

SILVIA SUSANNE MELCHER

**Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias
potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*,
Aphanizomenon e *Raphidiopsis* (Nostocales)**

SÃO PAULO

2007

SILVIA SUSANNE MELCHER

**Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias
potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*,
Aphanizomenon e *Raphidiopsis* (Nostocales)**

**Tese apresentada ao Instituto de
Botânica da Secretaria do Meio
Ambiente do Estado de São
Paulo como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título
de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na área
de Plantas Avasculares e Fungos
em Análises Ambientais.**

ORIENTADORA: Dra. Célia Leite Sant'Anna

CO-ORIENTADORA: Dra. Marli de Fátima Fiore

SÃO PAULO

2007

Agradecimentos

Os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

À Dra. Célia Leite Sant'Anna, pela confiança e generosa acolhida como sua aluna;

À Dra. Marli de Fátima Fiore, pela co-orientação e inteira disponibilidade do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/ESALQ/USP;

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, pelo inestimável auxílio na realização dos bioensaios, pela dedicação, amizade e precioso senso de humor;

À doutoranda Caroline Pamplona da Silva, do CENA/ESALQ/USP, pelo empenho no seqüenciamento genético das linhagens, um agradecimento muito especial;

A todas as pesquisadoras da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica, Dra. Maria Tereza de Paiva Azevedo, Dra. Andréa Tucci, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Mutuê Toyota Fujii, Dra. Nair Yokoya e Dra. Silvia Maria Pita de Beauclair Guimarães, pelas valiosas contribuições e auxílio, em especial à Andreinha, pela ajuda estatística, mas sobretudo pela alegre companhia, amizade e carinho;

À Dra. Marisa Rangel, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan de São Paulo, pela contribuição nos bioensaios;

Ao doutorando Rodrigo Burbarelli Carminatti, pela paciente colaboração nas extrações;

Ao Danilo Giroldo, pós-doutorando do Departamento de Ciências Morfo-Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, pelo envio de linhagem, interesse e instigante troca de idéias;

A todos os pesquisadores estrangeiros que enviaram literatura, em especial à Elisa Zapomelovska, que teve a gentileza de traduzir especialmente parte de sua dissertação do tcheco para o inglês;

Aos estudantes da Seção de Ficologia, Dani, Regina, Marcina, Kleber Renan, Luciano, Aline, Carol, Valéria, Mariana, Fernanda, Camila Dogo, Camila Malone, Marisinha, Raquel, pelo companheirismo e amizade. Um agradecimento especial à Diógina, pelo empréstimo de literatura, e à Lilian, companheira das viagens a Piracicaba e dos seqüenciamentos;

A todos os funcionários da Seção de Ficologia, Manuel, Elisete, Neide, Zé Domingos e Neuzete, pela companhia e sempre boa-vontade em ajudar.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Melcher, Silvia Susanne

M517e Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (Nostocales) / Silvia Susanne Melcher -- São Paulo, 2008.

204 p. Il.

Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008

Bibliografia.

1. Algas. 2. Cianobactérias. 3. Taxonomia. I. Título

CDU 582.26

INTRODUÇÃO GERAL

1. Caracterização das Cianobactérias

As cianobactérias (Cyanobacteria, também chamadas de Cyanophyceae, Cyanophyta, Cyanoprokaryota, Cyanochloronta, Cyanophycophyta, algas azuis ou algas verde-azuladas) figuram entre os primeiros organismos existentes sobre a Terra (Schopf 2000). Pertencem ao domínio *Bacteria* e representam os mais antigos organismos oxifotoautotróficos, tendo desempenhado papel determinante na evolução da atmosfera oxidante de nosso planeta (Hayes 1983, Dismukes et al. 2001), bem como na constituição de deposições calcáreas na forma de estromatólitos. Sua existência inequívoca a 2700 M.a.a. foi comprovada através da datação de fósseis moleculares de biolipídeos (Brocks et al. 1999) e pela análise de seqüências gênicas (Hedges et al. 2001). Embora os microfósseis australianos com idade de 3475 M.a. tenham sido reinterpretados como artefatos secundários de carbono amorfo originados pela devitrificação sucessiva de quartzo carbonáceo (Brasier et al. 2004), a origem biogênica de outros microfósseis e de vários estromatólitos igualmente antigos parece ter sido confirmada, apontando para a origem do grupo há cerca de 3500 M.a. (Schopf 2006).

De grande plasticidade ecológica, as cianobactérias crescem em quase todos os ambientes aquáticos e terrestres e possuem distribuição ubíqua no planeta, sendo talvez os organismos fotossintéticos com maior amplitude de habitats (Badger et al. 2006). São capazes de medrar em ambientes extremos como fontes termais, desertos quentes e gelados, e toleram temperaturas de até 73⁰C, pH até 4,0 (Ward & Castenholz 2000) e salinidade de 200 ppm ou mais (Oren 2000). Possuem mecanismos de proteção a elevada incidência de radiação solar nociva (UVB e UVC), ao mesmo tempo em que estão adaptadas a baixas intensidades luminosas. Seu modo de vida pode ser planctônico, bentônico, epi, peri ou endofítico, epi, peri ou endolítico, epi ou endozóico, subaéreo ou

edáfico. Todavia, os habitats preferenciais são límnicos ou marinhos, em condições neutro-alcalinas (pH de 7 a 9) e temperaturas entre 15 e 30⁰ C (Mur *et al.* 1999). Constituem ainda numerosas simbioses com algas, plantas superiores, fungos, protistas e animais (Osborne & Bergman 2002). A presença de clorofila e conseqüente capacidade fotossintética de algas e plantas são atribuídas a um evento endossimbiótico entre uma cianobactéria e um protista, tendo a posterior “domesticação” da cianobactéria dado origem à organela (Cavallier-Smith 1982, Bhattacharya 2004).

O sucesso ecológico das cianobactérias decorre de sua longa história evolutiva e de suas características fisiológicas e estruturais. Entre estas, destaca-se a eficiente cinética de captação de carbono e nutrientes, a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico e a presença de aerótopos em muitas espécies planctônicas. A fixação do nitrogênio é realizada em condições anóxicas, seja em células especializadas (heterocitos) dotadas de paredes espessadas e fotossistema II (produtor de oxigênio) suprimido, seja através da separação temporal entre respiração e fixação de nitrogênio. A ausência de oxigênio é requisito para a atividade da nitrogenase, enzima que reduz o dinitrogênio atmosférico a amônia. Os aerótopos, vesículas gasosas delimitadas por membrana protéica reunidas no interior da célula, conferem a inúmeras cianobactérias de vida aquática mobilidade vertical na coluna d’água. Permitem, assim, a exploração de recursos nutricionais depositados nas camadas mais profundas dos corpos d’água e favorecem a permanência nos estratos com condições ideais de irradiância, evitando dano celular por fotooxidação (Walsby 1994).

Como procariontes autotróficos oxigênicos, as cianobactérias possuem os fotossistemas I e II. O doador de prótons usual é a água, que pode ser substituída pelo sulfeto de hidrogênio em condições anaeróbias (Cohen *et al.* 1975, Cohen *et al.* 1986). Alguns representantes são heterótrofos facultativos em condições de ausência de luz (Stal & Moezelaar 1997).

O sistema fotossintético é constituído pela clorofila *a*, c-ficoeritrina, alofocianina e c-ficocianina, localizadas em ficobilissomos hemidiscóides ou hemisféricos sobre tilacóides. Estes constituem prolongamentos da membrana plasmática, não são envoltos por membranas próprias e estão geralmente distribuídos na periferia celular. Além das ficobilinas, ainda ocorrem como pigmentos acessórios as xantofilas e carotenos. As proclorófitas caracterizam-se pela ausência de ficobilinas e pela produção de clorofila *b* adicionalmente à clorofila *a*. Na última década, a produção de clorofila *d* foi descrita em uma espécie de cianobactéria (*Acaryochloris marina*) em associação com ascídias (Miyashita *et al.* 1997) e epífita sobre Rhodophyta (Murakami 2004), bem como em uma linhagem não identificada de vida livre (Miller *et al.* 2004).

Em função da constituição de sua parede celular, as cianobactérias são consideradas bactérias gram negativas. Seu envoltório, porém, é consideravelmente mais espesso que o das demais bactérias assim classificadas. Exibe grande variação de acordo com a espécie e pode atingir até 700 nm de espessura (Hoiczyk *et al.* 2000). Sua estrutura é complexa e compõe-se de uma bicamada lipídica externa com carotenóides (protetores de estresse oxidativo), do sáculo de mureína constituído de peptidoglicanas, do espaço periplásmico e da membrana plasmática (Dignum *et al.* 2005). Externamente à parede celular, muitos representantes do grupo secretam polissacarídeos que formam desde uma mucilagem parcialmente hidrossolúvel fracamente associada às células (Drews & Weckesser 1982) até uma bainha de estrutura fibrilar (por vezes cristalina) fortemente unida às mesmas (Hoiczyk, 1998). Sua função é associada à proteção contra dessecação, agentes antibacterianos (antibióticos, fagos, anticorpos, surfactantes etc) e predação por protozoários. Além disso, os exopolissacarídeos ainda exercem atividade aderente em substratos sólidos, floculam partículas de argila em águas turvas, aumentando a disponibilidade luminosa, captam elementos essenciais como ferro e cálcio e imobilizam

metais deletérios aos organismos (De Phillipis & Vicenzini 1998). Ao menos alguns gêneros de cianobactérias possuem a capacidade de produzir celulose. A função desta relaciona-se com a proteção contra o dessecação, ligação com o organismo simbiote nas relações simbióticas e motilidade dos hormogônios (Nobles *et al.* 2001). Em virtude da composição e organização estrutural diferenciada da parede celular, alguns autores posicionam as cianobactérias entre as bactérias gram positivas ou ainda em um terceiro grupo filogeneticamente diverso (Stewart *et al.* 2006).

O material de reserva é o amido das cianofíceas (molécula semelhante ao glicogênio) e a cianoficina (copolímero de ácido aspártico e arginina). O primeiro deposita-se em grânulos entre os tilacóides. A cianoficina armazena nitrogênio e forma inclusões na célula. Nos heterocitos, deposita-se nos nódulos polares (Sherman *et al.* 2000). Além dessas moléculas de reserva, as células podem apresentar grânulos de volutina (polifosfato) para armazenamento do fósforo e carboxisomos para armazenamento da RuBisCo (Ribulose 1-5-bisfosfato carboxilase oxigenase), a enzima primária para a fixação fotossintética do dióxido de carbono. Os grânulos de polifosfato contêm, ainda, potássio, cálcio e magnésio e podem acumular metais (Kronkamp 1987).

