

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**DIATOMÁCEAS (*ASTERIONELLOPSIS*
ROUND) DE ZONA DE ARREBENTANÇA EM
REGIÃO TROPICAL E SUBTROPICAL DO
BRASIL**

ANDRÉA DE OLIVEIRA DA ROCHA FRANCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientadora: Clarisse Odebrecht

**RIO GRANDE
Julho 2015**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Clarisse Odebrecht por aceitar participar desta jornada científica, sempre com espírito investigativo apurado e mente aberta a novas idéias; pelos conhecimentos passados e confiança em mim depositada.

Aos amigos e os colaboradores Dr. Ng Haig They, Prof. Dr. Rodrigo Maggioni e Dr. Luis Gustavo de Castro Canani que participaram ativamente do processamento de amostras e contribuíram de forma indispensável para a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Plâncton - LABOMAR da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo envio de amostras vivas e fixadas do Ceará, cessão de estrutura física para a realização de coletas e pela gentileza na qual sempre fui recebida neste laboratório, em especial a Profa. Dra. Maria Odete Parente Moreira, Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares, Ms. Carolina Coelho Campos, Ms. Nivia Maria Oliveira Santos, Oc. Allana Maciel Cardoso dos Santos e Dra. Hortência de Sousa Barroso.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu pelo apoio, cessão de reagentes para extração de DNA, empréstimos de equipamentos e por aceitar participar da banca.

Aos amigos do Laboratório de Fitoplâncton Marinho da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Dr. Marcio Silva de Sousa, Ms. Carolina Antuarte Islabão, Ms. Lucas da Silva Maria, Dra. Stela Valenti Raupp, Dr. Carlos Rafael Borges Mendes, Ms. Amália Maria Sacilotto Detoni, Ms. Savênia Bonoto da Silveira, Oc. Milton Luiz Vieira Araujo Dra. Lucélia do Valle Borges e

Ms. Fabiane Serra pela amizade, troca de informações e discussões de cunho científico.

Aos amigos da FURG e do Cassino pela amizade e companheirismo, em especial a Ana Luzia de Figueiredo Lacerda, Ana Cecilia Gomes Silva, Marianna de Oliveira Lanari e Gonçalo Neves Corrêa.

Às Profas. Dras. Virginia Maria Tavano, Lezilda Carvalho Torgan, Irena Kaczmarska e Eileen Campbell por aceitarem participar da banca e avaliar esta dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	01
PALAVRAS-CHAVE.....	02
ABSTRACT.....	03
KEY WORDS.....	04
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. OBJETIVOS.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1. Isolamento e Manutenção das Cepas.....	09
3.2. Análise Molecular.....	09
3.3. Análise Morfométrica.....	12
3.4. Análises Estatística.....	13
4. SÍNTESE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	15
4.1. Análise Genética.....	15
4.2. Morfologia das Cepas.....	17
4.3. Diferenças Morfologia entre Cepas Tropicais e as outras espécies do gênero <i>Asterionellopsis</i>	19
4.4. Descrição Preliminar da Espécie Nova, <i>Asterionellopsis</i> sp.....	21
4.5. Implicações Ecológicas, Filogenéticas e Biogeografia.....	22
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICE: Manuscrito no formato do periódico Journal of Phycology.....	46

LISTA DE TABELAS

01 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos ITS1 + 5.8S + ITS2; Coi1 e RbcL.....	35
02 - Cepas de <i>Asterionellopsis</i> utilizadas nas análises genéticas e a data de isolamento, localização geográfica e numero de acesso das sequências no GenBank.....	36
03 - Modelos selecionados para cada gene dos alinhamentos de sequências <i>Asterionellopsis</i> com grupo externo (<i>Dimeregramma acutum</i>), obtidos de Pousada (2003).....	38
04 - Divergência (%) obtida a partir da distância par-a-par não corrigida, entre as sequências de <i>Asterionellopsis</i> isolada em região tropical (Praia do Futuro, CE, Brasil) e demais espécies conhecidas.....	39
05 - Valores de mínimo (Min), máximo (Max), média (m), desvio padrão (dp) e numero de medidas (N) de cada característica morfológica das cepas tropicais brasileiras e <i>A. guyunusae</i> (cepas subtropicais brasileiras).....	40

LISTA DE FIGURAS

01 - Principais medidas das frústulas de <i>Asterionellopsis</i> determinadas: 1) Comprimento total; 2) Largura da haste; 3) Largura máxima da base com manto aberto; 4) Altura ortogonal da base; 5) Largura do ocelo da base; 6) Altura do ocelo da base; 7) Número de estrias da valvocopula na região da haste.....	41
02 - Árvores filogenéticas de <i>Asterionellopsis</i> com os valores de probabilidade posterior, construídas com cada gene separadamente: (A) RbcL, (B) ITS1 + 5.8S + ITS2 e (C) Coi1.....	42
03 - Árvore filogenética de <i>Asterionellopsis</i> construída com três genes concatenados (Coi1, ITS1 + 5.8S + ITS2 e RbcL).....	43
04 - Microfotografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura: ocelos do polo basal da cepa subtropical ASTGUY2 (<i>A. guyunusae</i>), mostrando diferenças de altura e largura; Barra 0,05 μm	44
05 - <i>Asterionellopsis</i> sp. nov. (ASTTRO2) (A) vista externa da cepa (B) vista externa (esquerda), valvocopula e outras bandas (meio) e vista interna (direita) da haste (C) Cadeia de <i>Asterionellopsis</i> sp. nov. barra 5 μm	45

RESUMO

A diatomácea *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round *sensu lato* forma acumulações em zona de arrebentação em diversas praias arenosas no mundo. Com a recente descoberta de quatro espécies crípticas, é importante a identificação correta das espécies que estão presentes nessas acumulações. No presente estudo identificamos, através da morfologia de ultraestruturas e ferramentas moleculares (marcadores *Coi1*, *ITS1* + *5.8S* + *ITS2* e *RbcL*), duas espécies presentes em manchas de diatomáceas em praias arenosas no Oceano Atlântico Sul Ocidental na costa do Brasil, *Asterionellopsis gyunusae* Luddington em região subtropical (Praia do Cassino, 32° S, 52° W) e uma nova espécie desconhecida de *Asterionellopsis* em região tropical (Praia do Futuro, 3° S, 38° W), adicionando informações a cerca da diversidade e filogenia do gênero. As cepas tropicais oriundas de acumulações da Praia do Futuro podem ser diferenciadas morfologicamente de *Asterionellopsis lenisilicea* Mather, *Asterionellopsis marítima* Muise e *Asterionellopsis thurstonii* Ehrman pelo número de estrias na haste e em alguns casos de *A. gyunusae* pelo número de estrias na valvocopula da região da haste. As cepas tropicais não podem ser distinguidas morfologicamente de *A. glacialis*, mas a análise genética claramente evidencia um clado distinto formado somente pelas cepas tropicais brasileiras, justificando a identificação de uma nova espécie. As relações filogenéticas no gênero são aparentemente resultado de diferenças ambientais, considerando a maior proximidade genética entre as espécies das regiões subtropicais e temperadas do Atlântico Norte (*A. lenisilicea*, *A. marítima*: costa do Canadá) e Atlântico Sul (*A. gyunusae*: costa do Brasil e Uruguay), do que

com as cepas tropicais, apesar da maior proximidade geográfica entre a última e *A. guyunusae*. Entretanto, a distância geográfica parece também influenciar as relações filogenéticas no gênero.

PALAVRAS-CHAVE: diatomácea; espécie críptica; espécie pseudo críptica

ABSTRACT

The diatom *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round *sensu lato* can be found forming high-density patches in the surf zone of several sandy beaches around the world. Due to the recent discovery of four cryptic species, it is important the correct identification of the species present in the accumulations. In this study we identified, through the fine structures and molecular tools (Cox 1, ITS1 + 5.8S + ITS2 and RbcL), two species from diatom patches on sandy beaches of the Brazilian coast (western South Atlantic Ocean): *Asterionellopsis guyunusae* Luddington in subtropical region (Cassino Beach, 32° S, 52° W) and a new unknown species of *Asterionellopsis* in tropical region (Futuro Beach, 3° S, 38° W), adding information about the diversity and phylogeny of the genus. The identity of *A. guyunusae* in patches from the subtropical Cassino Beach, confirms its wide distribution in the South Atlantic Ocean. The tropical strains from Futuro Beach can be differentiated morphologically from *A. lenisilicea*, *A. maritima* and *A. thurstonii* by the number of striae on the head and, in some cases, from *A. guyunusae* by the number of striae in the head region of the valvocopula. The tropical strains were not distinguished morphologically from *A. glacialis*, but genetic analysis clearly evidenced a distinct monophyletic clade, justifying a new species. The phylogenetic relationships among *Asterionellopsis* are apparently influenced by environmental variables, considering the greater genetic similarity found between the metapopulation from subtropical and temperate regions of the North (*A. lenisilicea*, *A. maritima*; Canada) and South Atlantic (*A. guyunusae*; south of Brazil and Uruguay) oceans than with the

Asterionellopsis from tropical beach. However, the geographical distance probably also plays a role.

