas estudadas e entre os indivíduos da mesma espécie. Isto ressaltou a importância de se obter medidas padronizadas e incluir novos atributos morfológicos para caracterizar morfológicamente as espécies semelhantes, também chamadas “espécies complexas”.

Considerando que os organismos representantes das duas espécies de *Micrasterias* em questão possuem morfologias muito semelhantes, a inclusão de seis novos atributos aliados aos três já comumente utilizados na literatura, complementou a caracterização e auxiliou significativamente na identificação das diferenças entre as cepas e, melhor ainda, entre os espécimes de cada espécie analisada.

Dos nove atributos correntemente analisados, pôde-se dizer que todos foram satisfatórios para a caracterização geral das cepas de *M. denticulata* e *M. thomasi* e a diferenciação das cepas de uma mesma espécie, embora alguns tenham mostrado valores sobrepostos para algumas cepas.

Os atributos comprimento celular total (CT), comprimento do lobo polar (CLP), largura celular total (LT) e largura do lobo apical (Lapic) foram essenciais para diferir todas as oito cepas estudadas. Dos quatro atributos supracitados, dois (comprimento celular total, CT e largura celular total, LT) são amplamente utilizados na literatura clássica da taxonomia de desmídias, assim como na obtenção de medidas lineares para o gênero *Micrasterias*.

Por outro lado, o atributo largura do istmo (IW) apresentou valores sobrepostos para a grande maioria das cepas analisadas, incluindo as da mesma espécie e as cepas das duas espécies. Por conseguinte, não foi considerado um bom atributo para sua caracterização.

Além disso, as medidas obtidas dos atributos morfológicos largura dos lobos laterais 1 e 2 (LLat 1 e LLat 2) mostrou o mesmo comportamento para todas as cepas examinadas, evidenciando possível simetria e padronização das medidas considerando os dois diferentes lados da semicélula.

Os resultados derivados da morfometria geométrica complementaram a visualização das diferenças e semelhanças existentes na forma celular de cada cepa estudada; e as diferenças de cada organismo foram observadas pela análise discriminante linear (LDA), que revelou clara separação entre as cepas das espécies *M. denticulata* e *M. thomasi*, resultando na formação de quatro grupos distintos. Essas diferenças puderam ser bem observadas na fig. 23, onde os ‘grids’ de deformação destacaram as mudanças na forma dos organismos de cada cepa.

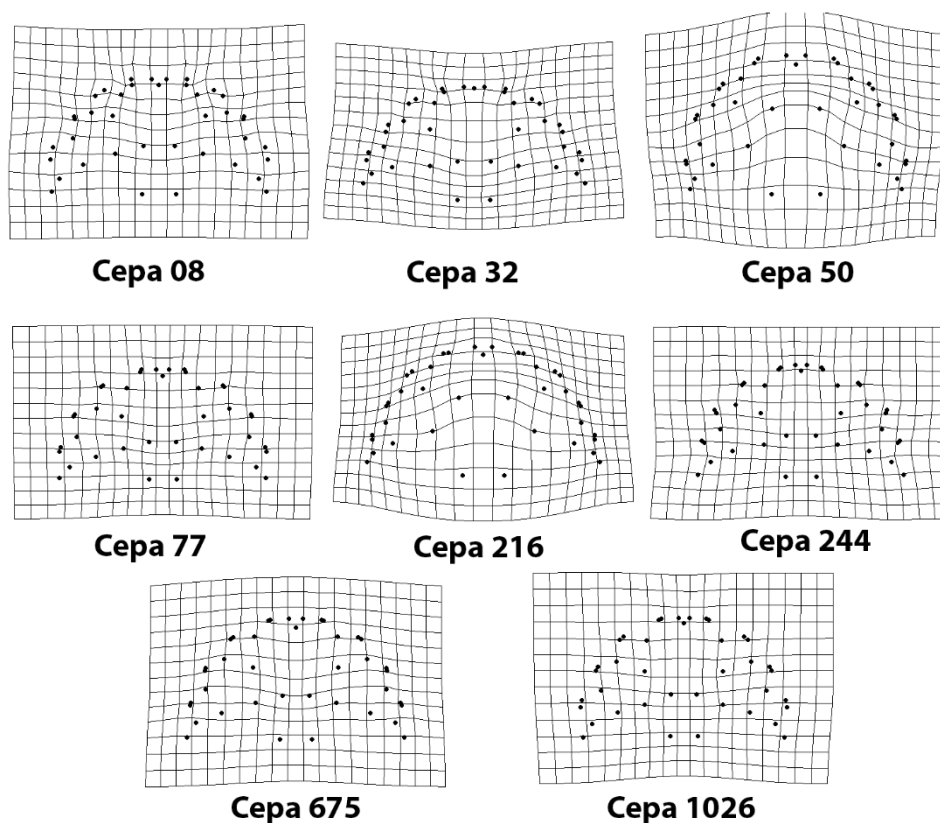


Figura 22. Grids’ de deformação ilustrando as mudanças na forma celular de cada cepa analisada.

As cepas de *M. denticulata* reuniram-se em dois dos quatro grupos identificados tanto pelas figuras da PCA quanto pela LDA, indicando variação significativa das cepas desta espécie. Quando os dados obtidos pela morfometria linear foram observados, essa diferença entre as duas cepas (MZCH50 e MZCH216) foi evidenciada através dos atributos morfológicos analisados.

A cepa MZCH50 exibiu semicélulas com maior comprimento e menor largura celular, resultando em um formato mais elíptico da célula. As incisões dos lobos laterais foram mais profundas, o lobo polar mais longo e as extremidades da região apical mais acentuadas. A cepa MZCH216 apresentou células com formato mais circular, menor tamanho celular e maior largura da célula. As incisões foram menos profundas, o lobo polar mais curto e a extremidade do lobo polar mais planas.

Com esses resultados foi possível observar que as cepas previamente identificadas como *M. denticulata* apresentaram as semicélulas com lobos laterais mais fechados e mais curtos quando comparadas com as cepas anteriormente identificadas como *M. thomasiiana*.

As cepas preidentificadas como de *M. thomasiiana* constituíram os dois grupos restantes (observados nos gráficos da PCA e da LDA). Os organismos da cepa 8 apresentaram os menores valores dos nove atributos morfológicos analisados através da morfometria linear. Foram células pequenas, com o lobo polar alongado e estreito, apresentaram a região apical mais estreita, incisões mais profundas semelhantes à letra “V”, além de apresentarem dois dentículos na margem apical e os lobos laterais proporcionalmente mais afastados um do outro.

Todas as características listadas acima para cepa 8 foram semelhantes às observadas nas outras cepas identificadas como de *M. thomasiiana* (MZCH77, MZCH244, MZCH675 e CCAC1026). Os indivíduos representantes destas cepas apresentaram forma celular muito parecida e as semelhanças puderam ser visualizadas através do gráfico gerado pela LDA. Algumas diferenças métricas já foram, entretanto, documentadas pela análise dos nove atributos morfológicos avaliados pela morfometria tradicional.

A cepa MZCH32 (*M. thomasiiana*) destacou-se das demais da mesma espécie por apresentar características únicas. Os organismos desta cepa apresentaram o comprimento do lobo polar semelhante ao das demais cepas de *M. thomasiiana*, porém, foram mais largos apresentando, com isso, muita semelhança com aqueles das cepas de *M. denticulata*. O lobo apical foi, contudo, significativamente mais largo, exibindo quatro dentículos tanto na incisão central do lobo polar quanto nas extremidades.

De forma geral, no que diz respeito à região do lobo polar, foi possível observar que os indivíduos das cepas de *M. denticulata* apresentaram esse lobo relativamente mais largo e mais curto e a região apical mais larga, sem apresentar o dentículo que antecede e sucede a retusidade da margem apical. As cepas previamente nomeadas como de *M. thomasiiana* apresentaram, por sua vez, o lobo polar mais estreito e mais longo e a região apical do lobo polar menos larga, com a incisão central mais retusa entre dois ou mais dentículos.

Observou-se ainda que as incisões celulares foram importantes fatores na diferenciação das duas espécies. As cepas de *M. denticulata* apresentaram lobos laterais mais próximos um do outro e as incisões mais rasas, enquanto os indivíduos das cepas identificadas como *M. thomasiiana* apresentaram lobos laterais com incisões mais profundas e, em algumas cepas, lobos laterais mais afastados entre si. Estas características foram bem evidentes no gráfico LDA e nos ‘grids’ de deformação (fig. 23).

Ao examinar as semelhanças entre as cepas estudadas e as figuras da literatura através da matriz de correta classificação/predição, viu-se que as cepas MZCH32, MZCH50 e MZCH244 não compartilharam semelhanças com qualquer das figuras na literatura.

Deve-se também acrescentar que as análises realizadas durante este estudo revelaram padrões distintos de semelhança entre as cepas e as figuras da literatura divulgadas no ato da descrição dos táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*. A título de exemplo, a cepa 8 nomeada como de *M. thomasiiana* compartilhou semelhanças significativas com representantes da variedade taxonômica *M. thomasiiana* var. *evoluta*. Acrescente-se que cepa MZCH77 apresentou semelhanças com diversos táxons tanto de *M. thomasiiana* quanto de *M. denticulata*.

Krieger (1939) já havia divulgado a relação entre alguns táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e de *M. thomasiiana* como, por exemplo, em *M. denticulata* var. *taylorii*, que tem como basônimo *M. thomasiiana* identificada por Taylor (1935). Segundo Krieger (1939), a var. *basiprotuberans* tem afinidade com a var. *taylorii* e devem ter alguma afinidade com *M. thomasiiana*. A semelhança da cepa MZCH77 com essas variedades sugeriu, conforme observado na análise de morfometria geométrica, que as características morfológicas compartilhadas por essas formas podem refletir uma relação taxonômica e até morfológica próximas.