A diversidade morfológica do grupo é grande e o hábito abrange formas unicelulares, coloniais, filamentosas ou pseudoparenquimatosas, de dimensões micro a macroscópicas. Nas colônias, o arranjo das células ou filamentos pode ser irregular, radial ou em planos ordenados. O diâmetro celular varia de 0,5 µm em *Prochlorococcus*, o menor organismo fotossintético conhecido (Dufresne *et al.* 2003), a mais de 100 µm (Adams & Duggan 1999). Embora jamais formem estruturas propulsoras como flagelos, algumas espécies possuem a capacidade de movimento deslizante proporcionada pela extrusão de mucilagem ou pela atividade de estruturas especiais (pili do tipo 4 ou estruturas locomotoras semelhantes a cílios) (Magar & Pedley 2005).

A reprodução é exclusivamente assexuada e ocorre por simples divisão celular, pela produção de baeócitos ou exocitos (antigamente denominados de endósporos e exósporos, respectivamente), pela fragmentação do tricoma ou pela formação de hormocistos ou hormogônios (fragmentos de tricoma móveis).

O material genético está contido no centroplasma em um ou vários cromossomos circulares e em cada célula podem ocorrer de uma a múltiplas cópias do genoma (Iteman *et al.* 2002, Hu *et al.* 2007). Plasmídeos são relatados para várias espécies (Goyal 1992), bem como a existência de fenômenos de transferência genética horizontal (conjugação, transformação e transdução) (Barker *et.al.*2000a, Beiko *et al.* 2005, Zeidner *et al.* 2005).

Alguns grupos possuem células de resistência com parede espessada e grande acúmulo de nutrientes em seu interior, denominadas de acinetos. A produção de acinetos parece ser induzida principalmente por amplas flutuações de temperatura (Moore *et al.* 2005).

2. Importância

2.1. Importância Ecológica

As cianobactérias possuem grande importância ecológica, uma vez que são co-responsáveis pela produção primária e pela fertilidade dos corpos aquáticos e dos solos (Rai 1990). Sobretudo nas águas pobres em nutrientes de grande parte dos oceanos e de alguns grandes lagos, as picocianobactérias contribuem com porção expressiva da assimilação fotossintética do carbono (Whitton & Potts 2000). São componentes da rede trófica, sendo ativamente consumidas e metabolizadas por consumidores primários (Iturriaga & Mitchel 1986). Nos oceanos, representam ainda parcela significativa dos organismos diazotróficos e desempenham importante papel na síntese de nitrogênio

orgânico (Capone 1999).

Em ambientes terrestres, as cianobactérias são, muitas vezes, pioneiras na colonização de rochas e solos inóspitos. Exercem função chave na manutenção da integridade do solo de regiões áridas e semi-áridas, bem como na fertilidade de terrenos agrícolas (Whitton & Potts 2000).

A ampla variedade de relações simbióticas estabelecidas inclui a associação a diatomáceas, esponjas, ascídias e dinoflagelados em ambientes marinhos (Carpenter 2002), bem como a associação a ascomicetos para a formação de líquens, a briófitas, pteridófitas, cicadáceas e angiospermas em ambientes terrestres (Meeks 1988).

2.2. Importância Econômica

Em decorrência da produção de vasta gama de metabólitos secundários bioativos, as cianobactérias possuem enorme potencial de aplicação na área médica. Apresentam-se promissoras no desenvolvimento de drogas anti-tumorais, assim como para o tratamento da asma, artrite, diabetes, malária, herpes e outras moléstias prevalentes na população humana (Skulberg 2000, Rao *et al.* 2007). Podem igualmente ser utilizadas como herbicidas, antifúngicos e como fertilizantes agrícolas. No cultivo de arroz, a biofertilização com cianobactérias eleva consideravelmente a produção do cereal, pois contribui com substâncias promotoras do crescimento, aumenta a disponibilidade de fósforo, diminui o dano causado pelo sulfeto aos brotos da planta e previne o crescimento de invasoras (Jha & Prasad 2006).

A importância econômica das cianobactérias relaciona-se ainda com o seu potencial de biorremediação (Gardea-Torresdey *et al.* 1998), de tratamento de efluentes (Talbot *et al.* 1990) e alto valor nutricional. Seu uso como fonte alimentar humana remonta aos astecas e foi documentada pelos cronistas de Cortez à época da conquista espanhola do México

(Farrar 1966). Várias populações nativas - africanas, asiáticas e sul-americanas - incluem cianobactérias, sobretudo dos gêneros *Nostoc* e *Spirulina*, em seu cardápio (Johnston 1970). Modernamente, *Spirulina* e *Aphanizomenon* são cultivados em larga escala para a produção de complementos alimentares de alto teor protéico e vitamínico (Belay *et al.* 1993).

2.3. Importância Sanitária

Nas últimas décadas, os problemas decorrentes da eutrofização dos corpos aquáticos têm se acentuado, com conseqüências sanitárias desastrosas. As cianobactérias desempenham papel decisivo neste contexto, uma vez que, em ambientes eutrofizados e hipertrofizados, sobretudo de água doce, representam os organismos dominantes, formando florações freqüentes (Paerl 1996). Colocam em risco a qualidade da água destinada ao consumo humano, através da liberação de compostos de propriedades organolépticas que conferem gosto e odor às águas de abastecimento. Além disso, produzem metabólitos de efeito nocivo sobre outros procariotos e/ou eucariotos, incluindo lipopolissacarídeos, alcalóides, policetonas e oligopeptídeos tóxicos (Namikoshi & Rinehart 1997). Há numerosos relatos de morte de animais selvagens e de criação pelo consumo de água contendo cianobactérias e vários episódios de comprometimento da saúde humana, alguns deles com vítimas fatais (Codd *et al.* 2005). Seu desenvolvimento em massa diminui, ainda, a qualidade cênica de águas recreacionais (Cronberg & Annadotter 2006).

3. Classificação das Cianobactérias

A classificação dos organismos atualmente conhecidos como cianobactérias iniciou-se em 1753 com o sistema binomial de Lineu. Hoje é amplamente aceito que o *Byssus filamentis plumosis natantibus* descrito pelo naturalista sueco em seu *Species Plantarum*

corresponde à espécie *Aphanizomenon flos-aquae* (Willén & Willén 1999). Ainda no final do século XVIII e ao longo de todo o século XIX, inúmeros representantes do grupo foram descritos e agrupados sob várias denominações. Em 1833, Wallroth reuniu as cianobactérias sob a designação de Myxophyceae. Em 1843, Kützing atribuiu ao grupo o nome de Gloeosipheae, alterado por Rabenhorst para Phycochromophyceae em 1865 (Kirchner 1898). Em 1874, Sachs cunhou o termo Cyanophyceae, prevalente até hoje entre muitos botânicos. Cohn, em 1879, reconhecendo a semelhança com as bactérias, denominou a classe de Schyzophyceae (Drews 2000).

Na segunda metade do século XIX, as cianobactérias – tratadas como plantas pela maioria dos autores - passaram a ter sua nomenclatura regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Bornet & Flahault (1886-1888) e Gomont (1892) elaboraram as primeiras monografias taxonômicas amplas das formas filamentosas heterocitadas e não-heterocitadas, respectivamente, demarcando o início da nomenclatura válida para o grupo. O primeiro sistema abrangendo todas as formas filamentosas e cocóides conhecidas até então foi elaborado por Kirchner em 1898. A classificação tradicional realizada no esteio desses autores baseia-se primordialmente em observações morfológicas de material oriundo da natureza. Em 1932, Geitler revisou e ampliou o sistema de Kirchner, classificando cerca de 1300 espécies em 145 gêneros pertencentes a vinte famílias de três ordens. Ao longo de todo o século XX, revisões ou sistemas semelhantes foram propostos por, entre outros, Frémy (1929, 1930), Elenkin (1936, 1938, 1949), Huber-Pestalozzi (1938), Fritsch (1945), Hollerbach *et al.* (1953), Desikachary (1959, 1973), Starmach (1966), Golubic (1967), Kondratieva (1968) e Bourrelly (1970) (Anagnostidis & Komárek 1985). Todos estes autores se apóiam sobre características fenotípicas e obedecem às regras taxonômicas estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

Entre 1956 e 1981, Drouet e Daily reduziram drasticamente o número de táxons para

62 espécies distribuídas em inicialmente 24 (Anagnostidis & Komárek 1985) e, por fim, somente 9 gêneros (Litvaitis 2002). Em seu sistema, os autores aplicaram o conceito de ecofenos (ou ecótipos) sobre os cerca de 32000 espécimes analisados, considerando a variação morfológica como mera expressão diferenciada de um mesmo genótipo em resposta às condições ambientais. O sistema de Drouet, porém, nunca obteve aceitação ampla e caiu em desuso por desconsiderar a ampla variabilidade morfológica e genética existente entre as cianobactérias.

A classificação botânica do grupo foi revisada por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis & Komárek 1985, Komárek & Anagnostidis 1989, 1990, 1999, 2005). Baseando-se sobretudo em características morfológicas do talo, modo de divisão celular e produção de células diferenciadas, os autores dividiram o grupo em quatro ordens: Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales e Stigonematales (tabela 1), contendo cerca de 2800 espécies.

Embora a semelhança morfológica e estrutural com as bactérias tenha sido observada ainda no século XIX, não foi antes de 1970 que as cianobactérias foram, do ponto de vista nomenclatural, efetivamente tratadas como procariontes. A partir de 1971, Stanier e colaboradores, baseando-se em estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares, classificaram alguns representantes como bactérias (Stanier *et al.* 1971). Em 1978, a nomenclatura do grupo passou a ser regida também pelo Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (Oren 2004). Com base em culturas puras axênicas, Rippka *et al.* (1979) elaboraram um sistema de classificação posteriormente adotado e modificado pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Staley & Holt 1989, Boone & Castenholz 2001), constituído de cinco subseções (tabela 1).