KEY WORDS: diatom; cryptic species; pseudo cryptic species

1. INTRODUÇÃO

Os critérios para a identificação de espécies de algas têm sido discutidos e variam de acordo com o conceito utilizado, por exemplo, se morfológico, biológico, filogenético ou ecológico, que possuem como base respectivamente, diferenças na morfologia, isolamento reprodutivo, formação de clusters monofiléticos e diferenças nas preferências ambientais para determinar as fronteiras entre os táxons (Leliaert *et al.* 2014). No entanto, todos estes conceitos pressupõem que as espécies são linhagens de metapopulações que evoluíram separadamente (De Queiroz 2007).

Ao longo da evolução, as diferenças morfológicas entre duas espécies podem levar um certo tempo para emergir e se estabelecer, até que possam ser usadas como características diagnósticas (Leliaert *et al.* 2014). O uso de ferramentas mais sensíveis como a análise molecular tem auxiliado na determinação de fronteiras entre as espécies de algas, possibilitado, inclusive, explorar a diversidade críptica e pseudo-críptica, geralmente oriunda de divergências recentes entre as linhagens (Mann 2010; Leliaert *et al.* 2014).

A diatomácea *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round *sensu lato*, considerada cosmopolita até recentemente, é apontada como responsável por eventos de acumulação de alta biomassa na zona de arrebentação em diferentes praias arenosas do mundo, desde tropicais a temperadas, em todas as bacias oceânicas (Odebrecht *et al.* 2014). Contudo, em estudo recente, Kaczmarska *et al.* (2014) descreveram quatro espécies crípticas de *Asterionellopsis*, cujas cepas foram isoladas de amostras dos oceanos Pacífico, Atlântico e Mar Negro, principalmente de regiões de clima temperado.

Considerando que alguns destes táxons ocorrem em regiões onde até o presente, não foram registradas acumulações de diatomáceas em zona de arrebentação, surge a pergunta sobre quais espécies de *Asterionellopsis* participam deste fenômeno.

Entre os estudos de biogeografia de diatomáceas marinhas em larga escala espacial, destacam-se os trabalhos de Casteleyn *et al.* (2010), que estudaram o fluxo gênico de *Pseudo-nitzschia*; Kooistra *et al.* (2008); Cermeño & Falkowski (2009); Abarca *et al.* (2014), que avaliaram a biogeografia de respectivamente, *Skeletonema*, fósseis de diatomáceas do Pleistoceno e *Gomphonema*, e Kaczmarska *et al.* (2014), sobre o gênero *Asterionellopsis*. Entretanto, existe uma grande carência de informação sobre ambientes de baixas latitudes (20° S - 20° N). Sabe-se que as regiões tropical e subtropical podem conter uma alta diversidade de fitoplâncton (Clayton *et al.* 2013) e a aquisição de informações sobre suas populações é fundamental para o entendimento de padrões globais de diversidade, biogeografia e processos de especiação nos oceanos.

A hipótese de Baas-Becking, de que tudo está em todos os lugares e o ambiente selecionaria os organismos que terão sucesso (Baas-Becking 1934), tem sido aplicada também para explicar a distribuição de diatomáceas. Com base em amostras de diatomáceas fósseis, Cermeño e Falkowski (2009) justificaram a homogeneidade encontrada nos diferentes oceanos pela alta taxa de dispersão e grande número populacional dessas microalgas. Os resultados de análise genética de alguns gêneros de diatomáceas como *Skeletonema* (Kooistra *et al.* 2008) tem corroborado com esta hipótese para

algumas espécies. Por outro lado, as premissas desta hipótese foram questionadas por Hughes-Martiny *et al.* (2006) e Casteleyn *et al.* (2010) que encontraram evidências de que a distância geográfica pode afetar a dispersão dos microrganismos e a distribuição e fluxo gênico dos microrganismos, em processo semelhante ao dos macrorganismos. Atualmente, este assunto é alvo de debates visando esclarecer se a distribuição espacial das diatomáceas seria principalmente controlada pela seleção de fatores ambientais ou pela dispersão de suas populações. Sendo assim, a análise de populações tropicais, cujos ambientes apresentam diferenças proeminentes em relação a regiões de alta latitude, poderá auxiliar na elucidação desta questão, sobre a influência da dispersão e das condições ambientais na biogeografia e filogenia de diatomáceas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Conhecer as espécies de *Asterionellopsis* presentes em acumulações de diatomáceas na zona de arrebentação de praias arenosas do Atlântico Sudoeste tropical e subtropical, utilizando ferramentas morfológicas (ultraestruturas) e moleculares (marcadores oriundos do núcleo, mitocôndria e cloroplasto).

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e cultivar cepas tropical e subtropical de *Asterionellopsis*.
- Identificar as espécies de *Asterionellopsis* capazes de formar acumulações na zona de arrebentação de praias arenosas em região tropical e subtropical brasileira.
- Determinar as relações filogenéticas entre as espécies de *Asterionellopsis*, com a inclusão de informações a cerca de populações da região tropical do Oceano Atlântico Sudoeste.

3. METODOLOGIA

3.1. Isolamento e Manutenção das Cepas

Foram isoladas cinco cepas de *Asterionellopsis* presentes em amostras de água de acumulações de diatomáceas na zona de arrebentação, duas oriundas de região tropical, Praia do Futuro, Ceará (CE) - Brasil (3° 41' S; 38° 27' W) (ASTTRO1, ASTTRO2) e três cepas isoladas em região subtropical, Praia do Cassino, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil (32° 12' S; 52° 10' W) (ASTGUY1, ASTGUY2, ASTGUY3). As cepas foram isoladas com o uso de micropipetas e diluições sucessivas; as culturas foram mantidas em meio f/2 (Guillard 1975) em incubadoras FANEM com temperatura de 20-23°C, salinidade 28-35, fotoperíodo de 12h de escuro e 12h de luz com irradiância de 190 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. As cepas fazem parte da Coleção de Microalgas do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

3.2. Análise Molecular

O DNA foi extraído do *pellet* de células de *Asterionellopsis* obtido por centrifugação do cultivo de cada cepa (4000 RPM; 5 min). A extração foi realizada através do Kit Comercial DNeasy® Plant Mini (QIAGEN) e o DNA estocado em -20°C. Três fragmentos de DNA foram amplificados: (1) região de espaço transcripcional (ITS), abrangendo o ITS1 + 5.8S + ITS2. (2) parte do gene que codifica a enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase (RbcL) do genoma do cloroplasto. (3) região que codifica a enzima citocromo c oxidase subunidade 1 (Coi1) do genoma mitocondrial. As reações em cadeia

de polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction) para a amplificação dos fragmentos ITS1 + 5.8S + ITS2 e RbcL foram conduzidas em 25 µl que continham 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs) e 1 µL de DNA extraído. A PCR de amplificação do Coi1 foi realizada em reações com 25 µl de volume, que continham uma unidade de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs e 1-2 µL de DNA extraído. Os primers utilizados estão relacionados na Tabela 01.

A amplificação de todos os fragmentos foi realizada em termociclador (The Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler) com desnaturação inicial de 94°C por 2 min. Na amplificação dos fragmentos ITS e RbcL, a desnaturação inicial foi seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C; 35 s), anelamento (50°C; 35 s) e extensão (72°C; 1 min), concluindo com uma extensão final de 72°C por 5 minutos (Lang & Kaczmariska, 2011). Para o Coi1 a desnaturação inicial foi seguida de 30 ciclos de desnaturação (94°C; 30 s), anelamento (48°C; 30 s), extensão (72°C; 60 s), com uma extensão final em 72°C por 10 minutos (modificado de Iwatani *et al.* 2005).