Por fim, após a análise de oito cepas (duas de *M. denticulata* e seis de *M. thomasiiana*) através do uso de duas abordagens morfométricas distintas (morfometria linear e morfometria geométrica) concluiu-se que a proposição de novos atributos morfológicos (obtenção de medidas lineares) e a análise da forma celular constituíram ferramentas essenciais para a caracterização e diferenciação de espécies morfológicamente próximas, que constituem grande problema taxonômico e nomenclatural.

Os resultados obtidos neste estudo constituem importante avanço na caracterização e delimitação de espécies e categorias infraespecíficas, especialmente, os considerados complexos pertencentes ao gênero *Micrasterias* e apresentam marcada variabilidade morfológica e métrica documentada, assim como, muito provavelmente, em outros gêneros de desmídias.

Além disso, os resultados ora alcançados subsidiarão futuros estudos taxonômicos e nomenclaturais, ecológicos e de distribuição de espécies deste gênero de algas verdes, tendo em vista que não há estudo que aborde, como o presente, essas variações morfológicas em nível populacional e, principalmente, que vise avaliar o real valor das características morfológicas (diagnósticas) para diferir e propor variedades e formas taxonômicas em espécies de *M. denticulata* e *M. thomasiiana*.

6. REFERÊNCIAS CITADAS

- Adams, D.C. & Otarolla-Castillo, E.** 2013. Geomorph: na R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 393-399.
- Andersen, R.A.** 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. 589 p.
- Andersen, R.A., Morton, S.L. & Sexton, J.P.** 1997. Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997 list of strains. *Journal of Phycology* 33: 1-75.
- Archer, W.** 1862. Description of a new species of *Micrasterias* (Ag. et Aliorum, non Ehr.), with remarks on the distinctions between *Micrasterias rotata* (Ralfs) and *M. denticulata* (Bréb.). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, nov sér. 2: 236-247.
- Bernard, C.** 1909. Sur quelques algues unicellulaires d'eau douce récoltées dans le Domaine Malais par Ch. Bernard. Imprimerie du Département, Buitenzorg. 94 p.
- Bourrelly, P.** 1961. Algues d'eau douce de la République de Côte d'Ivoire. *Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire*, sér. A, Sci. Nat. 2: 283-374.
- Bourrelly, P. & Couté, A.** 1991. Desmidiées de Madagascar (Chlorophyta, Zygnophyceae). *Bibliotheca Phycologica* 86: 1-349.
- Brook, A.J.** 1981. *The biology of desmids*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 276 p.
- Daly, H.V.** 1985. Insect morphometrics. *Annual Review of Entomology* 30: 415-438.
- Fornel, R.** 2005. Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 78 p.
- Flora do Brasil.** 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Retrieved from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>
- Gay, F.** 1884. *Essai d'une monographie locale des Conjugées*. Boehm et Fils, Montpellier. 112 p.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M.** 2010. Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* gen. nov. *Journal of Phycology* 46: 346-362.
- Grönblad, R.** 1920. Finnländische Desmidiaceen aus Keuru. *Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 47: 1-98.
- Guiry & Guiry** 2024. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway, Ireland. <http://algaebase.org>
- Gutwinski, R.** 1902. De algis a Dre Raciborski anno 1899 in insula Java collectis. *Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie, Classe Sci. Math. Nat.* 1902: 575-617.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 1-9.
- Irénée-Marie, Fr.** 1951. Desmidiées de la région de Quebec. *Naturaliste Canadien* 78: 177-221.

- Krieger, W.** 1932. Die Desmidiaceen der Deutschen limnologischen Sunda-Expedition. Archiv für Hydrobiologie, suppl. 11: 129-230.
- Krieger, W.** 1939. Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten in Dr. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol. 13, fasc. 1(2). Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig. 117 p.
- Krieger, W. & Bourrelly, P.** 1956. Desmidiacées des Andes du Venezuela. In: Gessner, F. & Vareschi, V. (Eds), Ergebnisse der deutschen limnologischen Venezuela-Expedition 1952. Vol. 1. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin. p. 141-195.
- McLachlan, G.J.** 1992. Discriminant analysis and statistical pattern recognition. John Wiley & Sons, New Jersey. 552 p.
- Monteiro, L.R. & Reis, S.F.** 1999. Princípios de morfometria geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto. 189 p.
- Neustupa, J.** 2017. Asymmetry and integration of cellular morphology in *Micrasterias compereana*. BMC Evolutionary Biology 17: 1.
- Neustupa, J., Škaloud, P. & Štastný, J.** 2010. The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. Journal of Phycology 46: 703-714.
- Neustupa, J., Štastný, J. & Woodard, K.** 2023. Ecological monitoring of disturbed mountain peatlands: an analysis based on desmids. Biodiversity and Conservation 32: 2671-2691.
- Nordstedt, C.F.O.** 1880. De Algis et Characeis, 1: de algis nonnullis, praecipue Desmidiéis, inter *Utricularias* Musei Lugduno-Batavi. Acta Universitatis Lundensis 16: 1-13.
- Nordstedt, C.F.O.** 1888. Desmidieer fran Bornholm, samlade och delvis bestämda af R.T. Hoff, granskade af O. Nordstedt. Videnskabelige Meddelelser Naturhistorische Forening I Kjöbenhavn 1888: 182-213.
- Okada, Y.** 1952. Taxonomical studies on the genus *Micrasterias* with special reference to the species of Japan and its surrounding areas. Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University 2: 93-140.
- Prasad, B.N. & Misra, P.K.** 1992. Freshwater algal flora of Andaman and Nicobar Islands. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun. Vol. 2. 254 p.
- Prescott, G.W., Croasdale, H.T. & Vinyard, W.C.** 1977. A synopsis of North American desmids University of Nebraska Press, Lincoln. Vol. 2(2). 413 p.
- R Core Team** 2019. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- R Studio Team.** 2020. Rstudio: integrated development for R. Studio, BPC. Boston.
- Ralfs, J.** 1848. The British Desmidiaceae. Reeve, Benham & Reeve, London. 226 p.

- Reynolds, C.S.** 1984. The Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge. 384 p.
- Reynolds, C.S.** 2006. The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge. 551 p.
- Rohlf, F.J.** 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39(1): 40-59.
- Rohlf, F.J.** 2005. *tspDig*, digitize landmarks and outlines, versão 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, F.J.** 2015. *tpsUtil*, file utility program, versão 1.61. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F.** 1993. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 129-132.
- Růžička, J.** 1981. Die Desmidiaceen Mitteleuropas. Vol. 1(2). Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. 444 p.
- Savriama, Y., Neustupa, J. & Klingenberg, C.P.** 2010. Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotate* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *Nova Hedwigia*, supl. 136: 43-54.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Cerná, K. & Neustupa, J.** 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 933-943.
- Škaloud, P., Steinová, J., Řídká, T., Vančurová, L. & Peksa, O.** 2015. Assembling the challenging puzzle of algal biodiversity: species delimitation within the genus *Asterochloris* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 51(3): 507-527.
- Sormus, L.** 1980. Revisão dos grupos de espécies *arcuata* e *laticeps* do gênero *Micrasterias* (Zygnemaphyceae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 204 p.
- Št'astný, J., Škaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, R. & Neustupa, J.** 2013. Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology* 49: 401-416.
- Taylor, W.R.** 1935. Alpine algae from the Santa Marta mountains, Colombia. *American Journal of Botany* 22(9): 763-781.
- West, G.S.** 1909. The algae of the Yan Yean Reservoir, Victoria: a biological and ecological study. *Journal of the Linnean Society, Botany* 39: 1-88.

- West, W. & West, G.S.** 1902. A contribution to the freshwater algae of the North of Ireland. Transactions of the Royal Irish Academy, sect. B 32: 1-100.
- Wickman, H.** 2016. Ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer Verlag, New York. 260 p.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. & Fink, W.L.** 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, New York and London. 437 p.

DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGENIA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *MICRASTERIAS DENTICULATA* E *MICRASTERIAS THOMASIANA* (DESMIDIACEAE, ZYGNEMATOPHYCEAE)

1. INTRODUÇÃO

As Zygnematophyceae estão incluídas na Divisão Streptophyta e são as algas verdes conjugantes, isto é, que possuem uma forma única de reprodução sexuada onde a formação do zigoto ocorre através da conjugação de gametas não-flagelados (Book 1981).

A classe Zygnematophyceae têm despertado grande interesse por parte dos especialistas evolucionistas, por apresentar resultados que demonstram que esses organismos são os parentes mais próximos das plantas terrestres (Zhou & von Schwanzenberg 2020). Acredita-se que os ancestrais dessa classe foram os primeiros organismos a colonizar o ambiente terrestre, dando origem às plantas terrestres há aproximadamente 500 a 470 milhões de anos.

O aumento do teor de oxigênio atmosférico foi um dos efeitos significativos para esse evento na história natural da Terra (Wodniok *et al.* 2011, Zhong *et al.* 2013, Wickett *et al.* 2014, Leebens-Mack *et al.* 2019). Os estudos sobre as Zygnematophyceae concentram-se hoje, principalmente, na genômica comparativa e na inferência de características de plantas ancestrais.

Com mais de 4.300 espécies morfológicas descritas (Guiry & Guiry 2024), as Zygnematophyceae incluem formas unicelulares e pseudofilamentosas que habitam uma variedade de ambientes de água doce em todo o mundo, inclusive habitats extremos. Tradicionalmente, a taxonomia dessas algas está baseada em características morfológicas que as dividem em duas ordens (Desmidiales e Zygnematales) e seis famílias (Closteriaceae, Mesotaeniaceae, Desmidiaceae, Peniaceae, Gonatozygaceae e Zygnemataceae).