Tabela 1. Sistemas de Classificação Botânico e Bacteriológico das Cianobactérias

Classificação Botânica (Anagnostidis & Komárek 1990, Komárek & Anagnostidis 1989, 1999, 2005)	Classificação Bacteriológica (Boone & Castenholz 2001)
ORDEM CHROOCOCCALES Organismos unicelulares, coloniais ou pseudofilamentosos. Reprodução por divisão celular, fissão binária ou fissão múltipla. 11 famílias.	SUBSEÇÃO I Organismos unicelulares ou coloniais. Reprodução por fissão binária simétrica ou assimétrica em 1,2 ou 3 planos ou por “budding”. SUBSEÇÃO II Organismos unicelulares ou coloniais. Reprodução também por fissão múltipla interna, com produção de células-filhas menores que a célula-mãe (baeócitos).
ORDEM OSCILLATORIALES Organismos filamentosos homocitados. 6 famílias.	SUBSEÇÃO III Organismos filamentosos unisseriados que sofrem fissão binária em um plano perpendicular ao eixo longitudinal. Somente células vegetativas (em alguns casos, necrídios). Alguns membros com ramificações falsas. Presença de heterótrofos facultativos.
ORDEM NOSTOCALES Organismos filamentosos heterocitados, produção facultativa de acinetos, divisão celular exclusivamente perpendicular ao eixo longitudinal do tricoma, ramificação ausente ou falsa. 6 famílias.	SUBSEÇÃO IV Organismos filamentosos unisseriados que sofrem fissão binária em um plano perpendicular ao eixo longitudinal (às vezes, ocorrência de ramificação falsa). Presença de heterocitos e, frequentemente, acinetos. Às vezes, hormogônios.
ORDEM STIGONEMATALES Organismos filamentosos, uni ou multisseriados, com ramificação verdadeira e produção facultativa de heterocitos. 8 famílias.	SUBSEÇÃO V Organismos filamentosos multisseriados com divisão celular transversal, oblíqua ou longitudinal – ramificações falsas e verdadeiras. Heterocitos, acinetos.

Nos últimos anos, em consequência do acúmulo de informações moleculares, os sistemas de classificação tradicionais têm sido modificados, acompanhando a tendência da sistemática bacteriana em reunir as características morfológicas, ecológicas, bioquímicas, ultraestruturais e genéticas em sistemas de classificação polifásicos. Resultado recente dos esforços de conciliação das abordagens botânica e bacteriológica é o sistema elaborado em 2005 por Hoffmann *et al.*, baseado em semelhança genética (principalmente do 16S RNAr), características morfológicas e arranjo dos tilacóides. O sistema introduz

modificações sobretudo nos níveis hierárquicos mais elevados, reagrupando as ordens e famílias em quatro subclasses (tabela 2).

Tabela 2. Sistema de classificação de Hoffmann *et al.* (2005)

Classificação Polifásica

(Hoffmann, Komárek & Kastovsky 2005)

SUBCLASSE GLOEOBACTEROPHYCIDAE nom. prov.– Cocóides sem tilacóides

Ordem GLOEOBACTERALES – 1 família.

SUBCLASSE SYNECHOCOCCOPHYCIDAE nom. prov. - Tilacóides paralelos à superfície celular.

Ordem SYNECHOCOCCALES - Organismos unicelulares ou coloniais. 4 famílias.

Ordem PSEUDANABAENALES - Organismos filamentosos estreitos. 2 famílias.

SUBCLASSE OSCILLATORIOPHYCIDAE nom. prov. – Tilacóides radiais.

Ordem CHROOCOCCALES - Organismos unicelulares ou coloniais. 11 famílias.

Ordem OSCILLATORIALES - Organismos filamentosos grandes. 5 famílias.

SUBCLASSE NOSTOCOPHYCIDAE nom. prov. - Filamentosas heterocitadas, arranjo irregular dos tilacóides.

Ordem NOSTOCALES – 10 famílias.

4. Filogenia de Cianobactérias

A reconstrução das relações de parentesco entre as cianobactérias e destas com outros procariontes sofreu enorme avanço com a introdução das técnicas de biologia molecular. Diferentes marcadores moleculares são úteis para o estabelecimento de filogenias: ácidos graxos, quinonas, carotenóides, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros (Willmote 1994). Inúmeros genes têm sido seqüenciados, destacando-se o *rrs*, codificador para a subunidade menor (16S) do RNA ribossômico. Willmote (1994) resume as propriedades que tornam este gene profícuo para os estudos evolutivos: universalidade, constância funcional, combinação de regiões conservadas com regiões variáveis e número apropriado de unidades informativas (cerca de 1500 nucleotídeos). Além disso, as seqüências são facilmente alinháveis, sendo que, para as cianobactérias, já há mais de 6000 depositadas em bancos de dados públicos (Wacklin 2006).

De acordo com a análise das seqüências do RNAr 16S, as cianobactérias formam um agrupamento monofilético de eubactérias (Woese 1987). As ordens tradicionais

heterocitadas (Nostocales e Stigonematales) constituem um clado monofilético (Giovannoni *et al.* 1988) que mistura representantes de ambas (Gugger & Hoffmann 2004), enquanto as demais ordens botânicas são polifiléticas (Litvaitis 2002). A polifilia das formas filamentosas homocitadas aponta para vários eventos independentes de surgimento da morfologia filamentosa ao longo da história evolutiva do grupo (Tomitani *et al.* 2006).

Todavia, ainda não é possível estabelecer relações filogenéticas definitivas, sobretudo nos níveis hierárquicos mais baixos, uma vez que os resultados dos estudos são dinâmicos, alterando-se de acordo com o gene seqüenciado (Castenholz 2001).

Atualmente, existem 16 genomas de cianobactérias inteiramente seqüenciados e mais de 20 em andamento, fornecendo material para futuros reagrupamentos dos integrantes do grupo (Liang *et al.* 2006).

5. Classificação e caracterização dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis*

Os gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* são classificados na ordem Nostocales, família Nostocaceae (Komárek & Anagnostidis 1989). A família agrupa organismos unisseriados, isopolares, sem ramificação (a divisão celular ocorre exclusivamente no plano perpendicular ao eixo longitudinal do tricoma) e sem zonas meristemáticas, cuja reprodução se dá pela fragmentação do tricoma ou pela produção de hormogônios e/ou hormocistos. A produção de células especializadas (heterocitos e acinetos) pode estar ausente nos táxons derivados (Komárek & Anagnostidis 1989). A tabela 3 lista as características diacríticas dos três gêneros.

Tabela 3. Características diacríticas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Komárek & Anagnostidis, 1989)

Gênero	Estrutura do tricoma	Origem e posição dos heterocitos	Tipo de desenvolvimento do acineto	Características diacríticas adicionais
<i>Aphanizomenon</i> Morren ex Bornet et Flahault 1888	subsimétrica	intercalar	paraheterocítico ou paraheterocítico-distante	mucilagem difluente; tricomas solitários ou coloniais
<i>Cylindrospermopsis</i> Seenayya & Subba Raju 1972	subsimétrica	terminal	paraheterocítico	tricomas solitários
<i>Raphidiopsis</i> Fritsch & Rich 1929	subsimétrica	ausente	solitário	tricomas solitários

Aphanizomenon Morren ex Bornet et Flahault 1888 ocorre em águas doces e salobras de todo o mundo (Barker *et al.* 2000b), com 17 espécies conhecidas (Komárek & Hauer 2004). A espécie-tipo, *Aphanizomenon flos-aquae*, descrita inicialmente como *Byssus flos-aquae* por Lineu em 1753, foi validamente publicada por Bornet e Flahault em 1888. Para tal, os autores basearam-se no nome genérico criado por Morren em 1838 e na combinação *Aphanizomenon flos-aquae* criada por Ralfs em 1850 para o tipo (Komárek 1958).

Foi relatada para o gênero a produção de saxitoxinas, anatoxinas e cilindrospermopsinas (Sivonen & Jones 1999, Codd *et al.* 2005, Falconer 2005).

No Brasil, o gênero ocorre com as seguintes espécies: *Aphanizomenon manguinii* (Komárek *et al.* 2001), *A. volzii* (Jardim & Viana 2003), *A. gracile* e *A. tropicalis* (Sant'Anna *et al.* 2007). A espécie *A. issatschenkoi* citada por Costa *et al.* (2006) é atualmente classificada como *Cuspidothrix issatschenkoi* (Rajaniemi *et al.* 2005).

Cylindrospermopsis (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972 é um gênero

primariamente pantropical com irradiação recente a latitudes temperadas (Padisák 1996, Briand 2004). Sua espécie tipo, *Cylindrospermopsis raciborskii*, foi descrita em 1912 a partir de material coletado por Woloszyńska em Java, Indonésia, e classificado inicialmente como *Anabaena raciborskii*, seção *Anabaenopsis* (Komarková 1998). Em 1923, Miller criou o gênero *Anabaenopsis*, caracterizado pelos heterocitos secundariamente terminais formados a partir da divisão desigual de duas células intercalares contíguas e posterior quebra do tricoma. No mesmo ano, Elenkin transferiu *Anabaena raciborskii* para o novo gênero, apesar do modo especial de desenvolvimento do heterocito pela divisão desigual de célula apical e pela posição primariamente terminal da célula fixadora de nitrogênio (Jeeji-Bai *et al.* 1980, Komárek & Komárková 2003). Seenayya & Subba Raju (1972) consideraram esta característica distintiva de um novo gênero, *Cylindrospermopsis*, na época monoespecífico. Desde então, nove novas espécies foram descritas (Komárek & Hauer 2004), algumas delas de importância sanitária crescente, em função da formação de florações, de sua expansão crescente por todo o mundo (Padisák 1997, Wiedner 2007) e da capacidade de produção de alcalóides neuro e citotóxicos (saxitoxinas e cilindrospermopsinas) (Sivonen & Jones 1999, Codd *et al.* 2005, Falconer 2005). No Brasil, a espécie *C. raciborskii* possui ampla distribuição, sendo encontrada em corpos d'água de todo o país. Além desta espécie, ainda é registrada no país a ocorrência de *C. phillipinensis*, *C. catemaco* (Huszar *et al.* 2004) e *C. acuminato crispus* (Couté & Bouvy 2004).