Foram realizadas quatro reações (25 µL) de PCR para cada fragmento e cepa. Estes produtos foram misturados, totalizando volume final de 100µL de DNA, que foi purificado com a adição de polietileno glicol (PEG) 10% no mesmo volume dos produtos da PCR e mantidos em banho-maria (37°C; 15 min). Em seguida foi adicionado etanol 80% (125 µl) e o material centrifugado (15.000 g; 15 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* invisível a olho nu,

foi lavado quatro vezes com etanol 80% adicionado suavemente pela borda do tubo, sendo centrifugado (15.000g) por 1-2 min, dependendo do tamanho do fragmento de interesse. Posteriormente, o *pellet* foi secado em temperatura ambiente até a eliminação de todo o resíduo de etanol (Hartley & Bowen 1996). Os produtos da PCR foram sequenciados, com Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante, sendo os produtos de sequenciamento purificados por centrifugação em isopropanol e lidos em um sequenciador automático capilar modelo ABI 3500 (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas manualmente e alinhadas no programa MEGA 6, através do algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1997). A divergência entre as sequências foi calculada pela distância simples por pares de sequências no programa MEGA 6 (Tamura *et.al.* 2013). Foi escolhido o método de distância não corrigida (p-distância), por ser mais indicado para comparar espécies próximas ou correlacionadas (Nei & Kumar 2000). A divergência foi calculada para os fragmentos: 5.8S + ITS2, *Coi1* e *RbcL*, porque apenas esses fragmentos têm valores de p-distância disponíveis na literatura para comparação. Quatro árvores filogenéticas foram construídas, sendo uma de cada gene individualmente para identificação das cepas e a última com os três genes concatenados para verificar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Asterionellopsis*. As análises envolveram 14, 12 e 11 sequências dos respectivos fragmentos *Coi1*; ITS1 + 5.8S + ITS2; *RbcL*, entre sequências obtidas neste trabalho e outras disponibilizadas no GenBank, incluindo uma sequência de *Dimeregramma acutum* Hustedt para cada fragmento, como

grupo externo das árvores filogenéticas de *Asterionellopsis* (Tabela 02). O modelo de substituição de nucleotídeos mais adequado para cada matriz de dados foi estimado através do Critério de Informação Akaike (Akaike, 1974) utilizando-se o programa JModeltest 2.1 (Tabela 03). A árvore com os genes concatenados foi construída utilizando-se o modelo mais adequado para cada partição (gene). As análises bayesianas foram realizadas no programa MrBayes 3.2.3. A amostragem pelo método de “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) foi realizada em duas buscas independentes, com quatro cadeias de um milhão de gerações cada, sendo uma topologia amostrada a cada 100 gerações e 25% descartadas. A convergência entre as buscas, o descarte de gerações e o desempenho da análise foram verificadas pelo gráfico dos valores do log da probabilidade (log *likelihood*) pelo número de gerações e pelo tamanho efetivo da amostra (>200) utilizando o programa Tracer 1.5.

3.3. Preparação das amostras e Análises Morfométricas

Análises morfométricas foram realizadas em amostras de cultivo em fase exponencial ou estacionária de crescimento, após seis a vinte e um meses de cultivo. Todas as amostras foram centrifugadas (4000 RPM, 5 min.) e lavadas com água destilada seis vezes. O *pellet* obtido foi submetido a oxidação com permanganato de potássio e ácido clorídrico e, em seguida lavado com água destilada seis vezes para a remoção da matéria orgânica e limpeza das frústulas (Simonsen 1974). Uma gota do concentrado de diatomáceas limpas foi pipetada sobre uma lamínula presa ao suporte (*stub*) de microscópio eletrônico com um adesivo de carbono e levada para secar em

estufa (50°C). Os *stubs* contendo as amostras secas foram cobertos com ouro em vácuo (Denton Vacuum Desk V) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM - 6610LV) operado em 25-30Kv com 9 mm de distância de trabalho no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul da Universidade Federal do Rio Grande

As imagens obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de no mínimo 15 frústulas de cada cepa de *Asterionellopsis* foram medidas com auxílio do programa AxioVision (Zeiss), e sempre que possível foram determinados: comprimento total da célula (eixo apical), largura da haste, número de estrias em 10 µm ao longo do esterno do polo basal, número de estrias e espinhos em 10µm da haste ou polo apical, número de estrias da valvocopula em 10 µm na região da base, número de estrias da valvocopula em 10 µm na região da haste, número de estrias do ocelo da base, largura e altura da moldura ao redor do ocelo da base, largura máxima da base e altura ortogonal da base (Figura 01). As duas últimas medidas foram propostas por Kaczmarska *et al.* (2014). Também foram calculadas as razões entre a largura máxima da base e altura ortogonal da base, e entre a largura e altura da moldura ao redor do ocelo. A nomenclatura das estruturas da frústulas seguiu aquela sugerida por Round *et al.* (1990).

3.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no programa R estatística (R Development Core Team 2014). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e a homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene,

do pacote Car (Fox & Sanford 2011). Foram comparados os valores médios de cada característica morfológica entre as amostras de cepas tropicais (isoladas da Praia do Futuro) e cepas subtropicais (isoladas da Praia do Cassino). Para dados normais e homocedásticos foi aplicada o teste t, e no caso de dados não-normais e/ou heterocedásticos foi aplicado o teste de Mann-Whitney do pacote exactRankTests (Hothorn & Hornik 2015).

4. SÍNTESE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Análises Genéticas

Foram obtidas, com sucesso, cinco sequências do gene *Coi1* (427-504 pb), sendo três sequências oriundas de cepas isoladas da região subtropical (RS) e duas de cepas da região tropical (CE); quatro sequências do fragmento ITS1 + 5.8S + ITS2 (720-744 pb), sendo duas sequências oriundas de cada região; e duas sequências, correspondendo a parte do gene *RbcL*, sendo uma sequência oriunda de cepa isolada da região subtropical (759 pb) e a outra da região tropical (700 pb) (Tabela 02). As árvores filogenéticas e os valores do p-distância foram obtidos por comparação entre as nossas sequências e as disponíveis no GenBank, o tamanho destes alinhamentos com lacunas foram: 418 pb para *Coi1*; 458 pb para 5.8S + ITS2; 449 pb para *RbcL* e 823 pb para ITS1 + 5.8S + ITS2.

A comparação entre as sequências obtidas das cepas de cada região geográfica do Brasil com dados disponíveis no GenBank de outras espécies do gênero revela a existência de uma grande similaridade entre os três clones isolados na região subtropical, Praia do Cassino, com *Asterionellopsis guyanusae* Luddington, registrada mais ao sul na costa do Uruguai (Kaczmarek et al. 2014). Não houve divergência genética entre eles para os três genes estudados.

A distinção das cepas isoladas em região tropical das outras espécies do gênero foi consistente, considerando a distância genética encontrada para os marcadores *RbcL* (2-6%) e *Coi1* (13-16%), na faixa condizente para a diferenciação entre espécies de diatomáceas (Evans et al. 2007; Moniz &

Kaczmarska 2009; Moniz & Kaczmarska 2010; MacGillivray & Kaczmarska 2011). A distância encontrada para o marcador 5.8S + ITS2 entre as cepas tropicais e as demais espécies foi relativamente pequena (10-12%) (Tabela 04). No entanto, a divergência intraespecífica máxima encontrada deste marcador em Fragilariaceae, na qual se encontra o gênero das *Asterionellopsis*, foi de no máximo 6% (Moniz & Kaczmarska 2010). A distância observada entre outras espécies (intra-genérica) para este fragmento nesta família foi de 16-30% (Moniz & Kaczmarska 2010), maior que a observada entre as cepas tropicais e as outras espécies do gênero (Tabela 04). Considerando-se que a divergência de nossas cepas tropicais das outras espécies do gênero é superior à observada em uma mesma espécie na família Fragilariaceae (Tabela 04), pode-se supor que o processo de especiação deva ser recente. Nestes casos, alguns marcadores podem apresentar sobreposição entre os níveis de distância genética intra e interespecífica (Hamsher *et al.* 2011).

Entre as outras espécies de *Asterionellopsis*, a divergência do 5.8S + ITS2 pode ser baixa, por exemplo entre *Asterionellopsis maritima* Muise e *Asterionellopsis lenisilicea* Mather foi de apenas 1%. No entanto, Kaczmarska *et al.* (2014) encontraram diferenças nas hélices II e III da estrutura secundária do ITS2, as quais corroboraram com a separação das espécies, uma vez que essas diferenças são correlacionadas com o isolamento reprodutivo de diatomáceas (Amato *et al.* 2007).

Nas árvores construídas com cada gene separadamente (*single-locus*), verifica-se a formação de um grupo monofilético constituído somente pelas

duas cepas tropicais brasileiras com alto suporte (probabilidade posterior igual a 1) para ITS1 + 5.8S + ITS2 e Coi1. Para RbcL, embora somente fosse obtido resultado de uma cepa, esta também formou um ramo distinto, confirmando que se trata de uma espécie desconhecida (Figura 02). As cepas subtropicais formaram um grupo monofilético com *A. gyunusae* com alto suporte, probabilidade posterior de 1, 0,97 e 1 para respectivamente as árvores dos genes Coi1, RbcL e ITS1 + 5.8S + ITS2 (Figura 02). Na árvore dos três marcadores concatenados (*multi-locus*), na qual o alinhamento teve 1690 pb com lacunas, a cepa brasileira subtropical formou um clado com *A. gyunusae* e a cepa tropical formou um ramo independente das outras espécies (Figura 03). Estes resultados confirmam a identificação das cepas subtropicais como *A. gyunusae*, e que as cepas tropicais se tratam de uma nova espécie, ainda desconhecida.

