



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE DIATOMÁCEAS
(BACILLARIOPHYCEAE) DO ESTADO DO PARANÁ

PAULA CAROLINA FERREIRA

Nível doutorado

Orientadora: Thelma Alvim Veiga Ludwig
Co-Orientadora : Vanessa Merlo Kava

CURITIBA

2022

INTRODUÇÃO

As diatomáceas constituem um dos grupos de microalgas com maior riqueza de espécies na maioria dos ambientes aquáticos, tanto na comunidade fitoplanctônica, quanto na perifítica. Representam importante parcela da biomassa total e exercem papel fundamental na cadeia trófica como produtores primários e fixadores de carbono no ambiente. (WETZEL, 1983),

A principal característica do grupo é a presença de uma parede celular composta por dióxido de silício (SiO_2), denominada frústula (STOERMER; JULIUS, 2011). A estrutura e as complexas ornamentações observadas nas frústulas das diatomáceas são fundamentais para taxonomia do grupo (BOLD; WYNNE, 1985), representado atualmente por 250 gêneros e 17.316 espécies (GUIRY; GUIRY, 2022).

O atual conhecimento das preferências das espécies as tornam um dos grupos mais importantes para a determinação da qualidade de águas continentais (ROUND; CRAWFORD; MANN 1990; PASSY, 2007; BENNION et al., 2014). Devido à sua presença ubíqua, facilidade de coleta e preservação, além da rápida resposta a mudanças ambientais são utilizadas como confiáveis indicadores biológicos em vários países como: África do Sul (WALSH; WEPENER, 2009), Alemanha (KOSTER; HUBENENER, 2001), Austrália (NEWALL; WALSH, 2005), Finlândia (VILMI et al., 2015), Grécia (ZILLER; MONTESANTO, 2004), Irã (ATAZADEH; SHARIFI; KELLY, 2007), Itália (TORRISI; DELL UOMO, 2006), Malásia (MAZNAH; MANSOR, 2002), Nepal e Índia (JUTTNER et al., 2003) e Turquia (GURBUZ; KIVRAK, 2002; KALYONCU et al., 2009).

A estrutura e as complexas ornamentações observadas nas frústulas das diatomáceas são fundamentais para taxonomia do grupo (BOLD; WYNNE, 1985). Estudos recentes, para melhor circunscrição de espécies, tem embasamento em características morfológicas da frústula em microscopia de luz e microscopia eletrônica dos complexos populacionais de espécies de diatomáceas (*Gomphonema gracile* e *Achnantheidium minutissimum*).

As espécies de diatomáceas são frequentemente organizados em grupos morfológicamente semelhantes que compartilham inúmeras características e os intervalos morfométricos se sobrepõem (POTAPOVA; HAMILTON, 2007). Vários “complexos de espécies” foram relatados com um alto nível de diversidade (AJANI et al., 2013). A resolução de táxons morfológicamente semelhantes são especialmente difícil através de análises em microscopia óptica (MO) (BLANCO et al., 2017), pois muitas espécies de diatomáceas são, frequentemente, organizadas em grupos morfológicamente semelhantes que compartilham características e sobrepõe medidas

(POTAPOVA; HAMILTON, 2007), como por exemplo *Frustulia crassinervia*/*F. australocrassinervia*, *Eunotia serra*/*E. georgii*, *E. sudetica*/*meridiana*/*pseudosudetica*, *Nitzschia palea*/*N. paleaceae*, *Nitzschia amphibia*/*N. semirobusta* e *Gomphonema parvulum*/*G. angustum*, morfoespécies, sendo estas espécies, frequentemente incluídas em floras de diatomáceas. No entanto, métodos auxiliares como análises moleculares e de geometria morfométrica podem revelar se estes complexos de diatomáceas são complexos de espécies constituídos por poucas ou muitas espécies, cuja identificação em MO é difícil (POTAPOVA; HAMILTON, 2007; MANN et al., 2008; POULÍČKOVÁ et al., 2010).