A partir de estudos filogenéticos e filogenômicos recentes, entretanto, a taxonomia das Zygnematophyceae tem passado por importantes mudanças em sua classificação e reorganização taxonômica. Recentemente, inclusive, uma nova ordem, *Spirogleales* Melkonian, Gontcharov &

Marin, foi proposta com base na espécie *Spiroglea muscicola* (De Bary) Melkonian (Cheng *et al.* 2019).

A família Desmidiaceae é rica em espécies (Guiry & Guiry 2024). Compreende, atualmente, 50 gêneros e mais de 2.800 espécies validamente descritas, a maioria das quais estabelecida durante os séculos XIX e XX com base, exclusivamente, em critérios taxonômicos tradicionais, isto é, alicerçados só na morfologia celular (Gontcharov 2008, Guiry & Guiry 2024).

O gênero *Micrasterias* foi proposto por Agardh (1827), validado em Ralfs (1848) e está classificado na família Desmidiaceae. É um gênero que se destaca pela morfologia exuberante de suas células, plena de recortes (Brook 1981). Seus representantes apresentam forma achatada semelhante a disco e são compostos por duas semicélulas, cada uma com um lobo polar e dois ou quatro lobos laterais. As semicélulas estão interligadas na região central da célula pelo istmo (Brook 1981).

Uma característica marcante do gênero *Micrasterias* é a bifurcação sucessiva dos lobos laterais, os quais são classificados como lóbulos de primeira à quarta ordem, o que é considerado um importante caráter taxonômico (Krieger 1939, Prescott *et al.* 1977, Škaloud *et al.* 2011). Encontram-se registradas, atualmente, 100 espécies e mais de 300 variedades e formas taxonômicas de *Micrasterias* (Guiry & Guiry 2024).

A taxonomia das desmídias está baseada ainda hoje, principalmente, nas características morfológicas da célula, o que resulta em ampla variação morfológica, taxonômica e nomenclatural, a qual vem sendo, recentemente, significativamente aprimorada com a aplicação de métodos moleculares (McCourt *et al.* 2000, Gontcharov *et al.* 2004, Hall *et al.* 2008).

A partir dos estudos recentes, descobriu-se que vários dos gêneros tradicionalmente considerados ricos em espécies como, por exemplo, *Cosmarium* Corda *ex* Ralfs, *Staurostrum* Meyen *ex* Ralfs e *Euastrum* Ehrenberg *ex* Ralfs, são polifiléticos (Gontcharov & Melkonian 2005, Gontcharov 2008), enquanto outros, como *Micrasterias*, é monofilético (Škaloud *et al.* 2011). Tais resultados estão fundados em estudos moleculares multigênicos que têm proporcionado um esboço mais robusto das relações filogenéticas na ordem Desmidiales (McCourt *et al.* 2000, Gontcharov *et al.* 2004, Hall *et al.* 2008).

O único estudo mais abrangente efetuado sobre a filogenia do gênero *Micrasterias* é devido a Škaloud *et al.* (2011) e teve como objetivo investigar a evolução de espécies morfológicamente distintas, mas geneticamente próximas, utilizando três marcadores moleculares: SSU rDNA, *psaA* e *coxIII* em 41 cepas, das quais 34 foram de representantes de *Micrasterias*. Como resultado, o estudo apresentou oito linhagens bem resolvidas, que foram subdivididas e designadas clados A a H.

Apesar da morfologia distintiva existente no gênero *Micrasterias* com a existência de espécies trilobadas e pentalobadas, os estudos filogenéticos e moleculares revelaram que três espécies morfológicamente diferentes, antes atribuídas aos gêneros *Triploceras*, *Cosmarium* e *Staurodesmus*,

foram reunidas na linhagem de *Micrasterias* (Gontcharov & Melkonian 2010, Škaloud *et al.* 2011). Isto sugeriu uma possível evolução morfológica convergente para formas celulares mais simples em diferentes linhagens de algas verdes, em detrimento da ideia anterior de que a morfologia complexa de *Micrasterias* evoluiu apenas uma vez e permaneceu estável ao longo do tempo. Essas descobertas destacaram a importância de combinar dados morfológicos e genéticos para se obter uma compreensão mais abrangente da evolução das algas verdes e de outros organismos (Škaloud *et al.* 2011).

Outros trabalhos envolvendo espécies morfológicamente similares de *Micrasterias* foram realizados utilizando os métodos da biologia molecular aliados a análises morfológicas. São eles o trabalho de Neustupa *et al.* (2010) que avaliou a posição filogenética das espécies *M. crux-melitensis* e *M. radians*, o de Neustupa *et al.* (2011) que estudou as espécies *M. rotata* e *M. fimbriata* e o de Neustupa *et al.* (2014) que propôs uma nova espécie, *M. compereana*, a partir da análise morfológica e molecular de *M. fimbriata*.

Além dos estudos que abordaram a sistemática e filogenia junto com análises morfológicas de espécies complexas ou que apresentam uma grande quantidade de táxons infraespecíficos, Nemjová *et al.* (2011) estudaram a espécie *M. truncata* e seus táxons infraespecíficos; e Araújo *et al.* (2022) estudaram a espécie *M. arcuata*.

Apesar dos numerosos estudos sobre taxonomia clássica (nível α) e do crescente aumento no número das pesquisas sobre taxonomia polifásica (nível ω), ainda é possível verificar importantes lacunas quanto à resolução de problemas relacionados com a sistemática, taxonomia e nomenclatura de muitas espécies de microalgas, mesmo daquelas de *Micrasterias*, que é um dos gêneros de algas mais bem estudado e conhecido tanto no que tange à taxonomia clássica quanto a outras áreas do conhecimento (Meindl 1993).

A análise de sequências de DNA é uma ferramenta crucial em estudos de história evolutiva. Além disso, o sequenciamento de DNA tem sido fundamental na identificação de espécimes e na resolução de limites entre espécies em populações de organismos que, à primeira vista, pareceram semelhantes (Stoeckle *et al.* 2005).

Dos pontos de vista filogenético e evolutivo, *M. denticulata* e *M. thomasiana* são consideradas espécies filogeneticamente próximas e estão agrupadas no clado D (junto com *M. jenneri* Ralfs), que reúne espécies cujos representantes possuem célula de formato oval a oblongo e incisões mais fechadas do que nas demais espécies do gênero (Škaloud *et al.* 2011).

Entretanto, dispõem-se hoje de pouco conhecimento sobre o real posicionamento filogenético de isolados das duas espécies, tendo em vista que a filogenia de ambas foi obtida da sequência de uma cepa apenas de cada uma destas espécies (Škaloud *et al.* 2011).

No que diz respeito a morfologia, os espécimes representantes de ambas as espécies compartilham muitas semelhanças, de modo que podem ser, conseqüentemente, consideradas espécies complexas e problemáticas dos pontos de vista taxonômico e nomenclatural. Isto decorre, especialmente, das inúmeras variedades taxonômicas documentadas para as duas espécies que podem, muitas vezes, ser mal identificadas, adicionada à carência de parâmetros ou de características que, de fato, as diferencie.

É evidente, portanto, que o complexo de espécies *M. denticulata*/*M. thomasi* requer uma revisão em sua filogenia visando a explorar e aprofundar o conhecimento sobre o grau de diversidade genética e proximidade existente entre ambas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Ampliar o conhecimento filogenético existente para algumas espécies de *Micrasterias*.

2.2. Específico

- Caracterizar filogeneticamente as cepas cultivadas previamente identificadas como pertencente à *Micrasterias denticulata* e *Micrasterias thomasi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Origem e cultivo das cepas

As cepas utilizadas neste estudo vieram da Universidade de Hamburgo, Alemanha (“Microalgae and Zygnematomyceae Collection in Hamburg, MZCH”) com os números de tombo: MZCH08, MZCH32, MZCH50, MZCH77, MZCH216, MZCH244 e MZCH675. A cepa CCAC1026 foi obtida da Coleção de Culturas de Microalgas da Universidade de Essen, também na Alemanha (“Central Collection of Algal Cultures, CCAC”).

As cepas foram mantidas em frascos (Boecos) de cultivo de 100 ml e em tubos de ensaio, ambos contendo os meios WC (Andersen *et al.* 2005) e DY-IV (Andersen *et al.* 1997). As cepas foram mantidas sob luminosidade e fotoperíodo controlados (intensidade luminosa $\sim 40 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 12/12 h claro/escuro), na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA/UFSCar) em São Carlos e no banco de cultivos do Laboratório de Cianobactérias e Macroalgas Marinhas, do Instituto de Pesquisas Ambientais, IPA em São Paulo.

3.2. Extração do DNA, amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

Para extração do DNA algáceo foi separada uma alíquota de cada cepa em condições de cultivo. As cepas foram transferidas para microtubos ('eppendorfs') previamente autoclavados e capacidade de 2 ml. O material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 1 min. e o sobrenadante posteriormente removido. Depois da etapa de centrifugação, foram adicionados 80-100 µl do reagente Instagene Matrix (BioRad) e pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro para promover a ruptura das células por agitação.

Após essa etapa, as amostras foram transferidas para banho-maria pré-aquecido a 65°C durante 30 min. Após aquecidas, as amostras foram levemente vortetizadas antes de serem novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 1 min. Em seguida, os 'eppendorfs' foram colocados em banho-maria a 99°C por 5 min. Após a etapa de aquecimento, as amostras foram imediatamente incubadas em gelo a fim de induzir um choque térmico. O material genético extraído foi, por fim, armazenado por longo prazo a -20°C, de modo a garantir sua preservação para análises posteriores.