4.2. Morfologia das cepas

O valor médio do comprimento total das células variou de 24,6-41,2 μm e 14,4-38,5 μm nas cepas tropicais e subtropicais, respectivamente. O tamanho celular foi muito variável, por isso não houve diferença significativa entre as cepas ($p > 0.05$) (Tabela 05).

Em relação à morfologia do polo basal, o número de estrias ao longo do sternum em 10 μm apresentou considerável sobreposição de medidas (39,0-46,7; 40,5-46,9 respectivamente nas cepas tropicais e subtropicais). Contudo, houve diferença significativa entre as cepas ($p < 0,05$) (Tabela 05).

As medidas de largura da base, altura ortogonal da base, bem como a sua razão, dependem da abertura do manto para sua determinação, portanto da ação dos agentes oxidantes nas frústulas. Nas amostras analisadas, observamos a abertura parcial, total e não abertura do manto, sendo que raramente foram observadas frústulas com o manto totalmente aberto e com bordas não danificadas. Devido aos problemas descritos acima, poucas medidas foram obtidas (Tabela 05).

Considerando apenas as frústulas medidas com abertura total do manto das cepas subtropicais ($N = 9$), o valor médio da razão entre a largura máxima da base e altura ortogonal da base foi 2,1 (desvio padrão 0,2), e em frústulas das cepas tropicais ($N = 3$) este valor médio foi menor (1,8; desvio padrão 0,2).

Kaczmarska et al. (2014) considera esta razão uma importante característica morfológica para distinção entre as espécies crípticas do gênero *Asterionellopsis* e encontrou valores menores (1,5) para esta razão em *A. gyunusae*. No entanto, as cepas subtropicais do nosso estudo correspondem a *A. gyunusae* com base na similaridade genética das sequências e a filogenia dos marcadores utilizados. Portanto, concluiu-se que a variação na relação entre a largura e a altura da base ortogonal foi maior do que o previamente descrito.

A largura e a razão entre a largura e altura da moldura ao redor do ocelo foram diferentes ($p < 0,05$) entre as cepas, no entanto a altura da moldura do ocelo não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 05). Essa estrutura apresenta alta plasticidade morfológica e de tamanho na mesma

amostra (Figura 04), o que pode explicar a sobreposição de medidas entre as diferentes cepas.

A largura da haste variou de 0,39-1,57 μm nas cepas tropicais e 0,32-1,18 μm nas cepas subtropicais, indicando que essa característica apresenta alta plasticidade morfológica na mesma espécie. A largura da haste, o número de espinhos e de estrias ao longo de 10 μm da haste também foram diferentes quando comparamos as cepas tropicais e subtropicais. No entanto, essas características apresentaram sobreposição de valores, dificultando a sua utilização na separação morfológica de *A. guyunusae* (cepa subtropical) e a espécie nova descoberta neste trabalho (cepa tropical) (Tabela 05).

Em relação às estrias na valvocopula, observou-se diferença significativa entre as cepas tropicais e subtropicais ($p > 0,05$), em ambas as regiões da base e haste. Contudo, houve uma grande sobreposição de valores nas estrias da valvocopula medidas em 10 μm na região da base nas cepas tropicais (56,0-64,3) e nas cepas subtropicais (57,8-64,1). As estrias da valvocopula medidas em 10 μm na região da haste são a característica morfológica que melhor auxilia na separação entre as cepas tropicais (espécie nova) e subtropicais (*A. guyunusae*), pois apresentou menor sobreposição de valores entre as cepas (tropical 56,4-62,3; subtropical 60,7-63,1).

4.3 Diferenças na morfologia entre as cepas tropicais e outras espécies de *Asterionellopsis*

O número de estrias em 10 µm na valva da haste foi a característica que permitiu diferenciar morfológicamente as cepas tropicais (38,3-44,5) das espécies, *A. lenisilicea* (46–64), *A. maritima* (46–60) e *A. thurstonii* Ehrman (55–70) (Kaczmarska et al. 2014). Comparando as cepas tropicais e *A. guyunusae* entre si, houve diferença na maioria dos valores médios das características investigadas ($p < 0,05$), contudo os valores mínimos e máximos de cada característica morfológica, geralmente se sobrepuseram, dificultando a utilização da morfologia para a diferenciação dessas espécies (Tabela 05). O número de estrias na banda da haste em 10 µm foi a característica morfológica com menor sobreposição de medidas entre as cepas tropicais e *A. guyunusae*, e portanto permiti a distinção entre essas espécies em alguns casos (Tabela 05). No entanto, as cepas tropicais foram indistintas morfológicamente de *A. glacialis*, considerando as características morfológicas estudadas (Kaczmarska et al. 2014).

No processo de especiação, as diferenças morfológicas frequentemente surgem somente certo tempo após a divergência genética entre as linhagens. Por isto, espécies filogeneticamente próximas podem ser morfológicamente indistintas (Leliaert et al. 2014), mesmo apresentando diferenças fisiológicas e reprodutivas, por exemplo, temperatura distinta para reprodução sexuada (Quijano-Sheggia et al. 2009).

As características morfométricas da valvocopula são importantes na separação morfológica de algumas espécies de *Asterionellopsis*, como fica claro na comparação entre as cepas tropicais e *A. guyunusae*. Sendo assim,

recomenda-se que a valvocopula das demais espécies de *Asterionellopsis*, inclusive *A. glacialis*, também sejam examinadas em estudos futuros.

4.4. Descrição preliminar da espécie nova *Asterionellopsis* sp.

Descrição: Células heteropolares, pólo basal (base) com formato trapezoidal em vista pleural e oval em vista valvar. Haste (polo apical) estreita-se abruptamente, medindo duas a quatro vezes o comprimento do polo basal. Células unidas pelo polo basal, formando cadeias em formato de estrela (bidimensionais) ou em espiral (tridimensionais). Sternum estreito, estrias uniseriadas formadas por poros arredondados. Em cada polo da célula encontra-se um ocelo formado de aberturas em forma de fendas. Observa-se uma moldura de sílica mais grossa ao redor do ocelo do polo basal e uma abertura em rimoportula no final do polo apical (Figura 05).

Comprimento total 24,6 – 41,1 μm ; Largura da haste 0,4 – 1,6 μm ; estrias uniseriadas com poros arredondados: 39,0 – 46,7 estrias em 10 μm ao longo do sternum da base, 39,0 – 45,0 estrias em 10 μm ao longo do esternum da haste; 56,0 – 64,3 estrias em 10 μm ao longo da valvocopula na região da base; 56,4 – 62,3 estrias em 10 μm ao longo da valvocopula na região da haste; 5,0 – 7,0 espinhos em 10 μm na haste; 9,0 – 13,0 fendas no ocelo da base.

Assinatura Morfológica: As cepas tropicais apresentam número menor de estrias em 10 μm na haste (38,0-45,0), diferenciando-a facilmente de outras espécies descritas por Kaczmariska *et al.* (2014), *A. lenisilicea* (46,0-64,0), *A. maritima* (46,0-60,0) e *A. thurstonii* (55,0-70,0). Apesar da sobreposição de

medidas, o número de estrias em 10 µm na banda da haste, esta característica morfométrica pode auxiliar na separação entre as cepas tropicais (56,4 - 62,2) e *A. geyunusae* (60,7 – 64,0). Contudo esta espécie pode ser considerada críptica, não sendo possível sua separação morfológica de *A. glacialis*.

Assinatura Molecular: As cepas tropicais se diferenciam das outras espécies do gênero por consistente nível de divergência interespecífica nos genes RbcL, (p-distância ≥0,02; 2%) e Coi1 (p-distância ≥0,13; 13%) (Moniz & Kaczmarek 2009; MacGillivray & Kaczmarek 2011).

4.5. Implicações Ecológicas, Filogenéticas e Biogeográficas

Asterionellopsis glacialis sensu lato é um importante componente do fitoplâncton marinho, pois contribui com aproximadamente 1% da biomassa de diatomáceas nos oceanos globais (Leblanc *et al.* 2012) e faz parte do restrito grupo de diatomáceas de zona de arrebentação, ou *surf diatoms* (Campbell 1996; Odebrecht *et al.* 2014).

As diatomáceas de zona de arrebentação formam manchas visíveis e viscosas de cor marrom/alaranjada em diversas praias arenosas do mundo, devido a sua ocorrência em alta densidade celular, atingindo até 10⁹ células L⁻¹ (Campbell 1996). Diante da importância ecológica do fenômeno na produção primária de praias e, consequentemente, na teia trófica destes ambientes (Abreu *et al.* 2003; Rorig & Garcia 2003), é essencial que sejam identificadas as espécies, com base em cepas oriundas das próprias acumulações. De acordo com os resultados deste estudo verificou-se que em duas praias das regiões tropical e subtropical da costa brasileira, as cepas isoladas de manchas

pertencem à espécie *A. gyunusae* (Praia do Cassino) e a outra corresponde a uma espécie nova, até então desconhecida (Praia do Futuro), sendo ambas responsáveis por acumulações.