Diante desta notável plasticidade fenotípica observada em alguns gêneros de diatomáceas, estudos moleculares como ferramenta para a identificação morfológica de espécies de diatomáceas vem crescendo e, se tornando indispensáveis, (VANORMELINGEN et al., 2007; URBÁNKOVÁ; VESELÁ, 2013; VANORMELINGEN et al., 2007; 2008).

Cox (2014) explicita que, embora a microscopia óptica (MO) e a microscopia eletrônica (ME) ainda sejam a base para a taxonomia das diatomáceas, é fundamental a adoção de abordagens complementares, como a biologia molecular, rendendo ricas fontes de informações com relação à diversidade genética dentro de espécies de diatomáceas bem caracterizadas morfológicamente e auxiliando na resolução de problemas taxonômicos.

A aplicação de marcadores moleculares para identificação de táxons (*DNA barcoding*) é um método emergente que tem o potencial de ser rápido, universalmente aplicável e com alta confiabilidade. Além disso, por utilizar sequências de DNA para identificação, independe de conceitos de espécies morfológicas preexistentes, podendo estar ligada a qualquer conceito taxonômico. O *DNA barcoding* em geral utiliza fragmentos curtos de DNA (400-600 pb) para identificar espécies (HEBERT et al., 2003) e a correta identificação depende da qualidade das sequências obtidas bem como da precisão do banco de sequências disponível para comparação (KAHLERT et al., 2019). Considerando a crescente disponibilidade de sequenciamentos de DNA, o método molecular torna-se promissor na identificação de espécies para pesquisa básica e aplicada (URBÁNKOVÁ; VESELÁ, 2013). Para diatomáceas as sequências mais utilizadas para identificação molecular de espécies são *rbcL* (ribulose-bisphosphate carboxylase), *SSU* (small subunit ribosomal) e *LSU* (large subunit ribosomal) (MACGILLIVARY; KACZMARSKA, 2011, LUDDINGTON et al., 2012).

Muitos grupos de protistas, como as diatomáceas, ainda são pouco caracterizados através da biologia molecular, apesar da incontestável importância ecológica e econômica destes organismos (MCMANUS; KATZ, 2009; STERN et al.,

2010). Desde que as técnicas moleculares foram aplicadas à pesquisa de diatomáceas pela primeira vez na década de 1980 (MEDLIN et al., 1988) estudos filogenéticos moleculares têm sido realizados para identificar e classificar as diatomáceas (THERRIOT et al., 2010), na tentativa de superar as limitações morfológicas (EVANS et al., 2007; MONIZ; KACZMARSKA, 2010; MANN et al., 2010; URBANKOVÁ et al., 2016; ZOU et al. 2021).

Estudos usando taxonomia refinada, com ferramentas diversas, apoiada por dados moleculares podem elucidar questões a cerca de complexos de espécies, além de fornecer dados mais confiáveis com relações de espécies individuais e parâmetros ambientais, permitindo assim, uma melhor precisão ecológica das espécies de diatomáceas e sua real distribuição geográfica.

No Brasil, a diversidade das diatomáceas vem sendo estudada por diversos autores desde o início do século XIX, na primeira metade deste século, materiais de diversas partes do mundo, incluindo o Brasil, foram analisados por pesquisadores da Europa (SILVA et al., 2012). No Paraná, os estudos com as diatomáceas se iniciaram na década de 1950, com os trabalhos de Andrade e Rachou (1954) e Moreira-Filho e Fernandes (1958), desde então foram realizados 88 trabalhos até o ano de 2009 (TREMARIN et al. 2009), sendo registrados até o ano de 2021 cerca de 153 estudos com diatomáceas. Levando-se em consideração a elevada riqueza de espécies de diatomáceas observadas nos levantamentos florísticos para o Paraná e com isso uma elevada subjetividade taxonômica no tratamento de várias espécies, concluiu-se sobre a necessidade de uma revisão na taxonomia das espécies de diatomáceas do Paraná, visando a harmonização taxonômica das espécies encontradas no Estado, adequando os aspectos subjetivos da identificação e complementando as informações morfológicas inexistentes em alguns materiais. A fim de rever as identificações realizadas anteriormente, confirmando ou reidentificando as populações documentadas estudos com amostras do estado, focando na harmonização taxonômica das espécies que ocorrem nesta região, além de documentar a ultra-estrutura das espécies e a variabilidade morfológica.