O material genético foi amplificado por reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction, PCR") da sequência-alvo utilizando pares de 'primers' específicos. Quatro marcadores moleculares foram utilizados: o nuclear SSU rDNA (Neustupa & Škaloud 2007, Škaloud *et al.* 2011), os plastidiais *rbcL* (Škaloud *et al.* 2012) e *psaA* (McCourt *et al.* 2000, Hall *et al.* 2008) e o mitocondrial *coxIII* (Škaloud *et al.* 2011). Os ciclos de amplificação utilizados na reação (PCR) para cada gene estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1. 'Primers' e ciclos utilizados para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Gene	Primers	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão	Ciclos de amplificação	Extensão final	Resfriamento
SSU rDNA	18S-F 18 L	95°C - 5 min.	94°C - 40 seg.	51°C - 40 seg.	72°C - 2 min.	35 vezes	72°C - 10 min.	4°C - indefinidamente
<i>rbcL</i>	Pleurot F Pleurot R	94°C - 4 min.	94 °C - 1 min.	54°C - 1 min.	72°C - 2 min.	35 vezes	72°C - 10 min.	4°C - indefinidamente
<i>psaA</i>	psaA 1F psaA 2100R	94°C - 5 min.	94 °C - 1 min.	52,5°C - 1 min.	72°C - 1 min.	35 vezes	72°C - 10 min.	4°C - indefinidamente
<i>coxIII</i>	COX_ZYG_F3 COX_ZYG_R2	95°C - 2 min.	94 °C - 1 min.	51°C - 1 min.	72°C - 1,30 min.	37 vezes	72°C - 10 min.	4°C - indefinidamente

Os marcadores moleculares foram amplificados utilizando mistura de reação no volume final de 30 µl. As condições de amplificação foram: água MiliQ (21,15 µl), Buffer (3,0 µl), MgCl₂ (1,80 µl), dNTP (0,60 µl), 'forward do primer' escolhido (0,75 µl), 'reverse do primer' escolhido (0,75 µl), DMSO (0,75 µl), AmpliTaq polymerase (0,20 µl) e DNA da amostra (1 µl) totalizando 30 µl.

Alíquotas de 2 µl dos produtos de PCR foram, em seguida, analisadas em eletroforese em gel de agarose a 1%, com marcador molecular de tamanho conhecido (100 pb DNA Ladder) e corado com

GelRed (Biotium) aplicado diretamente no gel para averiguar a qualidade e a quantidade de fragmentos amplificados. O material amplificado foi enviado para a empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul) para as etapas de purificação e sequenciamento.

3.3. Análise das sequências e alinhamento

As sequências obtidas nas direções direta e reversa foram verificadas através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.* 1997) disponível no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para constatar a identidade dos táxons em questão. Em seguida, as sequências direta e reversa foram alinhadas e editadas manualmente usando o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall 1999) para obter as sequências-consenso de cada amostra. Todas as sequências foram verificadas manualmente através da análise de seus respectivos cromatogramas.

Foram obtidas no presente estudo oito sequências de 18S rDNA, sete do gene *rbcL*, sete do gene *psaA* e sete do gene *coxIII*. Além disso, foram utilizadas 34 sequências disponíveis no banco de dados de sequências de DNA GenBank, das quais 32 são de linhagens de *Micrasterias* e as outras duas dos gêneros *Penium* e *Haplotaenium*, as quais foram consideradas um grupo externo. A matriz de dados contendo as informações das 42 sequências de DNA utilizadas no presente estudo e seus respectivos números de acesso estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Informações das 42 sequências de DNA utilizadas neste estudo e seus respectivos números de acesso GenBank.

Táxon	Número da cepa	SSU	<i>rbcL</i>	<i>psaA</i>	<i>coxIII</i>
<i>Micrasterias americana</i> Ehrenberg ex Ralfs	SVCK290	FR852595	KX676195	FR852626	FR852666
<i>Micrasterias apiculata</i> Meneghini ex Ralfs	SVCK247	FR852596	KX676200	FR852628	FR852668
<i>Micrasterias brachyptera</i> Lundell	SVCK65	FR852597	KX676201	FR852629	FR852669
<i>Micrasterias ceratofera</i> Joshua	SAG21.97	FR852598	---	FR852630	FR852670
<i>Micrasterias conferta</i> Lundell	SVCK110	FR852600	KX676204	FR852632	FR852672
<i>Micrasterias crux-melitensis</i> Ralfs	CAUPK602	AM419206	---	FR852633	FR852673
<i>Micrasterias decemdentata</i> (Nägeli) W.Archer	ASW 07023	FR852602	---	FR852635	FR852675
<i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs	SVCK230	FR852603	KX676214	FR852636	FR852676
<i>Micrasterias fimbriata</i> Ralfs	CAUPK608	FR852604	---	FR852637	FR852677
<i>Micrasterias foliacea</i> Bailey ex Ralfs	NIES 297	-	EF371311	EF371209	EF371102
<i>Micrasterias furcata</i> C.Agardh ex Ralfs	CAUPK609	FR852605	---	FR852639	FR852679
<i>Micrasterias hardyi</i> G.S.West	SVCK249	FR852606	KX676226	FR852640	FR852680
<i>Micrasterias jenneri</i> Ralfs	SVCK298	FR852607	KX676228	FR852641	FR852681
<i>Micrasterias laticeps</i> Nordstedt	SVCK430	FR852608	KX676229	FR852642	FR852682
<i>Micrasterias mahabuleshwariensis</i> J.Hobson	SVCK324	FR852609	---	FR852643	FR852683
<i>Micrasterias muricata</i> Ralfs	SAG157.80	FR852610	---	FR852644	FR852684
<i>Micrasterias novae-terrae</i> (J.A.Cushman) Willi Krieger	SAG 158.80	FR852611	---	FR852645	FR852685
<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CAUPK603	AM419208	---	FR852646	FR852686
<i>Micrasterias pinnatifida</i> Ralfs	SVCK411	FR852612	---	FR852647	FR852687
<i>Micrasterias radians</i> W.B.Turner	SVCK389	FR852613	KX676248	FR852648	FR852688
<i>Micrasterias radiosa</i> Ralfs	SVCK303	FR852615	---	FR852650	FR852690
<i>Micrasterias ralfsii</i> (Brébisson ex Ralfs) Škaloud, Nemjov, Vesel, Černá & Neustupa	SVCK300	FR852622	AM911324	FR852660	FR852700
<i>Micrasterias rotata</i> Ralfs	CAUPK604	AM419209	---	FR852651	FR852691
<i>Micrasterias swainei</i> W.N.Hastings	SVCK138	FR852616	KX676259	FR852652	FR852692
<i>Micrasterias tetraptera</i> West & G.S.West	SVCK195	FR852617	KX676260	FR852653	FR852693
<i>Micrasterias thomasi</i> Archer	CAUPK605	AM419210	---	FR852654	FR852694
<i>Micrasterias cf. thomasi</i> var. <i>notata</i> (Nordstedt) Grönblad	M2253	AM920341	FN432110	---	---
<i>Micrasterias torreyi</i> Bailey	SVCK369	FR852618	---	FR852655	FR852695
<i>Micrasterias tropica</i> Nordstedt	SVCK368	FR852619	KX676274	FR852656	FR852696
<i>Micrasterias truncata</i> Brébisson ex Ralfs	CAUPK606	AM419211	---	FR852659	FR852699
<i>Micrasterias zeylanica</i> F.E.Fritsch	SVCK291	FR852599	KX676203	FR852631	FR852671
<i>Triploceras gracile</i> Bailey	SVCK366	FR852624	---	FR852662	FR852702

<i>Haplotaenium minutum</i> (Ralfs) Bando	SVCK302	AJ428090	EF371326	EF371227	EF371120
<i>Penium cylindrus</i> Brébisson ex Ralfs	ACOI780	AJ553930	AJ553959	EF371220	EF371113
MZCH8	MZCH08	OK	OK	OK	OK
MZCH32	MZCH32	OK	OK	OK	OK
MZCH50	MZCH50	OK	OK	OK	OK
MZCH77	MZCH77	OK	OK	OK	---
MZCH216	MZCH216	OK	OK	OK	OK
MZCH244	MZCH244	OK	OK	---	OK
MZCH675	MZCH675	OK	OK	OK	OK
CCAC1026	CCAC1026	OK	---	OK	OK

Múltiplos alinhamentos foram construídos, alinhados e automaticamente editados usando a interface web do software MAFFT (Katoh *et al.* 2019) aplicando a estratégia de algoritmo Q-INS-i.

3.4. Análises moleculares e filogenia

O melhor modelo de substituição nucleotídica para os genes SSU rDNA e as três partições dos genes *rbcL*, *psaA* e *coxIII* foi determinado utilizando o programa JModeltest (Darriba *et al.* 2012) implementado na plataforma CIPRES (Miller *et al.* 2010). O modelo evolutivo mais adequado para as sequências dos quatro marcadores moleculares empregados neste estudo foi estimado de acordo com o Critério de Informação Bayesiana (BIC).

Para os genes SSU rDNA, a segunda partição do gene *psaA* e a primeira e a terceira partições do gene *coxIII*, o melhor modelo escolhido foi o “General Time Reversible”, com distribuição gama (GTR + G, Posada 2008). Para as três partições do gene *rbcL* e para a segunda do gene *coxIII*, entretanto, o melhor modelo escolhido foi o Kimura dois-parâmetros (K80, Kimura 1980). E para a primeira e terceira partições do gene *psaA*, o melhor modelo evolutivo escolhido foi de Hasegawa, Kishino e Yano (HKY, Hasegawa *et al.* 1985).