Contudo, *Asterionellopsis glacialis sensu lato* também forma acumulações em outras praias ao longo da costa brasileira entre as Praias do Futuro (3° S, 38° W) e Cassino (32° S, 53° W) (Odebrecht, *et al.* 2014) e essas acumulações podem ser formadas por uma ou mais espécies crípticas na mesma praia. A ocorrência de várias espécies crípticas no mesmo ambiente pode ser explicada por diferenças biológicas entre essas espécies, assim evitando a exclusão competitiva (Saez & Lozano 2005). Na costa da Dinamarca, foi observado que duas espécies crípticas de diatomáceas, *Chateoceros socialis* Lauder ocorrem no verão e *Chateoceros gelidus* Chamnansinp no inverno (Chamnansinp *et al.* 2013).

Acumulações de diatomáceas na Praia do Cassino, ocorrem o ano todo, mas leve tendência de aumento durante o inverno, quando a temperatura da água varia de 10-15°C e a salinidade é menor que 25 na zona de arrebentação (Odebrecht *et al.* 2010). Em contraste, a temperatura da água na Praia do Futuro varia de 26,7-29,9°C e a salinidade varia de 34-38 ao longo do ano (Franco 2013). Provavelmente as acumulações da Praia do Futuro são formadas apenas pela espécie nova (cepa tropical), e as acumulações da Praia do Cassino no inverno devem ser formadas apenas por *A. gyunusae*, devido a diferença na faixa de temperatura e salinidade nos ambientes de ocorrência conhecida destas espécies. No entanto, estudo ecofisiológicos devem ser

realizados com o objetivo de determinar as fronteiras de ocorrência de cada espécie.

Asterionellopsis glacialis sensu lato também forma acumulações na costa da África e Oceania, onde inexistem dados moleculares ou de microscopia electronica até o presente. Portanto, a identificação das espécies é essencial para o entendimento global da taxonomia do gênero. Além disto, as relações filogenéticas entre as espécies ou populações oriundas da África e América do Sul podem esclarecer a influencia das correntes do Atlântico Sul na dispersão em larga escala e biogeografia destas diatomáceas, já que existem correntes que conectam diretamente as duas costas.

O fluxo genético e a reprodução sexuada de microalgas são influenciados pela distância geográfica entre os indivíduos e consequente probabilidade de cruzamento (Dia *et al.* 2014). Estes fatores influenciam no processo de especiação e distinção das linhagens (Casteleyn *et al.* 2010). Aparentemente, barreiras físicas não foram importantes no isolamento de metapopulações de *Asterionellopsis* e as relações filogenéticas entre as suas espécies podem ser primordialmente explicadas pela distância geográfica. Na árvore filogenética dos três genes concatenados, observa-se que a divergência mais recente ocorre entre *A. lenisilicea* e *A. maritima*, que justamente foram encontradas em pontos de coleta próximos na costa leste do Canadá, portanto na mesma região geográfica (Figura 03). Esta região é considerada um *hotspot* de diversidade de fitoplâncton e apresenta uma grande variedade de nichos ecológicos (Clayton *et al.* 2013), o que permitiria uma possível especiação simpátrica, já que o ambiente é conectado, sem barreira física proeminente.

O clado das espécies canadenses (*A. lenisilicea* e *A. maritima*) aparece como irmão de *A. glacialis*, cepa isolada da costa do Oceano Pacífico Norte subtropical (México) e temperado (Japão) (Figura 03). Com base no estudo de fósseis de diatomáceas verificou-se que, a partir do Pleistoceno (1,5 milhões de anos), houve uma diferenciação biogeográfica entre as bacias dos oceanos Atlântico e Pacífico temperado, contudo existe um pequeno compartilhamento de espécies nessas regiões (Cermeño & Falkowski 2009), mesmo após o fechamento do istmo do Panamá que isolou as bacias do Atlântico e Pacífico no final no Plioceno (3,1-2,8 milhões de anos atrás) (Jackson *et al.* 1996). O uso dos microfósseis permite avaliar uma longa escala de tempo, mas não permite diferenciar espécies crípticas, pois se baseia em morfo-espécies (Cermeño & Falkowski 2009).

A análise de informações moleculares e morfológicas demonstra que algumas diatomáceas possuem ampla distribuição nas bacias oceânicas do Atlântico e Pacífico. Por exemplo, *Paralia guyana* MacGillivray, *Skeletonema japonicum* Zingone & Sarno, *S. marinoi* Zingone & Sarno, ocorrem em ambas as costas da América do Norte (Kooistra *et al.* 2008; MacGillivray & Kaczmarska 2015). Além disto, a estrutura mista da frequência de alelos em populações de *Pseudo-nitzschia pungens sensu lato* (Grunow) Hasle do Atlântico e do Pacífico, indica uma dispersão de longa distância que, entretanto, pode não ter sido suficiente para neutralizar as diferenças entre as populações (Casteleyn *et al.* 2010). Portanto, a barreira física da separação das bacias pelos continentes, aparentemente dificulta, mas não impede a dispersão de diatomáceas, o que explicaria a formação do clado de espécies

de *Asterionellopsis* do Canadá (Atlântico) e *A. glacialis* (Pacífico). A dispersão por longa distância ocorre de forma natural pela introdução de indivíduos em baixa abundância (biosfera dos raros) (Casteleyn *et al.* 2010), ou por influência antrópica como, por exemplo, transporte por água de lastro (Hallegraeff, & Bolch 1992; MacGillivray & Kaczmarska 2015).

Considerando os dados disponíveis, as espécies mais próximas geograficamente do clado *A. lenisilicea*, *A. maritima* e *A. glacialis* são *A. thurstonii* e a espécie nova (cepas tropicais brasileiras). No entanto, as três primeiras espécies formaram um clado monofilético com *A. guyunusae* (Figura 03), apesar da grande distância geográfica desta última, no Atlântico Sul subtropical e temperado (Sul do Brasil e Uruguai). Além da distância geográfica, as condições ambientais também devem atuar como barreira na distribuição das espécies. Por exemplo, a temperatura da água pode promover uma distribuição anti-tropical, como foi demonstrado para algumas espécies de foraminíferos e diatomáceas, que ocorrem apenas em alta latitude de ambos os hemisférios (Darling *et al.* 2000; Kooistra *et al.* 2008; Casteleyn *et al.* 2010; MacGillivray & Kaczmarska 2015).

As diferenças das condições físico-químicas da água (temperatura, salinidade e nutrientes) entre os ambientes de origem e destino podem limitar o estabelecimento e propagação de espécies exóticas de diatomáceas, mesmo com o alto aporte de indivíduos, como ocorre com *Paralia marina* transportada por água de lastro da Europa para a costa leste do Canadá (MacGillivray & Kaczmarska 2015). Indivíduos de uma população que sejam transportados para uma região com condições diferentes do ambiente de origem, terão uma

menor taxa de sucesso, mesmo que haja um aporte alto de indivíduos. Ao contrário, indivíduos transportados para ambientes com condições semelhantes às de origem terão maior chance de sobreviver.

É possível que as semelhanças ambientais tenham permitido um certo fluxo gênico entre as metapopulações que originaram as espécies de *Asterionellopsis*, das regiões subtropicais e temperadas (Norte e Sul) do Atlântico, apesar da distância geográfica. Ao contrário, o fluxo gênico entre as metapopulações tropicais e subtropicais, que originaram as espécies de *Asterionellopsis*, desta bacia oceânica foi menor, justificando a maior distância genética e o padrão das relações filogenéticas entre as espécies de *Asterionellopsis* (Figura 03).