Levando-se em consideração a grande riqueza e diversidade de espécies diatomáceas para o país e a complicada taxonomia dos complexos específicos a proposta do presente trabalho é coletar amostras com conhecida biodiversidade, cultivar e discutir a taxonomia das espécies e aspectos filogenéticos dos gêneros em questão, com base na morfologia, análises de geometria morfométrica e em sequências informativas de DNA.

OBJETIVO GERAL

Ampliar e aprofundar o conhecimento taxonômico de espécies de diatomáceas do Paraná com base no estudo detalhado de populações, visando a identificação de táxons, a harmonização taxonômica das espécies e a detecção de novidades taxonômicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e revisar as identificações dos táxons já documentados para o Estado, confirmando ou re-identificando as populações;
- Realizar o estudo taxonômico utilizando ferramentas diversas: análise de Tipos, ultraestrutura, geometria morfométrica e identificação molecular;
- Estabelecer protocolos para isolamento e cultivo de espécies de diatomáceas;
- Contribuir com a real ocorrência dos táxons estudados no Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras:

Amostras serão coletadas durante excursões realizadas ao entre os anos de 2022-2024, a fim abranger os diferentes corpos d'água (nascentes, riachos, encharcados, reservatórios) e diferentes substratos (rochas úmidas, briófitas) em nascentes, rios e correços do Caminho do Itupava, da Estação Ecológica do Guaraguaçu, do Parque Estadual do Guartelá, do Parque Estadual de Vila Velha e dos Mananciais da Serra. As amostras serão coletadas contemplando principalmente a comunidade perifítica, através de coleta de substratos variados. Dados abióticos das águas superficiais dos ambientes amostrados serão mensurados no momento da coleta: pH, T água e ar e condutividade, através de equipamentos de campo disponíveis no Laboratório de Ficologia (UFPR).

Isolamento e Cultivo:

Alíquotas de cada amostra serão transferidas para um Placa de Petri de 50 mm com 12 mL de meio GG com silicato e elementos traço adicionados (VON STOSCH; FECHER, 1979; MANN; CHEPURNOV, 2004), ou meio PM (GUILLARD; LORENZEN, 1972), recomendados para o cultivo de diatomáceas de água doce a partir de habitats oligotróficos ácidos, *Eunotia* em particular. Também, será utilizado o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) padrão para diatomáceas de ambientes com pH neutro ou mais elevado. Após alguns dias, culturas clonais serão então estabelecidos pela transferência de células com micropipetas para microplacas de 24 poços, com 2 mL do meio. Serão mantidos à 21°C, com fotoperíodo de 12:12 h luz:escuro e 25-30 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bem estabelecidos os cultivos, alíquotas serão transferidas para tubos de ensaio de 15 mL e na sequência, para erlenmeyers de 250 mL, a fim de se obter maior biomassa para análises molecular e morfológica. Enquanto isso, para manutenção a longo prazo, as subculturas serão armazenadas em pequenos recipientes de plástico com 10 mL de meio GG, a 6-7 °C com fotoperíodo de 8:16 h luz:escuro e c. 5 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; nessas condições, os clones crescem mais lentamente e subculturas podem ser mantidas sem re-inoculação por pelo menos 4 a 5 meses (VANORMELIGEN et al., 2007).

Estudo taxonômico morfológico:

O material será oxidado segundo a técnica de Simonsen (1974) modificado por Moreira-Filho e Valente-Moreira (1981) nesta técnica a matéria orgânica será removida pela adição de KMnO_4 e HCl. Lâminas permanentes serão montadas com resina Naphrax® (R.I.1.74) e analisadas em microscópio óptico Olympus BX40. As ilustrações serão obtidas utilizando-se microscópio Olympus BX-40 com câmera de captura acoplada Olympus DP-071.