A Inferência Bayesiana (BI) foi realizada pelo programa MrBayes 3.2.4 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) implementado na plataforma CIPRES (Miller *et al.* 2010) através do método de Monte Carlo e corridas de Markov (MCMC), com duas corridas independentes e quatro cadeias de Markov, 8 milhões de gerações, com amostragem de 1 árvore a cada 100, sendo que 25% dos registros obtidos foram descartados como ‘burn-in’. O período estacionário ou de convergência de MCMC foi avaliado a partir dos seguintes parâmetros: (1) “Potential Scale Reduction Factor, PSRF”, cujo valor deve estar próximo de 1,0; (2) “Estimated Sample Size, ESS”, onde os valores devem ser maiores que 100; e (3) “Average standard deviation of split frequencies”, que deve apresentar valor menor que 0,01.

As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas no programa FigTree v. 1.4.3 (Rambaut 2016) e, posteriormente, editadas na interface gráfica iTool (Letunic & Bork 2021).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises filogenéticas de Inferência Bayesiana e Máxima Verossemelhança foram baseadas na matriz concatenada dos genes SSU rDNA, *rcbL*, *psaA* e *coxIII* contendo 4245 pares de base e o total de 42 sequências, são apresentadas na figura 1.

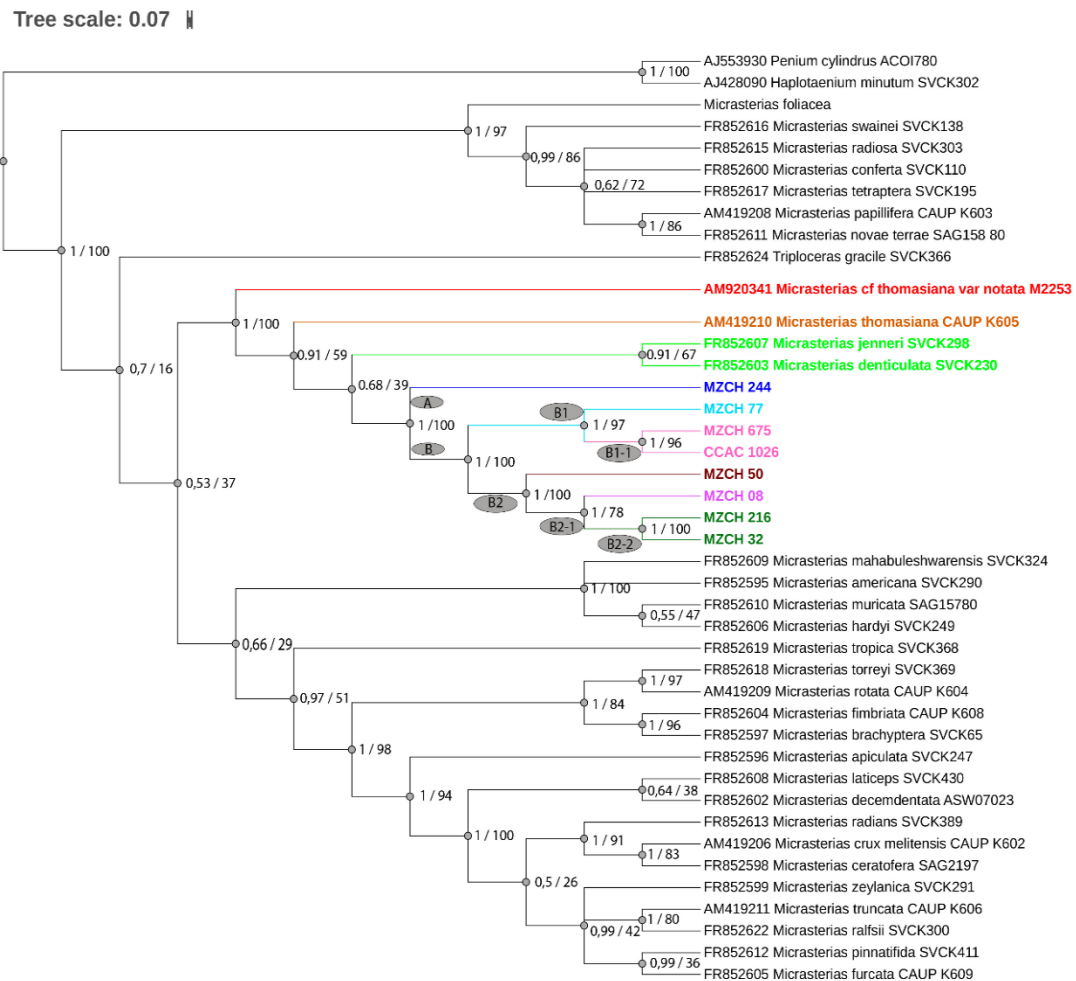


Figura 1. Árvore filogenética obtida com base nas sequências concatenadas dos marcadores moleculares SSU rDNA, *rcbL*, *psaA* e *coxIII*, 34 sequências de *Micrasterias* sensu Škaloud et al. (2011) e Gontcharov & Melkonian (2010). A árvore filogenética foi enraizada utilizando as sequências de *Haplotaenium* e *Penium* como grupo externo. Os valores indicam o suporte estatístico estimado pelos métodos Inferência Bayesiana (lado esquerdo) e Máxima Vesselhança (lado direito). A barra de escala representa o número estimado de substituições.

As análises realizadas neste estudo mostraram a formação de dois grandes clados: o primeiro formado pela cepa M2253 identificada como *Micrasterias* cf. *thomasiana* var. *notata* (Gontcharov & Melkonian 2010) e o segundo pela cepa CAUPK605 (*Micrasterias thomasiana*) que está dividida em outros dois sub-clados. O primeiro sub-clado foi composto pelas cepas SVCK230 (*Micrasterias*

denticulata) e SVCK298 (*Micrasterias jenneri*) e o segundo sub-clado pelas oito cepas analisadas neste estudo.

A filogenia obtida neste estudo mostra que as oito cepas analisadas formaram dois clados (1,0/100% de posterior probabilidade e ‘bootstrap’, respectivamente), que foram designados A e B (fig. 1). O primeiro clado é formado pela cepa MZCH244 (A) previamente identificada como *M. thomasi* e o segundo clado (B) pelas outras sete cepas, que foram subdivididas em outros dois grandes clados (1,0/100% de posterior probabilidade e ‘bootstrap’).

O primeiro clado está subdividido em dois subclados (1,0/100% de posterior probabilidade e ‘bootstrap’), dos quais o primeiro foi formado pela cepa MZCH77 (B1) e o segundo pelas cepas CCAC1026 e MZCH675 (B1-1), sendo que as cepas MZCH77 e MZCH675 foram previamente identificadas como *M. thomasi* W.Archer e a cepa CCAC1026 como *M. thomasi* W.Archer var. *notata* Nordstedt (Grönblad).

O segundo subclado está subdividido (1,0/100% de posterior probabilidade e ‘bootstrap’) em: um primeiro clado composto pela cepa MZCH50 (B2) (*M. denticulata*) e um segundo dividido em dois subclados (B2-1 e B2-2), um deles composto pela cepa MZCH08 (*M. thomasi*) e outro pelas cepas MZCH216 (*M. denticulata*) e MZCH32 (*M. thomasi*), todos com elevado valor de posterior probabilidade e ‘bootstrap’ (1,0/100%).

O gênero *Micrasterias* tem sido amplamente estudado a partir de análises moleculares e filogenéticas e, até mesmo, morfológicas com o intuito de compreender e melhor organizar a classificação desses organismos (Škaloud *et al.* 2011).

Recentemente, alguns desses estudos foram realizados com base em espécies consideradas “complexas”, ou seja, morfológicamente muito semelhantes pertencentes ao gênero *Micrasterias* (Neustupa *et al.* 2010, 2011, 2014, Nemjová *et al.* 2011). Os resultados desses estudos demonstraram que muitos organismos que apresentavam morfologia semelhante e/ou haviam sido identificados como variedades pertencentes de mesma espécie via taxonomia tradicional, foram distribuídos segundo dados moleculares e filogenéticos em clados muitos distintos ou clados irmãos resultando em novas espécies ou diferentes entidades taxonômicas.

Os dados filogenéticos atualmente apresentados ampliaram o conhecimento sobre o clado D proposto no trabalho de Škaloud *et al.* (2011), pois ao inserir a sequência pertencente à cepa M2253 (*M. thomasi* var. *notata*) e as analisadas neste estudo, os resultados obtidos mostram uma nova configuração e divisão do clado D.

Conforme observado na filogenia apresentada na fig. 1, a cepa M2253 apresentou-se como um clado irmão daquele em que estão inseridas tanto as cepas estudadas por Škaloud *et al.* (2011) quanto as analisadas neste estudo.

Ainda segundo filogenia ora obtida, a cepa CAUPK605 (*M. thomasi*) é considerada um clado irmão do outro composto pelas cepas SVCK230 (*M. denticulata*) e SVCK298 (*M. jenneri*) e o outro, pelas cepas presentemente estudadas. Desta forma, ampliou-se modificando a filogenia apresentada em Škaloud *et al.* (2011).

As oito cepas analisadas neste estudo constituem unidades taxonômicas distintas dos pontos e de vista filogenético e molecular e originaram dois grandes clados presentemente denominados A e B (fig. 2), ambos com elevado valor de posterior probabilidade e ‘bootstrap’.