5. CONCLUSÕES

Em síntese, entre as espécies de diatomáceas que formam acumulações na zona de arrebentação em algumas praias do Brasil, destacam-se uma espécie nova, descoberta no presente estudo, na Praia do Futuro (região tropical) e *A. gyunusae* na Praia do Cassino (região subtropical). Comparadas a outras espécies do gênero, essas não possuem características morfológicas exclusivas e nem formam um clado distinto na árvore filogenética. Porém, as cepas tropicais podem ser diferenciadas morfológicamente de *A. lenisilicea*, *A. marítima* e *A. thurstonii* pelo menor número de estrias na haste em 10 µm; apresenta pequena sobreposição de medidas com *A. gyunusae* do número de estrias da valvocopula na região haste em 10 µm, e não se distingue morfológicamente de *A. glacialis*. Como na maioria das espécies deste gênero, inclusive *A. glacialis*, existem disponíveis somente informações morfométricas da valva, é possível que as características da valvocopula auxiliem na sua diferenciação. A distribuição cosmopolita anteriormente atribuída a *A. glacialis sensu lato*, se deve a sua alta diversidade críptica (Kaczmarska *et al.* 2014). Até o presente, foram identificadas quatro espécies para o hemisfério norte subtropical e temperado (*A. glacialis*, *A. lenisilicea*, *A. marítima* e *A. thurstonii*) (Kaczmarska *et al.* 2014); somente uma espécie para o hemisfério sul subtropical e temperado (*A. gyunusae*) e outra para a região tropical do Atlântico (espécie nova - cepas tropicais brasileiras). As diatomáceas de zona de arrebentação servem de excelente modelo para auxiliar na elucidação de processos de fluxo gênico, especiação e biogeografia de diatomáceas e sugere-se que *Anaulus australis* Drebes and Schulz,

Aulacodiscus kittonii Arnott ex Ralfs e *Attheya armata* (West) Crawford, também capazes de acumular em zona de arrebentação em locais distantes geograficamente, sejam analisadas com este objetivo.

6. REFERÊNCIAS

- ABARCA, N, R JAHN, J ZIMMERMANN & N ENKE. 2014. Does the cosmopolitan diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing have a biogeography? *PLoS One*. 9:1–18.
- ABREU, PC, LR RÖRIG, V GARCIA, C ODEBRECHT & B BIDDANDA. 2003. Decoupling between bacteria and the surf-zone diatom *asterionellopsis glacialis* at Cassino Beach, Brazil. *Aquat. Microb. Ecol.* 32:219–228.
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*. 19:716–723.
- AMATO, A, WHCF KOOISTRA, JHL GHIRON, DG MANN, T PRÖSCHOLD & M MONTRESOR. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*. 158:193–207.
- BAAS-BECKING, LGM. 1934. Geobiologie ; of inleiding tot de milieukunde. Netherlands, W.P. Van Stockum & Zoon N.V, Den Haag. 263 p.
- CAMPBELL, EE. 1996. The global distribution of surf diatom accumulation. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69:495–501.
- CASTELEYN, G, F LELIAERT, T BACKELJAU, AE DEBEER, Y KOTAKI, L RHODES, N LUNDHOLM, K SABBE, W VYVERMAN. 2010. Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:12952–12957.
- CERMEÑO, P & PG FALKOWSKI. 2009. Controls on diatom biogeography in the ocean. *Science*. 325:1539–1541.
- CHAMNANSINP, A, Y LI, N LUNDHOLM & Ø MOESTRUP. 2013. Global Diversity of Two Widespread, Colony-Forming Diatoms of the Marine Plankton, *Chaetoceros Socialis* (syn. *C. Radians*) and *Chaetoceros Gelidus* sp. nov. *J. Phycol.* 49, 1128–1141.
- CLAYTON, S, S DUTKIEWICZ, O JAHN & MJ FOLLOWS. 2013. Dispersal , eddies, and the diversity of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr. Fluids Environ.* 3:182–197.
- DARLING, KF, CM WADE, IA STEWART, D KROON, R DINGLE & AJ BROWN. 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature*. 405:43–47.

DAUGBJERG, N & RA ANDERSEN. 1997. A Molecular Phylogeny of The Heterokont Algae Based on Analyses of Chloroplast-Encoded RbcL Sequence Data1. *J. Phycol.* 33:1031–1041.

DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56:879–886.

DIA, A, L GUILLOU, S MAUGER, E BIGEARD, D MARIE, M VALERO & C DESTOMBE. 2014. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of harmful algal blooms caused by the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Mol. Ecol.* 23:549–560.

EVANS, MK, AH WORTLEY, & GD MANN. 2007. An Assessment of Potential Diatom “Barcode” Genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158: 349-364.

FOX, F & W SANFORD. 2011. Companion to Applied Regression. 2nd ed. Sanger. disponível em: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

FRANCO, AOR. 2013. Variação Temporal e Espacial das Acumulações de Diatomáceas (Manchas Marrons) em Uma Praia Tropical de Mesomaré Praia do Futuro (Fortaleza Ceará). Monografia em Oceanografia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 87 p.

GUILLARD, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L & M. H. Chanley (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, US, Springer, 29-60pp.

HALLEGRAEFF, G & C BOLCH. 1992. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: Implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.* 14 (8): 1067-1084

HAMSHER, SE, KM EVANS, DG MANN, A POULÍČKOVÁ & GW SAUNDERS. 2011. Barcoding diatoms: Exploring alternatives to COI-5P. *Protist.* 162:405–422.

HARTLEY JL & H BOWEN. 1996. PEG precipitation for selective removal of small DNA fragments. *Focus.* 18:27.

HOTHORN, T & K HORNIK. 2015. exactRankTests: Exact Distributions for Rank and Permutation Tests. R package version 0.8-28. disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=exactRankTests>

HUGHES-MARTINY, J B, BJM BOHANNAN, JH BROWN, RK COLWELL, JA FUHRMAN, JL GREEN, MC HORNER-DEVINE, M KANE, JA KRUMINS, CR KUSKE, PJ MORIN, S NAEEM, L OVREÅS, A L REYSENBACH, V H SMITH,

JT STALEY. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:102–112.

IWATANI, N, S MURAKAMI & Y SUZUKI. 2005. A sequencing protocol of some DNA regions in nuclear, chloroplastic and mitochondrial genomes with an individual colony of. *Polar Biosc.* 18:35–45.

JACKSON, JBC, AF BUDD, & AG COATES. 1996. *Evolution and Environment in Tropical America*. Chicago, University of Chicago Press. 436 p.

KACZMARSKA, I, L MATHER, IA LUDDINGTON, F MUISE & JM EHRMAN. 2014. Cryptic diversity in a cosmopolitan diatom known as *Asterionellopsis glacialis* (Fragilariaceae): Implications for ecology, biogeography, and taxonomy. *Am. J. Bot.* 101:267–286.

KOOISTRA, WHCF, D SARNO, S BALZANO, H GU, RA ANDERSEN & A ZINGONE. 2008. Global Diversity and Biogeography of *Skeletonema* Species (Bacillariophyta). *Protist.* 159:177–193.

LANG, I, & I KACZMARSKA. 2011. A protocol for a single-cell PCR of diatoms from fixed samples: method validation using *Ditylum brightwellii* (T. West) Grunow. *Diatom Res.* 26:43–49.

LEBLANC, K, J ARÍSTEGUI, L ARMAND, P ASSMY, B BEKER, A BODE, E BRETON, V CORNET, J GIBSON, MP GOSSELIN, E KOPCZYNSKA, H MARSHALL, J PELOQUIN, S PIONTKOVSKI, AJ POULTON, B QUÉGUINER, R SCHIEBEL, R SHIPE, J STEFELS, MA van LEEUWE, M VARELA, C WIDDICOMBE & M YALLOP. 2012. A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst. Sci. Data Discuss.* 5:147–185.

LELIAERT, F, H VERBRUGGEN, P VANORMELINGEN, F STEEN, JM LÓPEZ-BAUTISTA, GC ZUCCARELLO & O CLERCK. 2014. DNA-based species delimitation in algae. *Eur. J. Phycol.* 49:179–196.

MacGILLIVARY, ML & I. KACZMARSKA. 2011. Survey of the efficacy of a short fragment of the *rbcl* gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58:529–536.

MacGILLIVARY, M & I KACZMARSKA. 2015. *Paralia* (Bacillariophyta) stowaways in ship ballast: implications for biogeography and diversity of the genus. *J Biol Res-Thessalon.* 22 (1): 1-26

MANN, DG. 2010. Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end? *Plant Ecol. Evol.* 143:251–264.

MONIZ, MBJ & I KACZMARSKA. 2009. Barcoding diatoms: Is there a good marker? *Mol. Ecol. Resour.* 9:65–74.

MONIZ, MBJ & I KACZMARSKA. 2010. Barcoding of Diatoms: Nuclear Encoded ITS Revisited. *Protist.* 161:7–34.

NEI, M & S KUMAR. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. 328 p

ODEBRECHT, C, M BERGESCH, LR RÖRIG, PC ABREU. 2010. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuar Coas* 33: 570-583.

ODEBRECHT, C, DR DU PREEZ, PC ABREU & EE CAMPBELL. 2014. Surf zone diatoms: A review of the drivers, patterns and role in sandy beaches food chains. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 150:24–35.

POSADA, D. 2003. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* Chapter 6:Unit 6.5.

QUIJANO-SCHEGGIA, SI, E GARCÉS, N LUNDHOLM, Ø MOESTRUP, K ANDREE & J CAMP. 2009. Morphology, physiology, molecular phylogeny and sexual compatibility of the cryptic *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyta), including the description of *P. arenysensis* sp. nov. *Phycologia.* 48:492–509

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. disponível em <http://www.R-project.org/> .