Para análise da ultraestrutura das frústulas, parte do material oxidado será depositado e seco sobre suportes de alumínio, metalizado com ouro em aparelho Balzers Union SCD 030 e analisados em microscópio eletrônico de varredura – MEV (JEOL JSM 6360LV e TESCAN VEGA3LMU, 15 kV e WD 8 mm). Outra parte do material oxidado será depositada em grades de cobre com malha de 300 mash e analisado em microscópio eletrônico de transmissão – MET (JEM 1200EXII, 80 kV). Ambos, localizados no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Lâminas permanentes das amostras serão depositadas no herbário do Departamento de Botânica da UFPR (UPCB).

A taxonomia basear-se-á em literatura clássica e atual de regiões tropicais, temperadas e subtropicais, tais como: Patrick e Reimer (1966), Krammer e Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, 1991b), Lange-Bertalot, Bak e Witkowski (2011), Metzeltin e Lange-Bertalot (1998, 2007).

Estudo de geometria morfométrica

As espécies serão classificadas com base em caracteres morfológicos e métricos usando o software WEKA 3.9 (BOUCKAERT et al., 2018). Os atributos serão adicionados posteriormente a um algoritmo de acordo com suas classificações para encontrar o subconjunto com a maior precisão de classificação (% de táxons corretamente identificados).

Identificação molecular

O DNA genômico das linhagens selecionadas será extraído com o kit NucleoSpinPlant II da Macherey-Nagel (MN, Düren, Germany) ou kit equivalente, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a avaliação da pureza do DNA obtido será feita em NanoDrop e confirmada a integridade por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído será utilizado como molde em reação de PCR.

Para a reação de amplificação serão preparadas soluções dos reagentes necessários à PCR. Os primers a serem testados serão escolhidos na literatura de acordo com o grupo de organismos estudados pelos autores, no caso em Diatomáceas. A reação será realizada em termociclador com temperaturas de anelamento específicas para cada par de primer. Para confirmação de presença da amplificação no tamanho esperado para cada par de iniciadores, os produtos da PCR serão aplicados em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed e visualizados em transiluminador UV. Os produtos obtidos serão submetidos à purificação enzimática usando Exonuclease I e fosfatase alcalina de acordo com a instrução do fabricante. Os fragmentos de PCR serão sequenciados pelo método de Sanger.

O alinhamento das sequências obtidas será realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7., com posterior inspeção visual através do programa BioEdit

As sequências serão empregadas para análise filogenética utilizando o método Bayesiano usando o software MrBayes versão 3.1.2. com 25% de queima das árvores iniciais, e no mínimo 0,01 de desvio para atingir a convergência e com no mínimo 1.000.000 de gerações árvores rodadas. Para mesclar e sumarizar as árvores de consenso, será utilizado o software Sum Trees com vários processos paralelos, utilizando-se o pacote DendroPy versão 3.7.0. Para as análises filogenéticas e identificação molecular das espécies, as sequências obtidas serão comparadas com diversas sequências disponíveis (de preferência validadas) no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e R-SYST (RIMET et al., 2016).

RESULTADOS ESPERADOS

Ao longo do desenvolvimento deste projeto e na sua conclusão os resultados esperados são:

- Elaboração de uma lista das espécies de diatomáceas do Estado, harmonizadas taxonomicamente; Contribuir com a real ocorrência dos táxons estudados no Paraná;
- Publicar espécies novas para a ciência;
- Utilizar a análise de geometria morfométrica para identificar as espécies de diatomáceas.
- Estabelecer protocolos ideais, para isolamento e cultivo de espécies de diatomáceas de ambientes tropicais;
- Compreender a real delimitação das espécies, dentro de complexos de espécies, utilizando de forma conjunta a taxonomia clássica e a identificação molecular;
- Desenvolver análises filogenéticas através de biologia molecular e morfologia associadas para resolver complexos de espécies e gerar barcodings.

Os resultados obtidos serão divulgados em periódicos nacionais ou internacionais, dependendo do enfoque e do interesse regional ou internacional, certamente de alto impacto. Pretendemos também apresentar os dados preliminares em eventos científicos da área, a fim de gerar discussões sobre o assunto e aprimorar nossas técnicas.