Raphidiopsis Fritsch & Rich 1929, embora considerado um gênero raro, possui ampla distribuição geográfica no mundo, tendo sido documentado sobretudo na China e no Brasil (Falconer 2005). Foram descritas, até o presente momento, seis espécies, sendo duas produtoras de neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxinas) (Namikoshi *et al.* 2003, 2004, Watanabe *et al.* 2003, Mohamed 2007, Yunes *et al.* 2007) e uma de citotoxinas

(cilindrospermopsina e deoxicilindrospermopsina) (Li *et al.* 2001). Em nosso país, ocorrem as espécies *R. brookii*, *R. curvata* e *R. mediterranea*.

6. Referências bibliográficas

- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1985. Modern approach to the classification of the Cyanophytes 1-Introduction. *Algological Studies* : 247-345.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1988. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 3 - Oscillatoriales. *Algological Studies* 50-53:327-472.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1990.. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 5 - Stigonematales. *Algological Studies* 79:1-73.
- Azevedo, S. M. F. O. & Carmouse, J. P.** 1994. Une Mortalité de Poissons Dans Une Lagune Tropicale (Brésil) Durant Une Période de Dominance de Cyanophycées, Coincidence Ou Conséquence? *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 25(3):265-272.
- Babica, P.** Environmental and ecotoxicological aspects of cyanobacterial toxins – microcystins. Dissertation thesis Masaryk University, Faculty of Science, Brno República Tcheca.
- Badger, M., Price, G.D. & Long, B.M.** 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany* (57): 249–265.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J. S., Codd, G. A. & Pflugmacher, S.** 2004. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya-Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research* 26(8): 925-935.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. & Sukenik, A.** 1997. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology* 33:613–616.
- Barker, G.L., Handley, B.A., Vacharapiyasophon, P., Stevens, J.R. & Hayes, P.K.** 2000a. Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology* 146: 2865–2875.
- Barker, G. L. A., Konopka, A., Handley, B. A. & Hayes, P. K.** 2000b. Genetic variation in *Aphanizomenon* (cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. *Journal of Phycology* 36: 947-950.
- Beiko, R.G., Harlow, T.J. & Ragan, M.A.** 2005. Highways of gene sharing in

- prokaryotes. Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 14332–14337.
- Bhattacharya, D., Yoon, H. S., & Hackett, J.D.** 2004. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* 26: 50-60.
- Börner, T. & Dittmann, E.** 2005. Molecular biology of cyanobacterial toxins. Genetic basis of microcystin production. *In*: J. Huisman, H.C.P. Matthijs & P. Visser (eds). Harmful Cyanobacteria. Aquatic Ecology Series. Vol. 3. Springer, Dordrecht, pp. 25-40.
- Boone, D. R., & Castenholz, R. W.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York, USA, Springer-Verlag, 721 pp.
- Brasier, M., Green, O., Lindsay, J. & Steele, A.** 2004 Earth's oldest (ca. 3.5 Ga) fossils and the "Early Eden Hypothesis": questioning the evidence. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 34: 257–269.
- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C. Dufour, P.** 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming? *Journal of Phycology* 40(2): 231–238.
- Brittain, S., Mohamed, Z. A., Wang, J., Lehmann, V. K. B., Carmichael, W. W. & Rinehart, K. L.** 2000. Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon* 38(12):1759-1771.
- Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., & Summons, R. E.** 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285: 1033-1036.
- Capone, D.G.** 1999. Marine N₂ fixation: What's the fuss? *Current Opinions in Microbiology* 4: 341-348.
- Carpenter, E.J.** 2002. Marine Cyanobacterial Symbioses. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 102B(1):15–18.
- Castenholz, R. W.** 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. *In* D.W. Boone & R.W. Castenholz (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed., vol. 1, New York: Springer. pp. 473–487.
- Cavalier-Smith, T.** 1982. The origin of plastids. *Biological Journal of the Linnean Society* 17:289-306.
- Codd, G.A., Lindsey, J., Young, F.M., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S.** 2005. Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. *In* Harmful Cyanobacteria. Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M. (eds.) Dordrecht , The Netherlands : Springer, pp. 1-23.

- Cohen, Y., Padan, E. & Shilo, M.** 1975. Facultative Anoxygenic Photosynthesis in the Cyanobacterium *Oscillatoria*. *Journal of Bacteriology* 123(3):855-861.
- Cohen, Y., Jörgensen, B.B., Revsbeck, N.P. & Poplawski, R.** 1986. Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 51(2):398-407.
- Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M. & Chellappa, N.T.** 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 66(1b):211-219.
- Couté, A. & Bouvy, M.** 2004. A new species of the genus *Cylindrospermopsis*, *C. acuminato-crispa* spec. nova (Cyanophyceae, Nostocales) from Ingazeira reservoir, Northeast Brazil. *Algological Studies* 113:57-72.
- Cronberg, G. & Annadotter, H.** 2006. Manual on aquatic cyanobacteria, a photo guide and a synopsis of their toxicology. International Society for the Study of Harmful Algae and United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation, Paris. 106pp.
- De Philippis, R. & Vincenzini, M.** 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 151-175.
- Dignum, M., Matthijs, H.C.P., Pel, R., Laanbroek, H.J. & Mur, L.R.** 2005. Nutrient limitation to freshwater cyanobacteria-tools to monitor phosphorus limitation at individual level. In *Harmful Cyanobacteria*. Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M. (eds.) Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 65-86.
- Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., Dasgupta, J. & Tyryshkin, A. M.** 2001. The Origin of Atmospheric Oxygen on Earth: the Innovation of Oxygenic Photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5): 2170-2175.
- Domingos P., Rubim, T.K., Molica, R.J.R., Azevedo, S.M.F.O. & Carmichael W.W.** 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. *Environmental Toxicology* 14:31-35.
- Drews, G. & Weckesser, J.** 1982. Function, structure and composition of cell walls and external layers. In N.G. Carr & B.A. Whitton (eds.) *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp 333-357.
- Drews, G.** 2000. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiology Reviews* 24(3):225-249.

- Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Dupras, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., de Marsac, N.T., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I. & Hess, W.R.** 2003. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototropic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10020–10025.
- Falconer, I.R.** 2005. *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 279p.
- Farrar, W. V.** 1966. Tecuitlatl; a glimpse of Aztec food technology. *Nature* 211(5047): 341-342.
- Feil, E.J.** 2004. Small change: keeping pace with microevolution. *Nature Reviews Microbiology* 2:483-495.
- Fergusson, K.M. & Saint, C.P.** 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18(2):120-125.
- Gardea-Torresdey, J.L., Arenas, J.L., Francisco, N.M.C., Tiemann, K.J. & Webb, R.** 1998. Ability of immobilized cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains. *The Journal of Hazardous Substance Research* 1:1–18.
- Geitler, L.** 1932. Cyanophyceae. In L. Rabenhorst (ed.) *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Band. 14. Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig. 1196 pp.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., & Pace, N. R.** 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* 170: 3584-3592.
- Goyal, D.** 1992 A simplified method for screening and characterization of plasmid DNA in cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 15(1): 7-15.
- Gugger, M. & Hoffmann, L.** 2004. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 349–357.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M. & Terao, K.** 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32:73–84.

- Hayes, J. M.** 1983. Geochemical evidence bearing on the origin of aerobiosis, a speculative interpretation. *In* J. William Schopf (ed.) The Earth's earliest biosphere: its origin and evolution, Princeton University Press, pp 291-301.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T., Jackson, A.B. & Falconer, I.R.** 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1292-1295.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. & Falconer, I.R.** 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 314-346.
- Hedges, S. B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D.Y., Thompson, A. S., & Watanabe, H.** 2001. A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 1: 4.
- Henriksen, P.** 2001. Toxic freshwater cyanobacteria in Denmark. *In*: Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. I. Chorus (ed.) Berlin, SpringerVerlag: 49-56.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kaštovský, J.** 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state 2004. *Algological Studies* 117:95-115.
- Hoiczyk, E. & Hansel, A.** 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* 182:1191-1199.
- Hoiczyk, E.** 1998. Structural and Biochemical Analysis of the Sheath of *Phormidium uncinatum*. *Journal of Bacteriology*:3923–3932.
- Hu, B., Yang, G., Zhao, W., Zhang, Y. & Zhao, J.** 2007. MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Molecular Microbiology* 63(6):1640-1652.
- Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas P. & Falconer, I.R.** 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research* 472(1-2):155-161.
- Iteman, I., Rippka, R., Marsac, I.T. & Herdman, M.** 2002. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* 148:481-496.

- Iturriaga, R. & Mitchell, B.G.** 1986. Chroococcoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. *Marine Ecology Progress Series* 28:291-297.
- Jardim, F.A. & Viana, T. H.** 2003. Análise de algas : cianobactérias e cianotoxinas como parâmetros de controle do tratamento de água para abastecimento. *In* AIDIS Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Saneamento Ambiental: Ética e Responsabilidade Social. Joinville, ABES, p.1-13.
- Jeeji-Bai, N.** 1980. Taxonomic studies on the genus *Anabaenopsis*. *Taxonomy of Algae*: 115-142.
- Jha, M.N. & Prasad, A.N.** 2006. Efficacy of new inexpensive cyanobacterial biofertilizer including its shelf-life. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:73–79.
- Johnston, H.W.** 1970. The Biological and Economic Importance of Algae, Part 3. Edible Algae of Fresh and Brackish Waters. *Tuatara* 18(1): 19-35.
- Jungblut, A.D. & Neilan, B.A.** 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins microcystin and nodularin synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 185:107-114.
- Kaya, K.** 1996. Toxicology of microcystins. *In* M. Watanabe, K. Harada, W. Carmichael, & H. Fujiki (eds.) *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton. pp. 175–202.
- Kellmann, R., Mills, T. & Neilan, B.A.** 2006. Functional modelling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *Journal of Molecular Evolution* 64(3):267-280.
- Kirchner, O.** 1898. Schizophyceae. *In* A. Engler and K. Prantl (eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten*. Volume I, 1A. , p. 4-92.
- Kiss, T., Vehovszky, A., Hiripi, L., Kovacs, A. & Vöröš, L.** 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology* 131C(2):167-176.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 4 - Nostocales. *Algological Studies* 56:247-345.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. *In* Süßwasserflora von Mitteleuropa. H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). vol. 19. Gustav Fischer, Stuttgart. pp. 1-545.

- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 2005. Cyanoprokaryota. 2.Teil: Oscillatoriales. Mnchen, Germany, Elsevier GmbH, 759 pp.
- Komárek, J. & Hauer, T.** 2004. CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. 20.04.2007. Available online at <http://www.cyanodb.cz>.
- Komárek, J., Azevedo, S.M.F.O., Domingos, P., Komárková, J. & Tichy, M.** 2001. Background of the Caruaru tragedy; a case taxonomic study of toxic cyanobacteria. *Algological Studies* 103:9-29.
- Kronkamp, J.** 1987. Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 457-465.
- Liang, C., Zhao, F., Wei, W., Wen, Z. & Qin, S.** 2006. Carotenoid Biosynthesis in Cyanobacteria: Structural and Evolutionary Scenarios Based on Comparative Genomics. *International Journal of Biological Sciences* 2(4):197-207.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D. & Watanabe, M.M.** 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37:1121-1126.
- Litvaitis, M.K.** 2002. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468(1-3):135-145.
- Magar, V & Pedeley, T. J.** 2005 Average nutrient uptake by a self-propelled unsteady squirmer. *Journal of Fluid Mechanics* 539: 93–112.
- Meeks, J.C.** 1988. Symbiotic associations. *In* *Methods in Enzymology*, Vol. 167, Cyanobacteria (A. Glazer and L. Packer, eds.), pp. 113-121. Academic Press, New York.
- Miller, S.R., Augustine, S., Olson, T.L., Blankenship, R.E. Selker, J. & Wood, A.M.** 2004. Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small subunit rRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(3): 850-855.
- Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemot, H., Chihara, M. & Miyach, S.** 1997. Pigment Composition of a Novel Oxygenic Photosynthetic Prokaryote Containing Chlorophyll d as the Major Chlorophyll. *Plant and Cell Physiology* 38(3): 274-281.
- Mohamed, Z. A.** 2007. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS*

Microbiology Ecology 59 (3), 749–761.

- Moore, D., O'Donohue, M., Shaw, G. & Critchley, C.** Potential triggers for akinete differentiation in an Australian strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205/1). *Hydrobiologia* 506(1):175-180.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. & Mimuro, M.** 2004. Chlorophyll d in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303:1633.
- Namikoshi, M. & Rinehart, K.L.** 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17:373-384.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H. & Oishi, S.** 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42, 533–538.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D.K. & Brown Jr., R. M.** 2001. Cellulose in Cyanobacteria. Origin of Vascular Plant Cellulose Synthase? *Plant Physiology* 127:529–542.
- Oberholster, P. J.** 2006. Monitoring toxicity in raw water of the La Cache Poudre River and Sheldon Lake, Colorado, USA, using biomarkers and molecular marker technology. Tese de doutorado, Pretoria University, África do Sul.
- Ohta, T., Nishiwaki, R., Yatsunami, J., Komori, A., Suganuma, M. & Fujiki, H.** 1992. Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 13:2443-2447.
- Oren, A.** 2000. Salts and Brines. *In* The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. B. A. Whitton, & M. Potts (eds). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 281-306.
- Oren, A.** 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1895–1902.
- Osborne, B. & Bergman, B.** 2002. Commentaries on cyanobacterial symbioses: introduction and overview. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 102B(1):1-2.
- Paerl, H. W.** 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35 (Suppl. 6):25–35.
- Patockaa, J. & Stredab, L.** 2002. Brief Review of natural nonprotein neurotoxins. *The ASA Newsletter* 74:16-18.

- Preussel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I. & Fastner, J.** 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47:156-162.
- Rai, A.M.** 1990. Handbook of symbiotic cyanobacteria. CRC-PRESS, 253P. Boca-Raton, Florida.
- Rajaniemi, P., Komárek, J., Willame, R., Hrouzek, P., Kastovská, K., Hoffmann, L. & Sivonen, K.** 2005. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies* 117:371–91.
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T. & Sivonen, K.** 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America* 101:568-573.
- Rao, M., Malhotra, S., Fatma, T. & Rattan, A.** 2007. Antimycobacterial Activity from Cyanobacterial Extracts and Phytochemical Screening of Methanol Extract of *Hapalosiphon*. *Pharmaceutical Biology* 45 (2): 88 – 93.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y.** 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111:1-61.
- Runnegar, M.T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Ge, J. L. & Lu, S.C.** 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201(1):235-41.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E. & Kaplan, A.** 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9(4): 965-970.
- Schopf, W. J.** 2000. The fossil record: Tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *In* The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. B. A. Whitton, & M. Potts (eds). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 13-35.
- Schopf, W. J.** 2006. The First Billion Years: When Did Life Emerge? *Elements* 2:229-233.
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W. & Shaw, G.** 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei*

(Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck

- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K. & Moore, M.R.** 1999. Blooms of cylindrospermopsin containing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environmental Toxicology* 14: 167-177.
- Sherman, D.M., Tucker, D. & Sherman, L.A.** 2000. Heterocyst development and localization of cyanophycin in N₂-fixing cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 36 (5): 932–941.
- Sivonen, K. & Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. In toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, UK: WHO, E & FN Spon, pp. 41–112.
- Skulberg, O. M.** 1996. Toxins produced by cyanophytes in Norwegian inland waters – health and environment. In Låg J (ed.), Chemical data as a basis of geomedical investigations. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 197–216.
- Skulberg, O.M.** 2000. Microalgae as a source of bioactive chemicals—experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12:341-348.
- Stal, L.J. & Moezelaar, R.** 1997. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 21(2): 179–211.
- Staley, J.T. & Holt, J.G.** (eds.). 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 3: Archaeobacteria, Cyanobacteria, and the remaining Gram-negatives. Baltimore: Williams & Wilkins, Co.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Review* 35:171-205.
- Stewart, I., Schluter, P.J. & Shaw, G.R.** 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 5:7, 23pp.
- Talbot, P., Lencki, R.W. & de la Niiue, J.** 1990. Carbon dioxide absorption characterization of a bioreactor for biomass production of *Phormidium bohneri*: a comparative study of three types of diffuser. *Journal of Applied Phycology* 2: 341–350.

- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M. & Ohno, T.** 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular, phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5442-5447.
- Van den Hoek, D.G., Mann, H. & Jahns, M.** 1995. *Algae: introduction to phycology*. Cambridge University Press. 623p.
- Wacklin, P.** 2006. Biodiversity and Phylogeny of Planktic Cyanobacteria in Temperate Freshwater Lakes. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki, Finland. Academic Dissertation.
- Ward, D.M., and Castenholz, R.W.** 2000. Cyanobacteria in geothermal habitats. *In* The ecology of cyanobacteria. B.A. Whitton and M. Potts (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 37–59.
- Walsby, A.E.** 1994. Gas Vesicles. *Microbiological Reviews* 144(58):94-144.
- Watanabe, M.F., Tsujimura, S., Oishi, S., Niki, T. & Namikoshi, M.** 2003. Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa, Japan. *Phycologia* 42(4), 364-369.
- Welker, M. & Döhren, H.** 2006. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 530-563.
- Whitton, B. & Potts, M.** 2000. Introduction to the Cyanobacteria. *In* : Whitton, B. A. & Potts, M. (editors) 2000. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, pp. 1–11. Edited by B. A. Whitton & M. Potts. Dordrecht: Kluwer Academic. pp. 1-11.
- Willén, T. & Willén, E.** 1999. *Byssus flos-aquae* L. *Algological Studies* 94: 377-382.
- Williams, C.D., Chapman, A.D., Flewelling, L., Pawlowicz, M., Carmichael, W.W., & Burns, J.** 2001. Assessment of Cyanotoxins in Florida’s Surface Waters. Final Report to the Florida Harmful Algal Bloom Task Force. St. Johns River Water Management District.
- Wilmotte, A.** 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, *In* D. A. Bryant (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 1–25.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.

- Yunes, J.S., Rocha, S. de la, Girollo, D., Melcher, S.S., Sant'Anna, C.L., Silveiras, B., Comin, R., Bicho, M.S. & Vieira, A.A.H.** 2007. Production of saxitoxins and extracellular carbohydrates by a subtropical cyanobacteria *Raphidiopsis brookii*: first report of saxitoxin and gonyautoxin production. Anais do Simpósio Iupac, p. 122.
- Zeidner, G., Bielawski, J.P., Shmoish, M., Scanlan, D.J., Sabehi, G. & Beja, O.** 2005. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. Environmental Microbiology 7: 1505–1513.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral definir as relações morfológicas e filogenéticas existentes entre cianobactérias heterocitadas potencialmente tóxicas dos gêneros *Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault, *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju e *Raphidiopsis* Fritsch & Rich (Nostocaceae, Nostocales).

2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

1. Descrever e comparar dez linhagens brasileiras de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* segundo critérios morfológicos e morfométricos;
2. Determinar as relações filogenéticas das dez linhagens com base em seqüências do gene *rrs* (codificador da subunidade menor (16S) do RNA ribossômico (RNAr));
3. Verificar a produção de neuro ou citotoxinas pelas dez linhagens estudadas.

CAPÍTULO 1

**Estudos morfológicos de linhagens brasileiras de cianobactérias
potencialmente tóxicas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e
Raphidiopsis (Nostocales)**

ABSTRACT – (Morphological evaluation of Brazilian strains of potentially toxic Cyanobacteria from the genera *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales))

The potentially toxic cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 and *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) show great phenotypic plasticity and are quite frequently confounded in samples taken from nature. In studies conducted with cultured strains, their morphology is often very poorly described. The objective of the present study was to describe ten Brazilian strains of the three genera, in order to compare them under morphological and morphometric criteria. All the strains presented great morphological variation. Among the analysed variables, only the length/diameter ratio of the terminal cell was able to set apart the genus *Aphanizomenon* from the *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* complex. All further analysed variables showed discontinuities at subspecific level and were inadequate in circumscribe the genera. In two of the studied strains of *Aphanizomenon*, the diacritic features were not stable under reduced nitrogen availability, pointing to their dependence from environmental conditions.