ROUND, FE, RM CRAWFORD, & DG MANN. 1990. The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. Cambridge, Cambridge University Press. 747p.

RÖRIG, LR & VMT GARCIA. 2003. Accumulations of the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* (CASTRACANE) ROUND in Cassino Beach, southern Brazil, and its relationship with environmental factors. *J. Coast. Res.* 35:167–177.

SÁEZ, AG & E LOZANO. 2005. Cryptic species: as we discover more examples of species that are morphologically indistinguishable, we need to ask why and how they exist. *Nature.* 433:111.

SIMONSEN, R. 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of RV "Meteor" 1964-1965 (Meteor Forschungsergebnisse), Berlin, Gebrüder Borntraeger, 19(D):107p.

TAKANO, Y. & T HORIGUCHI. 2006. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell. *J. Phycol.* 42:251–256.

TAMURA, K, G STECHER, D PETERSON, A FILIPSKI & S KUMAR. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2759.

THOMPSON, JD, TJ GIBSON, F PLEWNIAK, F JEANMOUGIN & DG HIGGINS. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876–4882.

Tabela 01. *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos ITS1 + 5.8S + ITS 2; Coi1 e RbcL.

Fragmentos	Primer	Referência
ITS1+5.8S+ITS 2	SR12cF Forward TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAA;	Takano & Horiguchi 2006
	25F1R Reverse ATATGCTTAAATTC AGCGG	
Coi1	CoxF Forward ATGATTTTTTTTATGGTGATGCC;	Iwatani <i>et al.</i> 2005
	CoxR Reverse CCAAACCCAGGTAAAATTAAAAT	
RbcL	Dtrbcl2F Forward TCAGAACGGACTCGAATTAAA;	Daugbjerg & Andersen 1997
	Dtrbcl2R Reverse CCAATWGTACCACCACCYAAT	

Tabela 02. Cepas de *Asterionellopsis* utilizadas nas análises genéticas e a data de isolamento, localização geográfica e numero de acesso das sequências no GenBank.

Espécie/Cepa Data de Isolamento	Local de Coleta	Coi1	ITS1+ 5.8S + ITS2	RbcL
*Cepas Tropicais ASTTRO1 03/2014	Praia do Futuro Brasil 3°41' S 38°27' W	KT351586	KT336328	-
* Cepas Tropicais ASTTRO2 03/2014	Praia do Futuro Brasil 3°41' S 38°27' W	KT351587	KT336329	KT336325
* <i>A. guyunusae</i> ASTGUY1 09/2012	Praia do Cassino Brasil 32°12' S 52°10' W	KT285183	-	-
* <i>A. guyunusae</i> ASTGUY2 06/2014	Praia do Cassino Brasil 32°12' S 52°10' W	-**	KT336326	KT336324
* <i>A. guyunusae</i> ASTGUY3 06/2014	Praia do Cassino Brasil 32°12' S 52°10' W	KT343751	KT336327	-
<i>A. guyunusae</i> UR1 2009	Montevideo Uruguai 34°57'S 56°9'W	-	KF454002	-
<i>A. guyunusae</i> UR8 2009	Montevideo Uruguai 34°57'S 56°9'W	KF453984	KF454003	KF453990
<i>A. thurstonii</i> CCMP135 na	Black Sea ~43°00'N ~34°00'E	KF453985	GQ330311	KF453991
<i>A. thurstonii</i> CCMP1581 01/1992	Renesee Holanda 51° 43' N 3° 46' E	KF453986	GQ330312	KF453992
<i>A. lenisilicea</i> MB9 2009	Baía de Maces Canadá 45° 5'N	KF453981	-	-

<i>A. lenisilicea</i> MB8 2009	66° 28'W Baía de Maces Canadá 45° 5'N	KF453980	-	-
<i>A. lenisilicea</i> MB7 2009	66° 28'W Baía de Maces Canadá 45° 5'N	-	KF453999	KF453987
<i>A. marítima</i> HX5 2009	66° 28'W Bedford Canadá 44° 24'N 63° 40'W	KF453982	KF454000	KF453988
<i>A. marítima</i> EC114(4) 2009	Saint Jonh's Canadá 47° 33'N 52° 42'W	KF453983	KF454001	KF453989
<i>A. glacialis</i> KMCCB296 1999	Samcheonpo Japão 34° 55'N 128° 4'E	-	-	HQ710592
<i>A. glacialis</i> CCMP139 ou IK_MTA55 01/1964	Baía da California México 24°16'N 111°31'W	GQ844246	FJ864272	-
<i>Dimeregramma</i> <i>acutum</i> Van5.3 05/2010	Vancouver Canada 49°1'N 123°6'W	KF768027	KF454004	KF453994

*Presente estudo

** Sequencias submetidas, ainda aguardando o numero de acesso do GenBank

Tabela 03. Modelos selecionados para cada gene dos alinhamentos de sequências *Asterionellopsis* com o grupo externo (*Dimeregramma acutum*), obtidos de Pousada (2003).

Partição (genes)	Modelo de substituição de nucleotídeos	Distribuição das substituições
Coi1	TIM2	Gamma + Sítios invariáveis
ITS1 + 5.8S + ITS2	TVM	Gamma
RbcL	TPM3uf	Sítios invariáveis

Tabela 04. Divergência (%) obtida a partir da distância par-a-par não corrigida, entre as sequências de *Asterionellopsis* isolada em região tropical (Praia do Futuro, CE, Brasil) e demais espécies conhecidas.

	Coi1	5.8S + ITS2	RbcL
<i>A. geyanusae</i>	14%	10%	4%
<i>A. thurstonii</i>	13%	12%	3%
<i>A. maritima</i>	15%	10%	5%
<i>A. lenisilicea</i>	15-16%	12%	6%
<i>A. glacialis</i>	14-15%	10%	2%

Tabela 05. Valores de mínimo (Min), máximo (Max), média (m), desvio padrão (dp) e numero de medidas (N) de cada característica morfológica das cepas tropicais brasileiras e *A. guyunusae* (cepas subtropicais brasileiras).

	Cepas Tropicais		Cepas subtropicais (<i>A. guyunusae</i>)	
	Min - Max m (dp)	N	Min - Max m (dp)	N
Comprimento total	24,6 – 41,1 30,1 (3,9)	30	14,4 – 38,8 27,7 (7,4)	48
*Estrias ao longo do esternum da base (10µm)	39,0 – 46,7 41,2 (1,4)	30	40,5 – 46,9 43,3 (1,5)	50
*Largura maxima da base (L)	7,0 -7, 9 7,3 (0,5)	3	7,3- 10,1 8,7 (0,8)	9
Altura Ortogonal da base (H)	4,0 – 4,2 4,1 (0,1)	3	3,6 – 5,2 4,2 (0,7)	9
*L/H – polo basal	1,7- 1,9 1,8 (0,1)	3	1,7 – 2,4 2,1 (0,2)	9
*Número de estrias no ocelo	9,0 – 13,0 10,4 (1,2)	14	7,0 – 12,0 9,3 (1,4)	23
*Largura da moldura do ocelo (Lo)	2,6 – 3,7 3,0 (0,4)	7	1,8 – 3,3 2,2 (0,3)	15
Altura da moldura do ocelo (Ho)	1,3 – 2,0 1,6 (0,2)	7	1,2 – 1,8 1,5 (0,2)	16
*Lo/Ho -Ocelo	1,5-2,2 1,9 (0,2)	7	1,1 – 1,7 1,5 (0,2)	15
*Largura da haste	0,4 – 1,6 0,7 (0,3)	30	0,3 – 1,2 0,6 (0,2)	45
*Estrias na haste (10µm)	39,0 – 45,0 41,0 (1,3)	25	40,0 – 46,0 44,0 (2)	24
*Espinhos na haste (10µm)	5,0 – 7,0 6,0 (1)	6	6,5-9,0 7,5 (0,8)	8
*Estrias na valvocopula da região da base (10µm)	56,0 – 64,3 59,4 (2,3)	17	57,8 – 64,1 61,3 (1,7)	16
*Estrias na valvocopula da região da haste (10µm)	56,4 – 62,3 59,5 (1,9)	12	60,7 – 63,1 61,7 (0,8)	8

* Característica que apresentou diferença estatística entre as espécies, considerando medidas de cepa e campo ($p < 0,05$).

Figura 01. Principais medidas das frústulas de *Asterionellopsis* determinadas:
 1) Comprimento total; 2) Largura da haste; 3) Largura máxima da base com manto aberto; 4) Altura ortogonal da base; 5) Largura do ocelo da base; 6) Altura do ocelo da base; 7) Número de estrias da valvocopula na região da haste.