Pretendemos participar do 26º International Diatom Symposium, Central European Diatom Meeting, 7th Congress for the International Society for Applied Phycology, 72º Congresso Nacional de Botânica e 18º Congresso Brasileiro de Ficologia.

VIABILIDADE DO PROJETO

Coletas

Coletas serão realizadas durante excursões realizadas entre os anos de 2022-2024, a fim abranger os diferentes corpos d'água e diferentes substratos existentes no estado do Paraná.

As campanhas de coleta são financiadas por verba de projeto ou verba própria. A UFPR cede veículo para deslocamento de pesquisadores. Também, pesquisadores da SANEPAR e de áreas de conservação, acompanham as excursões através de solicitações formais rotineiras, sem custo.

Análises das amostras

O processamento das amostras e os estudos morfológicos serão realizados no laboratório de Ficologia do departamento de Botânica sob a supervisão da profª Thelma Alvim Veiga Ludwig.

O Laboratório de Ficologia mantém bibliografia atualizada específica e está equipado com microscópios fotônicos, com câmera digital de alta resolução acoplada, para o trabalho taxonômico.

As análises da ultraestrutura das frústulas serão realizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura no Centro de Microscopia eletrônica BL/UFPR.

Cultivo

Câmaras de cultivo com fotoperíodo (BODs) controlado estão disponíveis no laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da UFPR.

Será utilizado o fluxo laminar do laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do departamento de Genética para preparos de meio de cultivo e para o manuseio dos cultivos, sob a supervisão da Profª Vanessa Merlo Kava.

Análises Moleculares

As análises moleculares serão realizadas no laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do departamento de Genética sob a supervisão da Profª Vanessa Merlo Kava. Alguns materiais de consumo já foram adquiridos para os

experimentos de cultivo e molecular. Outros serão adquiridos através de verba compartilhada.

A equipe concorreu e foi contemplada com verba dos editais de Apoio em Pesquisa, para compra de material de consumo para as análises moleculares no ano de 2021. Fontes de financiamento serão buscadas continuamente.

RISCOS DO PROJETO

A maior dificuldade esperada em nosso estudo é estabelecer cultivos de diatomáceas para posteriores análises morfológicas e moleculares. As diatomáceas não se adaptam facilmente ao meio de cultivo, sendo necessário testar diferentes meios de cultivo para encontrar o que apresente maior preferência pelas diatomáceas.

REFERÊNCIAS

AJANI, P.; MURRAY, S.; HALLEGRAEFF, G.; LUNDHOLM, N.; GILLINGS, M.; BRETT, S.; ARMAND, L. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New South Wales, Australia: morphotaxonomy, molecular phylogeny, toxicity, and distribution. **Journal of Phycology**, v. 49, p. 765-785, 2013.

ANDRADE, R.M.; RACHOU, R.G. Levantamento preliminar de organismos planctônicos em alguns criadouros do *Anopheles darlingi* no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 6, n. 1, p. 481-496, 1954.

ATAZADEH, I.; SHARIFI, M.; KELLY, M.G. Evaluation of the trophic diatom index for assessing water quality in River Gharasou, western Iran. **Hydrobiologia**, v. 589, p. 165-173, 2007.

BENNION, H.; KELLY, M.G.; JUGGINS, S.; YALLOP, M.L.; BURGESS, A.; JAMIESON, J.; KROKOWSKI, J. Assessment of ecological status in UK lakes using benthic diatoms. **Freshwater Science**, v. 33, n. 2, p. 639-654, 2014.

BESZTERI K.; ÁCS E.; MEDLIN L. Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta). **European Journal of Phycology**, v. 40, p. 89-103, 2005.

BLANCO, S.; BORREGO-RAMOS, M.; OLENICI, A. Disentangling diatom species complexes: does morphometry suffice? **PeerJ**, v. 5, e4159, 2017.

BOLD, C.H.; WYNNE, M.J. **Introduction to the Algae**. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice – Hall, 1995.

BOUCKAERT, R.R.; FRANK, E.; HALL, M.; KIRKBY, R.; REUTEMANN, P.; SEEWALD, A. SCUSE, D. WEKA Manual for Version 3-9-3. 2018.