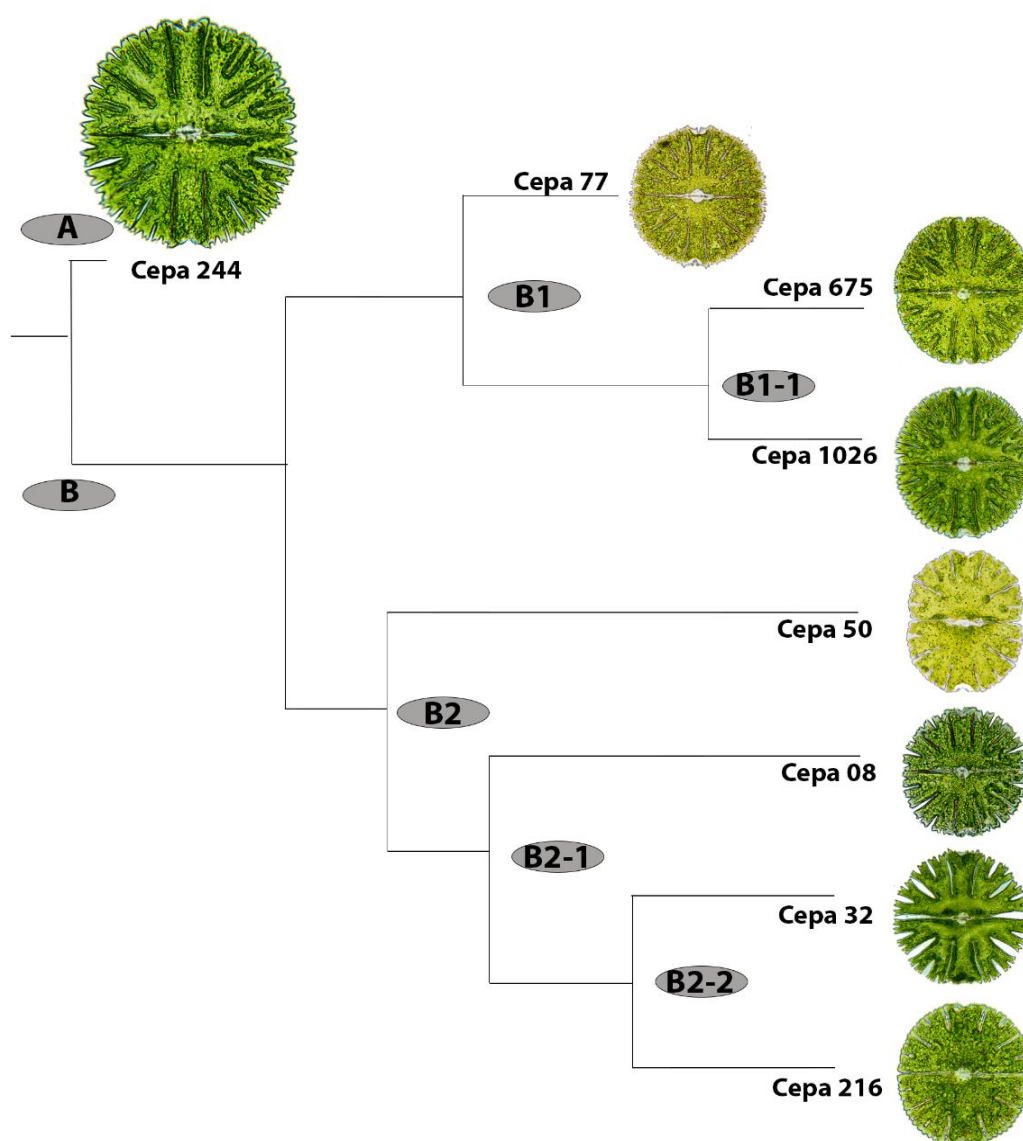


Figura 2. Ilustração das características morfológicas das cepas com base na filogenia obtidas neste estudo.

O clado A consistiu exclusivamente da cepa MZCH244, cujos organismos foram coletados em uma região da Áustria e identificados como *M. thomasi*. Esses organismos apresentam morfologia

que se assemelha às descrições em Archer (1862), quando propôs a espécie *M. thomasi* W.Archer. As principais características observadas foram: célula subcircular com projeções e lobo polar que se elevam, na maioria das vezes, além dos lobos laterais. Nessa linhagem, os organismos exibem células grandes, pentalobadas, com incisões profundas nos lobos laterais e o lobo polar mais elevado que os demais. Além disso, apresentam projeções na célula e dois denticulos na incisão da região apical do lobo polar.

O clado B foi dividido em dois subclados, B1 e B2. O subclado B1 foi composto pela cepa MZCH77 e um subclado irmão que deu origem ao subclado B1-1, composto pelos subclados irmãos das cepas CCAC1026 e MZCH675. No subclado B1, observou-se que os organismos que compõem a cepa MZCH77 apresentaram morfologia mais simples em comparação com a cepa MZCH244 (fig. 2). Observou-se que esses organismos não apresentaram projeções ao longo de sua célula, além de apresentarem a forma celular mais arredondada, com a largura e o comprimento igualmente proporcionais. Devido a essas características morfológicas, essa cepa enquadrou-se na circunscrição de *M. thomasi* var. *notata* (Nordstedt) Grönblad proposta por Grönblad (1920).

As cepas localizadas no subclado B1-1 (MZCH675 e CCAC1026, fig. 2) foram coletadas em regiões da Alemanha e exibem características morfológicas muito semelhantes. A primeira enquadra-se na circunscrição e, portanto, foi identificada morfológicamente como *M. thomasi* W.Archer, enquanto a segunda como *M. thomasi* var. *notata* (Nordstedt) Grönblad.

Os resultados da análise filogenética mostraram que essas cepas compartilham um ancestral comum e constituem espécies distintas. Além disso, apresentaram semelhança morfológica que foram, possivelmente, herdadas do ancestral comum, como uma célula mais comprida que larga e projeções supraistmiais como visto na cepa MZCH244 e lobos laterais próximos, com recorte denticulado igual à cepa MZCH77.

O subclado B2 foi dividido em outros dois subclados: B2-1 e B2-2. O subclado B2 consistiu exclusivamente pela cepa MZCH50. Os organismos dessa cepa foram coletados na Alemanha e identificados previamente como *M. denticulata* Brébisson ex Ralfs. Esses indivíduos apresentaram morfologia mais simples, com o lobo polar mais curto e largo, os lobos laterais na maioria das vezes chegaram até a 3ª ordem e a célula apresentou recorte mais simples e sem projeções, com a célula mais comprida do que larga. Tais características morfológicas assemelharam aquelas obtidas na circunscrição de *M. denticulata* var. *angulosa* (Hantzsch) West & G.S.West proposta por West & West (1902).

O subclado B2-1 foi composto exclusivamente pela cepa MZCH08. Esta cepa também foi coletada na Alemanha e previamente identificada como *M. thomasi*. Diferente dos outros indivíduos analisados neste estudo, os organismos desta cepa apresentaram células mais simples, com o recorte celular mais acentuado e o formato da célula circular, o lobo polar mais estreito e comprido.

Além disso, apresentaram projeções supraistmiais e tamanho celular bem menor quando comparado com as outras cepas, inclusive, com outros indivíduos e variedades de *M. thomasi* propostos na literatura, pois não se parece com qualquer espécie ou figura registrada anteriormente.

O subclado B2-2 agrupou as cepas MZCH32 e MZCH216 como clados irmãos, os quais apresentaram pouca semelhança morfológica. Os organismos da cepa MZCH32 foram coletados em um lago na Finlândia e apresentam morfologia mais complexa, com a célula mais recortada, lobos laterais mais afastados e chegando em até a 4ª ordem. Apresentaram projeções acima do istmo e o lobo polar foi mais comprido e largo que nas demais cepas deste estudo identificadas como *M. thomasi*. A região apical do lobo polar foi repleta de dentículos e apresentaram organismos com comprimento celular grande e formato celular bem circular.

A cepa MZCH216 foi obtida de material coletado na Suécia. Seus indivíduos apresentaram morfologia mais simples, os lobos laterais foram bem próximos e apresentaram incisões mais rasas chegando em até a 3ª ordem. Além disso, não apresentaram projeções na célula e a única característica que apresentam em comum com os indivíduos da cepa MZCH32 foi o formato circular de sua célula.

Ao observar o posicionamento filogenético de cada cepa dentro dos subclados B1 e B2, foi possível concluir que no subclado B1 encontraram-se os organismos com características morfológicas mais semelhantes, tais como: lobo polar mais estreito e comprido, região apical do lobo polar apresentando dois dentes bem visíveis e o recorte apical mais “empinado”, com dois dentículos terminais.

Diferente no subclado B2 encontraram-se os organismos que apresentaram uma ampla variação de suas características morfológicas, o que pode estar relacionado com as diferentes regiões geográficas onde cada cepa foi coletada, resultado de uma possível adaptação ecológica, o que necessita ser melhor investigado futuramente. Entretanto, foi observado que todos os indivíduos que constituíram o subclado B2 apresentaram como características comuns o lobo polar mais “reto” e com a incisão mediana menos profunda.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que o clado *Micrasterias* sensu Škaloud *et al.* (2011) ainda está longe de ser completamente compreendido, evidenciando a necessidade de investigações mais aprofundadas com base em informações moleculares e morfológicas, visando a esclarecer as relações entre as espécies deste gênero, assim como sua classificação taxonômica.

As oito cepas presentemente estudadas foram previamente identificadas, ainda em suas respectivas coleções de cultivo de origem, como pertencentes às espécies *M. denticulata* e *M. thomasi*. Embora os indivíduos de algumas dessas cepas apresentassem características morfológicas diagnósticas das duas espécies em questão, com base nos dados moleculares e filogenéticos obtidos neste estudo foi reconhecido que todas as oito cepas analisadas constituem entidades taxonômicas distintas.