KEY WORDS: Culture, morphometrics, phenotypic plasticity

RESUMO – (Estudos morfológicos de linhagens brasileiras de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales))

As cianobactérias heterocitadas dos gêneros potencialmente tóxicos *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 e *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) possuem ampla plasticidade fenotípica, sendo frequentemente confundidas em material da natureza. Em estudos com material cultivado, são pobremente descritas do ponto de vista morfológico. O objetivo do presente trabalho foi descrever dez linhagens brasileiras pertencentes aos três gêneros, a fim de compará-las segundo critérios morfológicos e morfométricos. Todas as linhagens apresentaram ampla variação morfológica. Das variáveis analisadas, somente a razão comprimento/diâmetro da célula apical mostrou-se adequada para separar o gênero *Aphanizomenon* do complexo *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*. Todas as demais variáveis analisadas mostraram-se inadequadas para a delimitação dos gêneros por apresentaram descontinuidade em nível subespecífico. Em duas das linhagens de *Aphanizomenon* estudadas, as características diacríticas do gênero não se mantiveram estáveis quando da redução da disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura, apontando para sua dependência de fatores ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura, morfometria, plasticidade fenotípica

1. Introdução

A elaboração de um sistema de classificação polifásico para as cianobactérias depende da reunião de informações morfológicas, ecofisiológicas, biogeográficas, bioquímicas, ultraestruturais e moleculares (Komárek 2006 a,b). Nesse contexto, a caracterização morfológica dos táxons constitui o ponto de partida para a construção de um sistema coerente, tanto do ponto de vista botânico, como do ponto de vista bacteriológico (Komárek 1994, Li *et al.* 2000a, Komárek 2006b). De uma perspectiva prática, apesar do enorme avanço das técnicas moleculares, a morfologia ainda fornece informações bastante úteis para a avaliação da variabilidade e diversidade das cianobactérias, único grupo procarionte que permite uma taxonomia baseada em caracteres morfológicos (Kováčik & Holecková 1984, Gautier *et al.* 2007). De modo geral, muitos dos agrupamentos resultantes da análise de seqüências gênicas, sobretudo do RNAr 16S, revelaram-se congruentes com os gêneros estabelecidos pelos métodos tradicionais (Komárek & Kastóvsky 2003, Komárek 2006 a,b). Entretanto, os gêneros clássicos freqüentemente apresentam grande heterogeneidade morfológica, o que dificulta a correta classificação das espécies (Bazzichelli & Abdelahad 1994, Komárek 2000, Rajaniemi *et al.* 2005a). As cianobactérias possuem ampla plasticidade fenotípica induzida por variabilidade ambiental (Anand 1988, Litvaitis 2002) e nem sempre as características diacríticas estão presentes nas populações naturais ou mantidas em cultura (Li *et al.* 1997). Assim, muitas vezes os estudos filogenéticos e toxicológicos são realizados em espécies ou linhagens pobremente descritas e incorretamente identificadas (Willmote & Herdman 2001, Li *et al.* 2000b, Li *et al.* 2003, Komárek 2006 b, Palinska *et al.* 2006). Komárek & Anagnostidis (1989) estimam em mais de 50% a proporção de linhagens mantidas em cultura com identificação incorreta. Por fim, a taxonomia polifásica ainda se apóia sobre o estudo de poucas linhagens e vários táxons têm posição sistemática incerta (Rajaniemi *et al.* 2005a). Deste

modo, a ampliação do conhecimento morfológico sobre os representantes do grupo é fundamental.

Nos últimos anos, as espécies pertencentes aos gêneros *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 e *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) têm sido objeto de intensa investigação ecofisiológica (Tóth & Padisák 1986, Présing *et al.* 1996, Padisák 1997, Istvanovics *et al.* 2000, Saker & Griffith 2000, Shafik *et al.* 2001, Briand *et al.* 2002, 2004, Moore *et al.* 2003, 2005, Spröber *et al.* 2003, Tucci & Sant' Anna 2003, Burford *et al.* 2006, Wiedner *et al.* 2007), toxicológica (Hawkins 1985, 1997, Ohtani 1992, Lagos *et al.* 1999, Norris *et al.* 1999, Saker & Eaglesham 1999, Saker & Griffiths 2000, Saker *et al.* 2004, Pomati *et al.* 2000, 2003, 2004a,b, Falconer & Humpage 2001, 2006, Li *et al.* 2001a,b, Saker & Neilan 2001, Kiss *et al.* 2002, Metcalf *et al.* 2002, Shen *et al.* 2002, Namikoshi *et al.* 2003, 2004, Saker *et al.* 2003, Bernard *et al.* 2003, Chen *et al.* 2003, Fastner *et al.* 2003, 2007, Castro *et al.* 2004, Nogueira *et al.* 2004, Dyble *et al.* 2006, Preussel *et al.*, 2006, Stewart *et al.* 2006, White *et al.* 2006) e molecular (Schembri *et al.* 2001, Wilson *et al.* 2000, Gugger *et al.* 2002, 2005, Dyble *et al.* 2002, Neilan *et al.* 2002, 2003, Chonudomkul *et al.* 2004, Rajaniemi *et al.* 2005 a,b, Valerio *et al.* 2005, Jungblut & Neilan 2006, Kellmann *et al.* 2006), em virtude de sua crescente dominância em corpos d'água eutrofizados, seu potencial tóxico e, no caso de *Cylindrospermopsis raciborskii*, rápida expansão geográfica em todo o mundo.

Com relação à morfologia de representantes dos três gêneros, grande parte das descrições está contida em trabalhos de cunho florístico e se baseia na análise de somente poucos exemplares. Alguns estudos específicos fornecem descrições mais detalhadas, apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Características morfológicas de *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972.

Tricomas	Morfologia das células vegetativas	Células terminais	Heterocitos	Acinetos	Reprodução	Referência
Livre-flutuantes, solitários; retos, curvos ou espiralados, em várias espécies estreitado em direção às extremidades; sem bainha. Isopolares (heteropolares nos tricomas com apenas um heterocito), subsimétricos, com ou sem constrictões.	Cilíndricas, forma de barril, geralmente bem mais longas que largas, verde-azulado pálido, amareladas ou verde-oliva, facultativamente com aerótopos.	Cônicas ou mais ou menos pontiagudas.	Exclusivamente terminais, ovais, ovóides ou cônicos, às vezes levemente curvos ou em forma de gota, com um poro.	Elípticos ou cilíndricos, em espécimes espiralados em geral levemente recurvados.	Fragmentação do tricoma e ou acinetos.	Komárek & Komárková (2003)
Tricomas estreitos (<4 um) retos ou fracamente retorcidos. Sem hormogônios ou zonas estruturalmente diversas dos filamentos maduros.	Cilíndricas, com agrupamentos aleatórios de vesículas de gás.		Terminais, em uma ou ambas as extremidades dos tricomas. Cônicos a espadiformes.	Solitários, em pares ou cadeias curtas adjacentes aos ou pouco distantes dos heterocitos.		Castenholz (2001)
Planctônicos solitários; retos, levemente curvos ou espiralados, subsimétricos; com vesículas gasosas; sem envelope mucilaginoso.	Cilíndricas, com leve ou nenhuma constrição nos septos.	Extremidades atenuadas quando não há heterocitos.	Cônicos ou ovóides longos, sempre terminais em uma ou ambas as extremidades do tricoma.	Cilíndricos ou ovalados oblongos, solitários ou em pares, intercalares, paraheterocíticos.		Baker & Fabbro (1999)
Isopolares, solitários, retos ou espiralados, livre- flutuantes, cilíndricos ou levemente estreitados em ambas as extremidades. Semelhante ao gênero <i>Aphanizomenon</i> , do qual, contudo, difere pelo modo do desenvolvimento do heterocito.	—	—	Terminais, desenvolvimento em geral sucessivo.	Solitários, em pares ou em séries curtas. Estrutura subsimétrica semelhante a <i>Aphanizomenon</i> , cujos heterocitos, no entanto, são intercalares.		Komárková (1998)
Retos ou espiralados, estreitando levemente em direção às extremidades.	Cilíndricas com leve ou nenhuma constrição nos septos.	—	Sempre terminais. Desenvolvimento após quebra do tricoma.	Intercalares.		Seenayya et Subba Raju (1972)
Filamentos solitários, retos ou espiralados, livre-flutuantes, levemente estreitados e ambas as extremidades, sem bainha.	Cilíndricas, isodiamétricas ou mais curtas ou mais longas que largas, verde-azulado pálido ou amareladas, com aerótopos.	Estreitadas, cônicas ou pontiagudas.	Heterocitos ovóides ou cônicos, com um poro, terminais.	Ovais a cilíndricos com apices arredondados, de 1 a 3 levemente distantes dos heterocitos.		Komárek (1992)

Tabela 2: Características morfológicas de *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888.

Tricomas	Morfologia das células vegetativas	Células terminais	Heterocitos	Acinetos	Referência
Livre-flutuantes, solitários, em algumas espécies reunidos em fascículos de tricomas paralelos formando colônias micro ou macroscópicas (até 2 cm). Tricomas retos, levemente retorcidos ou helicoidais, cilíndricos ou estreitados em direção aos ápices, isopolares, sempre subsimétricos, com ou sem constrictões, sem bainha, várias espécies com mucilagem fina e difluente, incolor.	Cilíndricas ou em forma de barril, mais ou menos isodiamétricas ou levemente mais largas que longas ou longas que largas, em geral com aerótopos, algumas espécies obrigatoriamente sem aerótopos.	Longas, cilíndricas e hialinas, obtusas ou arredondadas na extremidade ou Intensamente alongadas, estreitadas, vacuolizadas a inteiramente hialinas, pontiagudas ou cônicas, levemente alongadas e às vezes com pequenos vacúolos.	1 a 3, distantes, intercalares, subsimétricos em relação ao tricoma, em forma de barril ou cilíndricos com extremidades arredondadas ou obtusas.	Em geral ovais a cilíndricos com pólos arredondados, raramente esféricos. Desenvolvimento paraheterocítico. Solitários ou em 2 a 3 próximos aos heterocitos ou pouco distantes a eles, em posição assimétrica no tricoma.	Komárek (1992)

Tabela 3: Características morfológicas de *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929.