COX, E.J. Diatom identification in the face of changing species concepts and evidence of phenotypic plasticity. **Journal of Micropalaeontology**, v. 33, n. 2, p. 111-120, 2014.

ENGLISH J.D.; POTAPOVA M.G. Ontogenetic and interspecific valve shape variation in the Pinnatae group of the genus *Surirella* and the description of *S. lacrimula* sp. nov. **Diatom Research**, v. 27, p. 9-27, 2012.

EVANS, K.M. WORTLEY, A.H.; MANN, D.G. An assessment of potential diatom "barcoding" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). **Protist**, v. 158, p. 349-364, 2007.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycologie**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUIRY, M.D. In: Guiry, M.D.; Guiry, G.M.. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2022. Disponível em: [<http://www.algaebase.org>]. Acesso em 01 de fevereiro de 2022.

GURBUZ, H.; KIVRAK, E. Use of epilithic diatoms to evaluate water quality in the Karasu River of Turkey. **Journal of Environmental Biology**, v. 23, p. 239-246, 2002.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identification through DNA barcodings. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

JUTTNER, I.; SHARMA, S.; DAHAL, B.M.; ORMEROD, S.J.; CHIMONIDES, P.J.; COX, E.J. Diatoms as indicators of stream quality in the Kathmandu Valley and Middle Hills of Nepal and India. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 2065-2084, 2003.

KALYONCU, H.N.; CICEK, L.; AKKOZ, C.; OZCELIK, R. Epilithic diatoms from the Darıoren stream (Isparta/Turkey): biotic indices and multivariate analysis. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 18, p. 1236-1242, 2009.

KERMARREC L.; BOUCHEZ A.; RIMET F.; HUMBERT J.F. First evidence of the existence of semi-cryptic species and of a phylogeographic structure in the *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing complex (Bacillariophyta). **Protist**, v. 164, p. 686-705, 2013.

KOSTER, D.; HUBENER, T. Application of diatom indices in a planted ditch constructed for tertiary sewage treatment in Schwaan, Germany. **International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 241-252, 2001.

KAHLERT, M.; KELLY, M.G.; MANN, D.G.; RIMET, F.; SATO, S.; BOUCHEZ, A.; KECK, F. Connecting the morphological and molecular species concepts to facilitate species identification within the genus *Fragilaria* (Bacillariophyta). **Journal of Phycology**, v. 55, n. 4, 2019.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae: Naviculaceae**. In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart e New York: G. Fischer, v. 2, n. 1, 1986. 876 p.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae**. In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart e New York: G. Fischer, v. 2, n. 2, 1988. 596 p.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae**. In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart e Jena: G. Fischer, v. 2, n. 3, 1991(a). 576 p.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema**. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Gerloff, J.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart e Jena: G. Fischer, v. 2, n. 4, 1991(b). 437 p.

KULICHOVÁ, J.; FIALOVÁ, M. Correspondence between morphology and ecology: morphological variation of the *Frustulia crassinervia-saxonica* species complex (bacillariophyta) reflects the ombro-minerotrophic gradient. **Cryptogamie Algologie**, v. 37, p. 15-28, 2016.

LANGE-BERTALOT, H.; BAK, M.; WITKOWSKI, A. **Eunotia and some related genera** In: LANGE-BERTALOT, H. Diatoms of Europe. A.R.G. Gantner Verlag K.G.; Koenigstein, 2011.

LAVOIE, I.; CAMPEAU, S.; ZUGIC-DRAKULIC, N.; WINTER, L.G.; FORTIN, C. Using diatoms to monitor stream biological integrity In: eastern Canada: an overview of 10 years of index development and ongoing challenges. **Science of the Total Environment**, v. 475, p. 187-200. 2014.

LUDDINGTON, I. A.; KACZMARSKA, I.; LOVEJOY, C. Distance and Character-Based Evaluation of the V4 Region of the 18S rRNA Gene for the Identification of Diatoms (Bacillariophyceae). **PlosOne**, v. 7, 2012.

MACGILLIVARY, M.L.; KACZMARSKA, I. Survey of the efficacy of a short fragment of the *rbcL* gene as a supplemental DNA barcoding for diatoms. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, p. 529-536, 2011.