Com base nisso, novas proposições e emendas taxonômicas deverão ser providenciadas futuramente para nomear e classificar estas novas espécies dentro da linhagem *Micrasterias* (família Desmidiaceae).

5. REFERÊNCIAS CITADAS

- Agardh, C.A.** 1827. Aufzählung einiger in den österreichischen Landern gefundenen neuen Gattungen und Arten von Algen, nebst ihrer Diagnostik und beigefügten Bemerkungen. *Flora* 10: 625-646.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Andersen, R.A.** 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. 589p.
- Araújo, C.B., Bicudo, C.E.M., Silva, T.G., Šťastný, J., Trumhová, K. & Škaloud, P.** 2022. Hidden generic diversity in desmids: description of *Pseudomicrasterias* gen. nov. (Desmidiaceae, Zygnematophyceae), *Phycologia* 61: 227-240.
- Archer, W.** 1862. Description of a new species of *Micrasterias* (Ag. et Aliorum, non Ehr.), with remarks on the distinction between *Micrasterias rotata* (Ralfs) and *M. denticulata* (Bréb.). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, nov. sér. 2: 236-247.
- Brook, A.J.** 1981. *The biology of desmids*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 276 p.
- Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., Wittek, S., Reder, T., Günther, G., Gontcharov, A., Wang, S., Li, L., Liu, X., Wang, J., Yang, H., Xu, X., Delaux, P.M., Melkonian, B., Wong, G.K. & Melkonian, M.** 2019. Genomes of subaerial Zygnematophyceae provide insights into land plant evolution. *Cell* 179(5): 1057-1067.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D.** 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Gontcharov, A.A.** 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea* 8(2): 87-104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B. & Melkonian, M.** 2004. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Molecular Biology and Evolution* 21: 612-624.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M.** 2005. Molecular phylogeny of *Staurostrum* Mayen ex Ralfs and related genera (Zygnematophyceae, Streptophyta) based on coding and noncoding rDNA sequence comparisons. *Journal of Phycology* 41: 887-889.

- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M.** 2010. A study of conflict between molecular phylogeny and taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): analyses of 291 *rbcL* sequences. *Protist* 162: 253-267.
- Grönblad, R.** 1920. Finnländische Desmidiaceen aus Keuru. *Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 47: 1-98.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** 2024. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M. & Delwiche, C.F.** 2008. Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology* 44(2): 567-477.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.** 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160-174.
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K.D.** 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20(4): 1160-1166.
- Kimura, M.** 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Krieger, W.** 1939. Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten *in* Dr. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol. 13, fasc. 1(2). Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig. 117 p.
- Leebens-Mack, J., Barker, M., Carpenter, E., Deyholos, M., Gitzendanner, M., Graham, S., Grosse, I., Li, Z., Melkonian, M., Mirarab, S., Porsch, M., Quint, M., Rensing, S., Soltis, D., Soltis, P., Stevenson, D., Ullrich, K., Wickett, N., DeGironimo, L., Edger, P., Jordon-Thaden, I., Joya, S., Liu, T., Melkonian, B., Miles, N., Pokorny, L., Quigley, C., Thomas, P., Villarreal, J., Augustin, M., Barrett, M., Baucom, R., Beerling, D., Benstein, R., Biffin, E., Brockington, S., Burge, D., Burris, J., Burris, K., Burtet-Sarramegna, V., Caicedo, A., Cannon, S., Cebi, Z., Chang, Y., Chater, C., Cheeseman, J., Chen, T., Clarke, N., Clayton, H., Covshoff, S., Crandall-Stotler, B., Cross, H., DePamphilis, C., Der, J., Determann, R., Dickson, R., Stilio, V., Ellis, S., Fast, E., Feja, N., Field, K., Filatov, D., Finnegan, P., Floyd, S., Fogliani, B., Garcia, N., Gateble, G., Godden, G., Goh, Q.-Y., Greiner, S., Harkess, A., Heaney, J., Helliwell, K., Heyduk, K., Hibberd, J., Hodel, R., Hollingsworth, P., Johnson, M., Jost, R., Joyce, B., Kapralov, M., Kazamia, E., Kellogg, E., Koch, M., Konrat, M., Konyves, K., Kutchan, T., Lam, V., Larsson, A., Leitch, A., Lentz, R., Li, F.-W., Lowe, A.,**

- Ludwig, M., Manos, P., Mavrodiev, E., McCormick, M., McKain, M., McLellan, T., McNeal, J., Miller, R., Nelson, M., Peng, Y., Ralph, P., Real, D., Riggins, C., Ruhsam, M., Sage, R., Sakai, A., Scascitella, M., Schilling, E., Schlosser, E.-M., Sederoff, H., Servick, S., Sessa, E., Shaw, A., Shaw, S., Sigel, E., Skema, C., Smith, A., Smithson, A., Stewart, C., Stinchcombe, J., Szovenyi, P., Tate, J., Tiebel, H., Trapnell, D., Villegente, M., Wang, C.-N., Weller, S., Wenzel, M., Weststrand, S., Westwood, J., Whigham, D., Wu, S., Wulff, A., Yang, Y., Zhu, D., Zhuang, C., Zuidof, J., Chase, M., Pires, J., Rothfels, C., Yu, J., Chen, C., Chen, L., Cheng, S., Li, J., Li, R., Li, X., Lu, H., Ou, Y., Sun, X., Tan, X., Tang, J., Tian, Z., Wang, F., Wang, J., Wei, X., Xu, X., Yan, Z., Yang, F., Zhong, X., Zhou, F., Zhu, Y., Zhang, Y., Ayyampalayam, S., Barkman, T., Nguyen, N.-P., Matasci, N., Nelson, D., Sayyari, E., Wafula, E., Walls, R., Warnow, T., An, H., Arrigo, N., Baniaga, A., Galuska, S., Jorgensen, S., Kidder, T., Kong, H., Lu-Irving, P., Marx, H., Qi, X., Reardon, C., Sutherland, B., Tiley, G., Welles, S., Yu, R., Zhan, S., Gramzow, L., Theissen, G. & Wong, G.K.-S. 2019. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature* 574: 679-685.
- Letunic, I. & Bork, P. 2021. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49: 293-296.
- McCourt, R.M., Karol, K.G., Bell, J., Helm-Bychowski, K.M., Grajewska, A., Wojciechowski, M.F. & Hoshaw, R.W. 2000. Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on rbcL sequences. *Journal of Phycology* 36(4): 747-758.
- Meindl, U. 1993. *Micrasterias* as a model system for research on morphogenesis. *Microbiological Reviews* 57(2): 415-433.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees: páginas. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*: 1-8. Editorial. New Orleans.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Štastný, J., Škaloud, P. & Veselá, J. 2011. Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research* 59(3): 208-220.
- Neustupa, J., Nemjová, K., Veselá, J. & Škaloud, P. 2014. Splitting of *Micrasterias fimbriata* (Desmidiaceae, Viridiplantae) into two monophyletic species and description of *Micrasterias compereana* sp. nov. *Plant Ecology and Evolution* 147(3): 405-411.
- Neustupa, J. & Škaloud, P. 2007. Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). *Preslia* 79(4): 401-417.

- Neustupa, J., Škaloud, P. & Št'astny, J.** 2010. The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. *Journal of Phycology* 46: 703-714.
- Neustupa, J. Št'astný, J. & Hodac, L.** 2008. Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology* 51: 77-86.
- Posada, D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253-1256.
- Prescott, G.W., Croasdale, H.T. & Vinyard, W.C.** 1977. A Synopsis of North American Desmids. University of Nebraska Press, Lincoln. Vol. 2(2). 413 p.
- Ralfs, J.** 1848. The British Desmidiaceae. Reeve, Benham & Reeve, London. 226 p.
- Rambaut, A.** 2009. FigTree, version 1.4.3. Program de computador distribuído pelo autor. Acessado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (acesso em 4 de janeiro de 2011).
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- Škaloud, P., Nemjova, K., Vesela, J., Cerna, K. & Neustupa, J.** 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetic Evolution* 61: 933-943.
- Škaloud, P., Št'astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Pouličková, A. & Neustupa, J.** 2012. Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1281-1292.
- Stoeckle, M., Waggoner, P.E. & Ausubel, J.H.** 2005. Barcoding life, illustrated: goals, rationale, results. Disponível em www.barcoding.si.edu.
- West, W. & West, G.S.** 1902. A contribution to the freshwater algae of the North of Ireland. *Transactions of the Royal Irish Academy, sect. B* 32: 1-100.,
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, C., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.-J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.-S. & Leebens-Mack, J.** 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(45): E4859-4868.

- Wodniok, S., Brinkmann, H., Glöckner, G., Heidel, A.J., Philippe, H., Melkonian, M. & Becker, B.** 2011. Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? *BMC Evolutionary Biology* 11: 104.
- Zhong, B., Xi, Z., Goremykin, V.V., Fong, R., Mclenachan, P.A., Novis, P.M., Davis, C.C. & Penny, D.** 2013. Streptophyte algae and the origin of land plants revisited using heterogeneous models with three new algal chloroplast genomes. *Molecular Biology and Evolution* 31(1): 177-183.
- Zhou, H., & Schwartzberg, K.** 2020. Zygnematophyceae: from living algae collections to the establishment of future models. *Journal of Experimental Botany* 71(11): 3296-3304.

CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES

As espécies *Micrasterias denticulata* e *Micrasterias thomasi* apresentam, morfológicamente, grande semelhança entre si. Isto ocorre, principalmente, devido à dificuldade em diferenciá-las com base, apenas, nos atributos morfológicos comumente utilizados na literatura, tais como a largura e o comprimento celulares, o que gerou significativa confusão taxonômica e nomenclatural desde a descrição e proposição dessas duas espécies e de suas categorias infraespecíficas em meados do século XIX.