Tricomas	Morfologia das células vegetativas	Células terminais	Heterocitos	Acinetos	Reprodução	Referência
Livre-flutuantes, solitários, sem bainha ou envelope mucilaginoso, retos, curvos ou espiralados, isopolares, uniseriados, em geral levemente atenuados em direção a ambas as extremidades, constrictos ou não.	Em forma de barril, às vezes levemente alongadas nas extremidades do tricoma, com ou sem aerótopos.	Cônico-arredondadas ou acuminadas.	Ausentes.	No meio do tricoma, isolados ou em série.	—	Komárek (1992)

Os trabalhos mais extensivamente dedicados à análise morfológica e morfométrica de *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* são os de Singh (1962), Horecká & Komárek (1979), Komárek (1984), Hindák (2000), Komárek & Kling (1991), Komárková (1998), Komárková-Legnerová & Tavera (1996), Saker *et al.* (1999), Saker & Neilan (2001), Komárková *et al.* (1999), Komárek & Komárková (2003), Shafik (2003), Shafik *et al.* (2003), Moore *et al.* 2004 para *Cylindrospermopsis*; Horecká & Komárek (1979), Kovácik & Holecková (1984), Komárek & Kovácik (1989), Watanabe (1991), Bazzichelli & Abdelahad (1994), Kling *et al.* (1994), Li *et al.* (2000b), Li *et al.* (2003), Hindák *et al.* (2000), Rajaniemi *et al.* (2005a,b) para *Aphanizomenon*, e Rao (1957), Hill (1970), Hill *et al.* (1972), Cronberg (1973) e Hindák *et al.* (1987) para *Raphidiopsis*. As tabelas 4, 5 e 6 resumem os principais resultados destes trabalhos. Sua análise permite algumas conclusões:

1. *Cylindrospermopsis raciborskii* (tabela 5), espécie-tipo do gênero, possui grande plasticidade fenotípica, o que dificulta sua correta identificação (Padisák 1997, Komárková *et al.* 1999, Hawkins 2001; Komárek & Komárková 2003, Moore *et al.* 2004). É uma espécie freqüentemente identificada de modo equivocado, tendo sido classificada no passado como *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Raphidiopsis* (Komárková 1998), inclusive no Brasil (Branco & Senna 1991).
2. *Aphanizomenon* (tabela 4) também apresenta amplo espectro de variabilidade morfológica, assemelhando-se a *Anabaena* em um extremo morfológico (Komárek & Kovácik 1989, Hindák 2000, Gkelis *et al.* 2005) e a *Cylindrospermopsis* no outro (Komárková 1998). Além disso, *Aphanizomenon flos-aquae* tropical é, muito provavelmente, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cronberg 1978) ou *Raphidiopsis* sp. (Komárková 1998). Em nível infra-genérico, populações ou linhagens isoladas de *Aphanizomenon* sp. ou *Aphanizomenon issatschenkoi* (esta última reclassificada como

Cuspidothrix issatschenkoi por Rajaniemi *et al.* 2005a) foram erroneamente classificadas como *A. flos-aquae* (Li *et al.* 2000b, Li *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2004). Wood (2007) relata a confusão com a identificação incorreta da espécie potencialmente tóxica *A. issatschenkoi* (*Cuspidothrix issatschenkoi*), inicialmente identificada como *Raphidiopsis mediterranea* na Nova Zelândia.

3. *Raphidiopsis* (tabela 6) difere de *Cylindrospermopsis* basicamente pela ausência de heterocitos, esta ausência, todavia, não foi definitivamente comprovada por experimentos (Komárková 1998). A morfologia do gênero permanece pouco conhecida e o mesmo é interpretado como representando um estágio no ciclo de vida de *Cylindrospermopsis* (Komárek & Komárková 2003, Padisák, comunicação pessoal), o que seria corroborado pela freqüente ocorrência simultânea de ambos (Hill 1970). Sua real posição taxonômica ainda é obscura (Li *et al.* 2004).

Tabela 4: Principais estudos morfológicos e morfométricos do gênero *Aphanizomenon*.

Referência	Objetivos	Resultados
Horecká & Komárek (1979)	Estudo da posição taxonômica de três espécies de Nostocales da República Tcheca	Transferência de <i>Anabaena aphanizomenoides</i> para <i>Aphanizomenon</i> ; Descrição de <i>Aphanizomenon tropicalis</i> Horecká & Komárek sp. nov.; Verificação da semelhança entre <i>Aphanizomenon</i> e <i>Raphidiopsis</i> .
Kováčik & Holecková (1984)	Avaliação biométrica de populações de <i>Aphanizomenon</i> da República Tcheca	Apresentação das medidas das populações estudadas.
Komárek & Kováčik (1989)	Estudo da diversidade morfológica de populações de <i>Aphanizomenon</i> da República Tcheca.	Estabelecimento de 4 grupos morfológicos, descrição de nova espécie (<i>Aphanizomenon flexuosum</i> Komárek & Kováčik sp. nov.); Semelhança de <i>Anabaena bergii</i> com <i>Aphanizomenon</i> .
Watanabe (1991)	Estudos morfológicos de espécies de <i>Aphanizomenon</i> do Japão.	Descrição de nova espécie (<i>Aphanizomenon paraflexuosum</i> Watanabe sp. nov.)
Hindák (2000)	Estudo da diversidade morfológica de 4 espécies de <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> e discussão das características diagnósticas dos dois gêneros.	Posição taxonômica incerta de espécies de <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i> , em virtude de sua grande semelhança morfológica.
Bazzichelli & Abdelahad (1994)	Caracterização morfométrica de duas populações de <i>Aphanizomenon</i> de lagos italianos.	Dificuldade de classificar as populações; Proposição do conceito de “espécie estatística” para populações levemente desviantes de uma espécie descrita.
Kling <i>et al.</i> (1994)	Estudos morfológicos e morfométricos de população de Nostocaceae do Canadá.	Descrição de nova espécie (<i>Aphanizomenon schindleri</i> sp. nov. Kling, Findlay & Komárek).
Li <i>et al.</i> (2000b)	Estudos morfológicos e seqüenciamento do gene do RNAr 16S em linhagem neurotóxica de <i>Aphanizomenon</i> isolada nos Estados Unidos.	Reclassificação da linhagem de <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> para <i>Aphanizomenon</i> sp.
Li <i>et al.</i> (2003)	Estudos morfológicos e seqüenciamento do gene do RNAr 16S em linhagem neurotóxica de <i>Aphanizomenon</i> isolada em Portugal.	Reclassificação da linhagem de <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> para <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> .
Gkelis <i>et al.</i> (2005)	Estudo de populações de <i>A. ovalisporum</i> em dois lagos gregos.	Caracterização morfométrica das populações estudadas.
Rajaniemi <i>et al.</i> (2005a,b)	Estudos morfológicos e moleculares de 4 gêneros de Nostocales, inclusive <i>Aphanizomenon</i> .	Agrupamento de <i>Aphanizomenon</i> com representantes planctônicos de <i>Anabaena</i> ; Criação de novo gênero <i>Cuspidothrix</i> com base em critérios citomorfológicos e reclassificação de 4 espécies de <i>Aphanizomenon</i> .
Willame <i>et al.</i> (2006)	Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias planctônicas da Bélgica e Luxemburgo, incluindo várias espécies de <i>Aphanizomenon</i> .	Agrupamento de <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i> por critérios moleculares, distinção morfológica de diferentes espécies de <i>Aphanizomenon</i> em função de dimensões celulares e morfologia da célula apical.

Tabela 5: Principais estudos morfológicos e morfométricos do gênero *Cylindrospermopsis*.

Referência	Objetivos	Resultados
Singh (1962)	Descrição da variabilidade morfológica de <i>Anabaenopsis raciborskii</i> .	Ocorrência sazonal e semelhança morfológica de algumas variantes com <i>Raphidiopsis indica</i> e com espécies de <i>Cylindrospermum</i> .
Horecká & Komárek (1979)	Classificação de população tcheca de <i>C. raciborskii</i> com base em estudos morfológicos.	
Komárek (1984)	Comparação de <i>Cylindrospermopsis</i> retos (<i>C. raciborskii</i>) e curvos (<i>C. phillipinensis</i>) amostrados em Cuba.	
Hindák (1988)	Estudos morfológicos de populações de <i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaenopsis</i> da Eslováquia.	
Komárek & Kling (1991)	Estudos morfológicos de populações africanas de <i>Cylindrospermopsis</i> .	Descrição de 2 espécies novas
Komárková-Legnerová & Taver (1996)	Morfologia de <i>C. phillipinensis</i> .	
Komárková (1998)	Revisão crítica do gênero.	Apresentação das características diagnósticas de sete espécies.
Komárková <i>et al.</i> (1999)	Estudos morfológicos de <i>C. raciborskii</i> na Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil.	Distinção de quatro tipos morfológicos e detecção de formas anômalas.
Saker & Neilan (2001)	Morfologia de isolados australianos de <i>C. raciborski</i> .	
Saker <i>et al.</i> (1999)	Descrição de 2 morfotipos (reto e curvo) de <i>C. raciborskii</i> coletados na Austrália.	Estabilidade morfológica dos dois morfotipos apesar da semelhança genética (16S rRNA) 99,8% entre eles.
Komárek & Komárková (2003)	Revisão da diversidade fenotípica do gênero.	Resumo das características morfológicas do gênero.
Shafik <i>et al.</i> (2003)	Características morfológicas de <i>Cylindrospermopsis</i> em cultura.	
Moore <i>et al.</i> (2004)	Modificações morfológicas ocorridas em <i>C. raciborskii</i> durante a germinação de acinetos.	
Hong <i>et al.</i> 2006	Estudo de populações de <i>C. raciborskii</i> de dois lagos norte-americanos.	Caracterização morfométrica das populações estudadas.

Tabela 6: Principais estudos morfológicos e morfométricos do gênero *Raphidiopsis*.

Referência	Objetivos	Resultados
Rao (1957)	Estudo morfológico de população de <i>Raphidiopsis</i> da Índia.	Chave de identificação para as três espécies conhecidas.
Hill (1970)	Estudo do gênero no lago Minnesota.	Descrição de nova espécie.
Hill <i>et al.</i> (1972)	Variação morfológica de <i>Raphidiopsis</i> no lago Minnesota.	Descrição de nova variedade.
Cronberg (1973)	Estudo morfológico e morfométrico de <i>Raphidiopsis</i> em lago da Suécia.	
Hindák <i>et al.</i> (1987)	Estudo da variação morfológica em <i>R. curvata</i> .	

2. Objetivos

Diante do acima exposto e considerando a importância da adequada caracterização morfológica dos táxons de cianobactérias, o presente estudo tem como objetivo descrever e comparar as características morfológicas e morfométricas de dez linhagens brasileiras de Nostocales pertencentes a três gêneros potencialmente tóxicos: *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault e *Raphidiopsis* Fritsch & Rich. Duas dessas linhagens foram previamente estudadas por vários autores, sobretudo quanto a aspectos toxicológicos e moleculares (Lagos *et al.* 1999, Wilson *et al.* 2000, Dyble *et al.* 2002, Neilan *et al.* 2003, Pomati *et al.* 2003, 2004a,b, Castro *et al.* 2004, Jungblut & Neilan 2006, Kellmann *et al.* 2006), contudo sua identificação e nomenclatura não são uniformes nas diferentes publicações (Tabela 7).