MANN, D.G.; CHEPURNOV, V.A. What have the Roman sea done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics. **Nova Hedwigia**, v. 79, p. 237-291, 2004.

MANN, D.G.; THOMAS, S.J.; EVANS, K.M. Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles. **Fottea**, v. 8, p. 75-78, 2008.

MANN, D.G.; SATO, S.; TROBAJO, R.; VANORMELINGEN, P.; SOUFFREAU, C. DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. **Cryptogamie Algologie**, v. 31, p. 557-577, 2010.

MAZNAH, W.O.W.; MANSOR, M. Aquatic pollution assessment based on attached diatom communities in the Pinang River Basin, Malaysia. **Hydrobiologia**, v. 487, p. 229-241, 2002.

MCMANUS, G.B.; KATZ, L. A. Molecular and morphological methods for identifying plankton: what makes a success full marriage? **Journal of Plankton Research**, v. 31, p. 1119-1129, 2009.

MEDLIN, L.K.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Genetica**, v. 71, p. 491-499, 1988.

METZELTIN, D.; LANGE-BERTALOT, H. **Tropical Diatoms of South America**. In: LANGE-BERTALOT, H. *Iconographia Diatomologica: annotated diatom micrographs*. Königste In: Koeltz Scientific, 1998. v. 5.

METZELTIN, D.; LANGE-BERTALOT, H. **Tropical Diatoms of South America II**. In: LANGE-BERTALOT, H. *Iconographia Diatomologica: annotated diatom micrographs*. A.R.G. Gantner Verlag K.G, 2007. v. 18.

MONIZ, M.B.J.; KACZMARSKA, I. Barcoding of diatoms: Nuclear encoded ITS revisited. **Protist**, v. 161, p. 7-34, 2010.

MOREIRA-FILHO, H.; FERNANDES, E.C. Nota preliminar sobre as Bacillariophyceae (diatomáceas) da baía de Guaratuba, Paraná. **Tribuna Farmacêutica**, v. 26, p. 81-87, 1958.

MOREIRA-FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I. M. Avaliação taxonômica e ecológica das diatomáceas (Bacillariophyceae) epifitas em algas pluricelulares obtidas nos

litorais dos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v. 47, n. 1-2, p. 1-17, 1981.

NEWALL, P.; WALSH, C.J. Response of epilithic diatom assemblages to urbanization influences. **Hydrobiologia**, v. 532, p. 53-67, 2005.

PAPPAS J.L.; KOCIOLEK J.P.; STOERMER E.F. Quantitative morphometric methods in diatom research. **Nova Hedwigia**, v. 143, p. 281-306, 2014.

PASSY, S.I. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. **Aquatic Botany**, v. 86, p. 171-178, 2007.

PATRICK, R.; REIMER, C. W. **The diatoms of the United States**: exclusive of Alaska and Hawaii. Philadelphia, The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, v. 1, 1966.

POTAPOVA, M.; HAMILTON, P.B. Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 561-575, 2007.

POULÍČKOVÁ, A.; NEUSTUPA, J.; ŠPAČKOVÁ, J.; ŠKALOU, P. Distribution of epipellic diatoms in artificial fishponds along environmental and spatial gradients. **Hydrobiologia**, v. 624, p. 81-90, 2008.

POULÍČKOVÁ, A.; VESELÁ, J.; NEUSTUPA, J.; ŠKALOU, P. Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. **Protist**, v. 161, p. 353-369, 2010.

POULÍČKOVÁ, A.; DVOŘÁK, P.; MAZALOVÁ, P.; HAŠLER, P. Epipellic microphototrophs: an overlooked assemblage in lake ecosystems. **Freshwater Science**, v. 33, p. 513-523, 2014.

RIMET, F.; CHAUMEIL, P.; KECK, F.; KERMARREC, L.; VASSELON, V.; KAHLERT, M.; FRANC, A.; BOUCHEZ, A. R-Syst::diatom: an open-access and curated barcoding database for diatoms and freshwater monitoring. **Database**, p. 1-21, 2016.