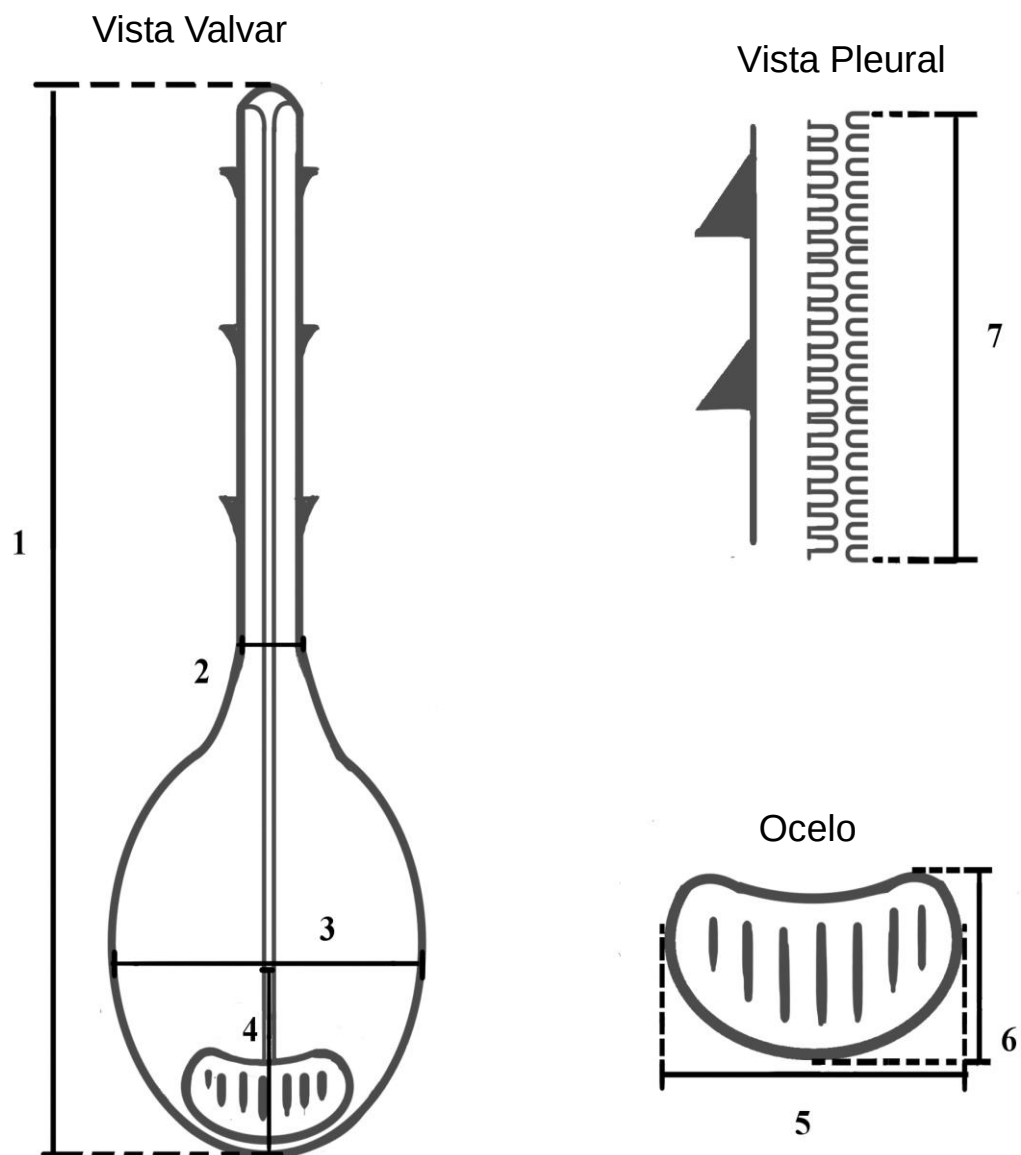


Figura 02. Árvores filogenéticas de *Asterionellopsis* com os valores de probabilidade posterior, construídas com cada gene separadamente: (A) RbcL, (B) ITS1 + 5.8S + ITS2 e (C) Coi1.

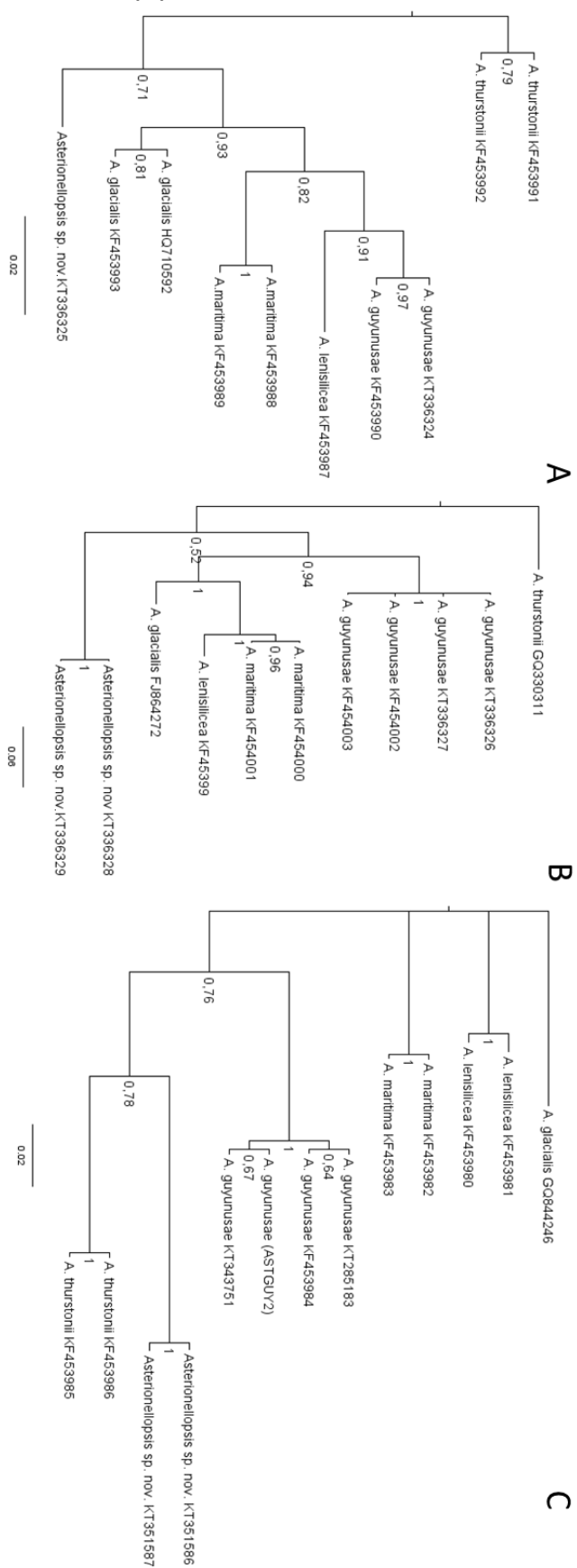


Figura 04. Microfotografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura: ocelos do polo basal da cepa subtropical ASTGUY2 (*A. guyunusae*), mostrando diferenças de altura e largura; Barra 0,05 μm .

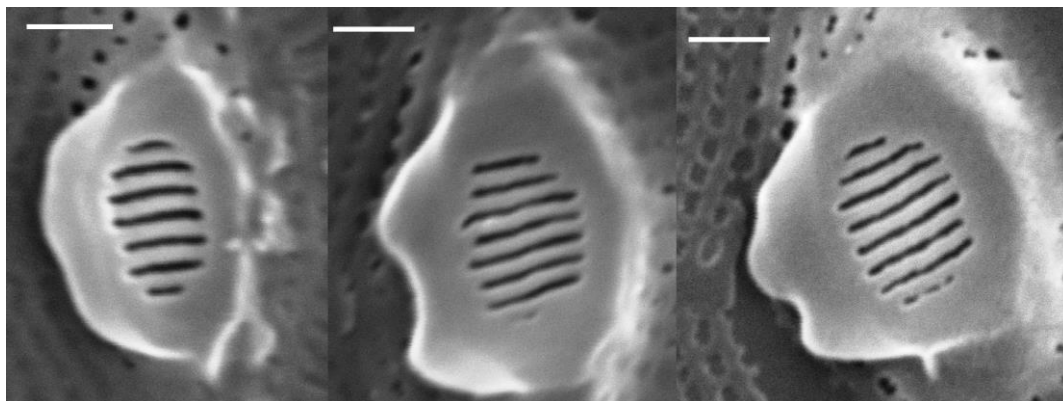


Figura 05. *Asterionellops* sp. nov. (ASTTRO2) (A) vista externa da cepa (B) vista externa (esquerda), valvocopula e outras bandas (meio) e vista interna (direita) da haste (C) Cadeia de *Asterionellops* sp. nov. ;barra 5 μ m