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho responderam, de forma satisfatória, às três perguntas que nortearam o desenvolvimento da pesquisa, como segue:

Pergunta 1: Os táxons infraespecíficos descritos para as espécies *M. denticulata* e *M. thomasi* representam unidades taxonômicas bem definidas dos pontos de vista morfológico, filogenético e molecular?

Após acurada revisão da literatura (capítulo 1) para as variedades e formas taxonômicas registradas para cada espécie, observou-se que os táxons infraespecíficos descritos para *M. denticulata* e *M. thomasi* nem sempre apresentaram características diagnósticas bem definidas em relação à sua morfologia.

1) Para *Micrasterias denticulata*: dos 37 registros disponíveis atualmente no banco de dados do Algaebase e na literatura clássica, apenas 14 corresponderam, de fato, a variedades e formas taxonômicas descritas para espécie. Esta redução numérica deveu-se ao fato de alguns táxons terem sido transferidos para outras espécies, tais como:

Três registros considerados de variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata* foram identificados como sinônimos de *Micrasterias thomasi*: *M. denticulata* var. *notata* tornou-se sinônimo de *M. thomasi* var. *notata*; e *M. denticulata* var. *subnotata* e *M. denticulata* var. *subnotata* f. *cornuta* sinônimos de *Micrasterias thomasi*.

Micrasterias denticulata subsp. *quadridentata* tornou-se sinônimo de *M. quadridentata*. Além disso, foram encontrados registros duplicados como foi o caso da var. *intermedia* proposta por Nordstedt e novamente por Bennett.

Novas proposições e emendas taxonômicas e nomenclaturais devem ser realizadas em relação à variedade *M. denticulata* var. *basiprotuberans* e à forma taxonômica *M. denticulata* var. *taylorii* f. *mammillata*, pois, segundo as descrições propostas, respectivamente, por Prescott e Scott em 1952 e Bullard em 1914, ambos os materiais são muito parecidos entre si, não existindo diferenças

suficientes para justificar sua manutenção como duas unidades taxonômicas distintas. Os referidos autores mencionaram a protuberância no lobo polar como uma característica diagnóstica presente nos dois táxons para diferenciá-los das demais variedades e formas taxonômicas de *M. denticulata*.

2) Para *Micrasterias thomasi*: dos 17 registros atualmente relacionados no banco de dados Algaebase e na literatura clássica, apenas 16 corresponderam a variedades e formas taxonômicas efetivamente associadas a esta espécie.

- A variedade *M. thomasi* var. *schweinfurthii* tornou-se sinônimo de *M. schweinfurthii*.
- A maioria das variedades e formas taxonômicas descritas para *M. thomasi* estiveram em conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Shenzhen), exceto os táxons propostos por Bourrelly em 1961 e Bourrelly e Couté em 1991, que apresentaram descrições em francês invalidando, consequentemente, os nomes *M. thomasi* var. *madagascariensis* e *M. thomasi* var. *ornata* f. *africana*, respectivamente.
- A partir da revisão realizada neste estudo, propôs-se que *M. thomasi* var. *maxima* seja considerada sinônimo de *M. thomasi* var. *javanica* devido à sua similaridade morfológica.
- Observou-se, além disso, que *M. thomasi* var. *ornata* f. *africana* apresentou características diagnósticas suficientes para ser reconhecida como uma variedade, em vez de uma forma taxonômica, tais como lobo polar mais estreito e medidas diferentes de comprimento e largura celulares. A partir dessa revisão, recomendou-se elevar esta forma taxonômica ao nível de variedade.

Em relação às análises moleculares e filogenéticas realizadas no capítulo 3, as cepas analisadas e inicialmente identificadas como *M. denticulata* e *M. thomasi* representaram unidades taxonômicas bem definidas dos pontos de vista molecular e filogenético, todas com elevado suporte obtido a partir das análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossemelhança, indicando que as variações morfológicas registradas e documentadas para esses organismos (capítulo 2) são consistentes e suportadas pela análise filogenética resultando, portanto, em sua distinção como unidades taxonômicas independentes.

- É importante ressaltar que, apesar de todas as cepas utilizadas neste estudo terem sido inicialmente classificadas como *M. thomasi* (seis cepas) e *M. denticulata* (duas cepas), os resultados da análise filogenética revelaram grande diferença entre elas, com características diagnósticas muito além das utilizadas na literatura clássica.
- Cada uma dessas oito cepas foi situada em clados distintos indicando que cada uma representa, de fato, uma espécie ou unidade taxonômica distinta dentro da linhagem *Micrasterias*, independente de sua classificação e identificação prévia como *M. denticulata* e *M. thomasi*.

- Isto ressaltou a importância das análises moleculares e filogenética para sua reclassificação e compreensão, em especial das algas verdes desmídias, onde os estudos recentes apontaram que o número real de espécies está longe de ser conhecido e de estar, muito provavelmente, subestimado. Deve-se considerar ainda que a maioria dos resultados obtidos ao longo dos presentes estudos está em desacordo com a classificação morfológica tradicional e nomenclatural utilizada para esse grupo de microalgas.

Pergunta 2: As análises morfológicas (medidas lineares e forma geométrica) são capazes de diferir as espécies entre si, bem como suas categorias infraespecíficas?

Consequência das análises morfológicas realizadas no capítulo 2 deste estudo, é possível afirmar que ambas as análises (morfometria linear tradicional e morfometria geométrica) foram eficazes na distinção e obtenção de características diagnósticas das cepas analisadas.

No que tange as categorias ou táxons infraespecíficos de *M. denticulata* e *M. thomasi*, estas foram avaliadas através da análise de morfometria geométrica (tabela 4 do capítulo 2) realizada nas figuras obtidas da literatura clássica, que também revelou diferenças significativas em relação à forma celular desses materiais.

1. Morfometria linear: tornou-se evidente que a proposta de novos atributos morfológicos foi útil na distinção interespecífica e intraespecíficas das cepas analisadas. Dos nove atributos avaliados, pôde-se afirmar que todos foram satisfatórios para caracterização geral das cepas. As principais diferenças observadas em cada cepa incluíram comprimento total (CT), comprimento do lobo polar (CLP), largura total (LT), largura apical (Lapic) e largura do lobo lateral 1 e 2 (LLat1 e LLat2). Estes atributos foram essenciais para diferir as oito cepas analisadas.

2. Morfometria geométrica: esta análise permitiu identificar quatro grupos distintos e evidenciou diferenças no que tange à forma dos organismos nas cepas analisadas. Esta abordagem mais abrangente e detalhada revelou características distintas entre as cepas, tanto em relação às duas cepas identificadas como *M. denticulata*, quanto às seis cepas identificadas como *M. thomasi*, onde duas delas (cepas MZCH 08 e MZCH 32) se apresentaram bastante diferente das demais.

- As cepas previamente identificadas como *M. denticulata* apresentam as semicélulas com lobos laterais mais fechados e mais curtos, lobo polar mais largo e mais curto e região apical mais larga, sem apresentar dentículo na incisão central da parte apical.
- As cepas previamente nomeadas como *M. thomasi* apresentaram lobo polar mais estreito e comprido, região apical do lobo polar menos larga e incisão central mais profunda, com dois ou mais dentículos.
- Foi observado também que as incisões celulares constituíram importantes fatores diferenciais entre as duas espécies. As cepas de *M. denticulata* apresentaram lobos laterais mais próximos

e incisões mais rasas, enquanto os indivíduos das cepas de *M. thomasi* apresentaram lobos laterais com incisões mais profundas e, em algumas cepas, lobos laterais mais afastados.

Pergunta 3. Com o uso da abordagem polifásica haverá alteração na classificação e quantidade de táxons registrados para cada uma das duas espécies estudadas?

O uso da abordagem polifásica (ou taxonomia integrativa de nível ω) aliando dados da literatura, morfologia/morfometria e de análises filogenéticas permitiu concluir que as cepas analisadas constituem unidades taxonômicas distintas ou novas espécies a serem propostas para o gênero *Micrasterias*, isto é, novas proposições e emendas taxonômicas deverão ser providenciadas futuramente para nomear e classificar estas novas espécies dentro da linhagem *Micrasterias* (família Desmidiaceae), incluindo uma reorganização do subclado D, que foi ampliado e modificado com o aumento do número de sequências de *M. denticulata* e *M. thomasi*.

Os resultados obtidos quanto ao posicionamento filogenético das cepas atualmente analisadas levantaram a questão sobre o real valor taxonômico das duas espécies estudadas, especialmente porque linhagens como as cepas previamente nomeadas e com características de *M. denticulata* derivaram de cepas com características de *M. thomasi*.

Surge, além disso, o questionamento sobre quais seriam os processos evolutivos que regeram até então essas espécies ou entidades taxonômicas em *Micrasterias*, pois, assim como observado por Škaloud e colaboradores em 2011, espécies morfologicamente mais elaboradas e de maior tamanho (*M. thomasi*) possivelmente originaram espécies morfologicamente mais simples e menores (*M. denticulata*) ao longo desse processo evolutivo.

Por fim, os dados presentemente apresentados evidenciaram a necessidade de investigações mais aprofundadas utilizando informação molecular e morfológica, visando, principalmente, a esclarecer as relações existentes entre as espécies de *Micrasterias*, assim como sua classificação taxonômica.

As informações obtidas neste estudo visaram também a subsidiar outros estudos, sejam eles moleculares e filogenéticos, morfológicos, fisiológicos e experimentais, buscando o mais amplo conhecimento e o entendimento mais adequado das relações existentes entre os organismos pertencentes à linhagem *Micrasterias*, família Desmidiaceae.