ROUND, F.E.; CRAWFORD, R.M.; MANN, D.G. **The diatoms: biology and morphology of the genera**. New York: Cambridge University Press, 670p.; 1990.

SILVA, W.J.; JAHN, R.; MENEZES, M. Diatoms from Brazil: the taxa recorded by Christian Gottfried Ehrenberg. **Phytokeys**, v. 18, p. 19-37, 2012.

SIMONSEN, R. The diatom plankton of Indian Ocean Expedition of R/V "Meteor", 1964-65 Meteor Forschungsergebnisse. **Reihe D-Biologie**, v. 19, p. 1-66, 1974.

STERN, R.F.; HORAK, A.; ANDREW, R.L.; COFFROTH, M.A.; ANDERSEN, R.A.; KÜPPER, F.C.; JAMESON, I.; HOPPENRATH, M.; VÉRON, B.; KASAI, F.; BRAND, J.; JAMES, E.R.; KEELING, P. Environmental Barcoding Reveals Massive Dinoflagellate Diversity in Marine Environments. **PlosOne**, v. 5, 2010.

STOERMER, E.F.; JULIUS, M.L. Centric diatoms. *In*: SECKBACH, J.; KOCIOLEK, J.P. **The diatom world**. Springer, New York, 19^o ed, p. 559-594. 2011.

TAN, X.; SHELDON, F.; BUNN, S.E.; ZHANG, Q. Using diatoms indices for water quality assessment in a subtropical river, China. **Environment Science and Pollution Research International**, v. 20, n. 6, p. 4164-4175. 2013.

THERIOT, E.C.; ASHWORTH, M.P.; RUCK, E.; NAKOV, T.; JANSEN, R.K. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. **Plant Ecology and Evolution**, v. 143, p. 278-296, 2010.

TORRISI, M.; DELL'UOMO, A. Biological monitoring of some Apennine rivers (central Italy) using the diatom-based Eutrophication/Pollution Index (EPI-D) compared to other European diatom indices. **Diatom Research**, v. 21, p. 159-174, 2006.

TREMARIN, P.; FREIRE, E.; BERTOLLI, L.; LUDWIG, T.A.V. Catálogo das diatomáceas (Ochrophyta-Diatomeae) continentais do estado do Paraná. **Iheringia**, Série Botânica, v.64, n.2, p. 79-107, 2009.

URBÁNKOVA, P.; VESELÁ, J. DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). **Nova Hedwigia**, v. 142, p. 147-162, 2013.

VANORMELINGEN, P.; CHEPURNOV, V.A.; MANN, D.G.; COUSIN, S.; VYVERMAN, W. Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta). **European Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 61-79, 2007.

VANORMELINGEN, P.; CHEPURNOV, V.A.; MANN, D.G.; SABBE, K.; VYVERMAN, W. Genetic Divergence and Reproductive Barriers among Morphologically Heterogeneous Sympatric Clones of *Eunotia bilunaris Sensu Lato* (Bacillariophyta). **Protist**, v. 159, n. 1, p. 73-90, 2008.

VILMI, A.; KARJALAINEN, S.M.; LANDEIRO, V.L.; HEINO, J. Freshwater diatoms as environmental indicators: evaluating the effects of eutrophication using species morphology and biological indices. **Environmental Monitoring and Assessment**, p. 187-243, 2015.

VON STOSCH, H.A.; FECHER, K. „Internalthecae“ of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. **Journal of Phycology**, v. 15, p. 233-243, 1979.

WALSH, G.; WEPENER, V. The influence of land use on water quality and diatom community structures in urban and agriculturally stressed rivers. **Water**, v. 35, p. 579-594, 2009.

WETZEL, R. G. **Limnology**. 2. ed. Philadelphia: Sanders College, 1983. 767p.

ZILLER, S.; MONTESANTO, B. Phytobenthos (diatoms) and Water Frame Directive implementation: the case of two Mediterranean rivers in Greece. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 13, p. 128-138, 2004.

ZOU, S.; BAO, Y.; WU, X.; WANG, C. DNA Barcoding Diatoms From China With Multiple Genes. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 1-14, 2016.