3. Material e Métodos

A tabela 7 apresenta as dez linhagens estudadas. Nove pertencem à Coleção de Culturas de Algas e Cianobactérias do Instituto de Botânica da Secretaria de Estado de Meio Ambiente de São Paulo e uma provem da Coleção de Culturas do Departamento de Ciências Morfo-Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul.

Tabela 7. Linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas.

Táxon putativo	Linhagem	Origem Geográfica	Ano de isolamento
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 649	Lagoa Manguaba, Maceió, AL (9°40'S 35°48' W)	
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 704	Maceió, AL	
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	SPC 640	Lago Bolonha, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Aphanizomenon gracile</i>	SPC 668	Reservatório Água Preta, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 811	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2000
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 820	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2001
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 339 ^a	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 969	Represa do Broa, São Carlos, SP (22°12'S 47°52'W)	2004
<i>Raphidiopsis brookii</i>	SPC 338 ^b	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Raphidiopsis brookii</i> .	FURG CY 001	Lago dos Biguás, Rio Grande, RS (32°04' S 52°10' W)	2004

^a denominada de *Braz2* por Dyble *et al.* 2002 e Neilan *et al.* 2003; *brazil 2* por Wilson *et al.* 2000; e como *T3* por Lagos *et al.* 1999, Pomati *et al.* 2004, Jungblut & Neilan 2006 e Kellmann *et al.* 2006.

^b classificada como *Cylindrospermopsis raciborskii* por Lagos *et al.* 1999 e Castro *et al.* 2004 e denominada de *T2* pelos primeiros autores e de *C10* por Castro *et al.* 2004.

As linhagens, uniespecíficas e não-axênicas, foram cultivadas em triplicata em câmara de cultura, nas seguintes condições, doravante referidas como normais:

- Meio ASM1 líquido (tabela 8),
- Temperatura de $23,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- Irradiância de $40 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes,
- Fotoper\u00edodo de 14 hs.

Para sua manuten\u00e7\u00e3o, as culturas foram repicadas em meio de cultura fresco a cada 5 semanas, em câmara de fluxo laminar, sendo inspecionadas sob microsc\u00f3pio \u00f3tico a cada 5 dias para verificar sua integridade e aus\u00eancia de contamina\u00e7\u00e3o por organismos eucariontes e por outras cianobact\u00e9rias.

As amostras para as an\u00e1lises morfol\u00f3gicas e morfom\u00e9tricas foram colhidas entre a terceira e quinta semana da inocula\u00e7\u00e3o em meio fresco.

A fim de induzir a produ\u00e7\u00e3o de heterocitos, as linhagens foram crescidas, em triplicata, em meio ASM1 com redu\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio a 75%, 50% e 25%, respectivamente (tabela 8), fotoper\u00edodo de 10 hs. e com as demais condi\u00e7\u00f5es mantidas.

Por fim, com o intuito de estimular a produ\u00e7\u00e3o de acinetos e verificar sua posi\u00e7\u00e3o relativa aos heterocitos, as linhagens foram crescidas, em triplicata, sob condi\u00e7\u00f5es de temperatura reduzida ($15,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$), segundo Shafik *et al.* 2003, em meio ASM1 e ASM1 modificado segundo a tabela 8, fotoper\u00edodo de 10hs e irradi\u00e2ncia mantida como acima.

Foram realizadas observa\u00e7\u00f5es morfol\u00f3gicas sob microsc\u00f3pio binocular Zeiss Axioskop-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com contraste de fases e câmara digital Sony Cybershot acoplada. As seguintes caracter\u00edsticas morfol\u00f3gicas foram observadas e registradas fotograficamente:

1. Morfologia geral do tricoma,
2. Estrutura do tricoma (posição das células especializadas),
3. Morfologia das células apicais,
4. Morfologia das células vegetativas.

A presença de bainha mucilaginosa foi testada através de adição de nanquim ao material estudado.

Tabela 8: Meio de cultura ASM1 (Gorham *et al.* 1964) e ASM1 modificado.

Solução estoque A	Concentração do meio normal (ASM1) (g L ⁻¹)	Fonte N a 75% (ASM1 modificado) (g L ⁻¹)	Fonte N a 50% (ASM1 modificado) (g L ⁻¹)	Fonte N a 25% (ASM1 modificado) (g L ⁻¹)
Na NO ₃	$1,70.10^{-1}$	$1,275.10^{-1}$	$0,85.10^{-1}$	$0,425.10^{-1}$
MgCl ₂ .6H ₂ O	$4,10.10^{-2}$	$4,10.10^{-2}$	$4,10.10^{-2}$	$4,10.10^{-2}$
MgSO ₄ .7H ₂ O	$4,90.10^{-2}$	$4,90.10^{-2}$	$4,90.10^{-2}$	$4,90.10^{-2}$
CaCl ₂ .2H ₂ O	$2,90.10^{-2}$	$2,90.10^{-2}$	$2,90.10^{-2}$	$2,90.10^{-2}$
Solução estoque B				
K ₂ HPO ₄	$1,70.10^{-2}$	$1,70.10^{-2}$	$1,70.10^{-2}$	$1,70.10^{-2}$
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	$3,60.10^{-2}$	$3,60.10^{-2}$	$3,60.10^{-2}$	$3,60.10^{-2}$
Solução estoque C				
H ₃ BO ₃	$2,48.10^{-3}$	$2,48.10^{-3}$	$2,48.10^{-3}$	$2,48.10^{-3}$
MnCl ₂ .4H ₂ O	$1,39.10^{-3}$	$1,39.10^{-3}$	$1,39.10^{-3}$	$1,39.10^{-3}$
FeCl ₃ .6H ₂ O	$1,08.10^{-3}$	$1,08.10^{-3}$	$1,08.10^{-3}$	$1,08.10^{-3}$
ZnCl ₂	$3,35.10^{-4}$	$3,35.10^{-4}$	$3,35.10^{-4}$	$3,35.10^{-4}$
CoCl ₂ .6H ₂ O	$1,90.10^{-5}$	$1,90.10^{-5}$	$1,90.10^{-5}$	$1,90.10^{-5}$
CuCl ₂	$1,40.10^{-6}$	$1,40.10^{-6}$	$1,40.10^{-6}$	$1,40.10^{-6}$
Solução estoque D				
EDTA.Na ₂	$7,40.10^{-3}$	$7,40.10^{-3}$	$7,40.10^{-3}$	$7,40.10^{-3}$

Além disso, foram realizadas medidas de comprimento e diâmetro nas 30 primeiras células da porção apical de 15 tricomas, em no mínimo 20 heterocitos e 10 acinetos e em no mínimo 10 células vegetativas intercalares de 20 tricomas (modificado de Komárek & Kovácik 1989). As medidas foram realizadas em fotografias digitais com o programa Zeiss Axiovision 3.1

(Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

As características métricas foram descritas estatisticamente através do cálculo de média aritmética e desvio-padrão como medidas de, respectivamente, tendência central e grau de dispersão absoluta dos dados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Komolgorov-Smirnov (Zar 1984). As diferenças entre as linhagens foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator), seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os cálculos foram efetuados pelo programa SIGMASTAT 3.1.

A fim de comparar as linhagens considerando todas as características métricas e morfológicas acima listadas simultaneamente, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP). O programa computacional utilizado foi o PC-ORD versão 3.1. (McCune & Mefford 1997), com matriz de covariância. Foram consideradas significativas as variáveis com $r > 0,6$ com o primeiro eixo de ordenação dos dados.

A identificação das linhagens baseou-se nos trabalhos de Komárek & Kovácik (1989) para *Aphanizomenon*, Komárková (1998) para *Cylindrospermopsis* e Hill (1970) para *Raphidiopsis*.

4. Resultados

4.1. Descrição Morfológica

A tabela 9 resume as características morfológicas, em todas as condições de cultivo, das linhagens estudadas.

Tabela 9: Características morfológicas das linhagens estudadas.

Táxon	Linhagem	Forma dos tricomas	Estrutura do tricoma	Constrições	Ápices	Células apicais	Forma dos Acinetos	Posição dos Acinetos	Forma dos Heterocitos	Posição dos Heterocitos	Células vegetativas
<i>Cylindrospermopsis / Raphidiopsis</i>	SPC 811	Longos ou curtos/retos ou curvos	Subsimétrica	±	Atenuados ou não	Cônicas com ápice arredondado ou acuminado, com aerótopos ou hialinas	Cilíndricos ou oblongos	Subapical ou intercalar	Não observados	—	Cilíndricas com aerótopos
<i>Cylindrospermopsis / Raphidiopsis</i>	SPC 820	Longos ou curtos/retos, curvos ou sigmóides	Subsimétrica	—	Atenuados ou não	Cônicas ou acuminadas, com aerótopos ou hialinas	Cilíndricos ou oblongos	Subapical	Não observados	—	Cilíndricas com aerótopos
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 339	Longos ou curtos/retos (raramente curvos)	Subsimétrica	—	Atenuados ou não	Cilíndricas ou cônicas com ápice arredondado ou acuminado, com ou sem aerótopos ou hialinas	Cilíndricos ou oblongos	Subapical	Elipticos, cônicos ou cilíndricos com extremidades arredondadas	Terminal	Cilíndricas, com ou sem aerótopos
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 969	Longos ou curtos/retos	Subsimétrica	—	Atenuados ou não	Cilíndricas ou acuminadas, com ou sem aerótopos	Cilíndricos	Subapical	Cônicos ou cilíndricos com extremidades arredondadas	Terminal ou intercalar	Cilíndricas, com ou sem aerótopos
<i>Raphidiopsis brookii</i>	FURGCY001	Longos ou curtos/retos ou curvos	Subsimétrica	±	Atenuados ou não	Cilíndricas com ápice arredondado ou cônicas com ápice acuminado, com ou sem aerótopos	Cilíndricos	Subapical ou intercalar	Não observados	—	Cilíndricas, com ou sem aerótopos
<i>Raphidiopsis brookii</i>	SPC 338	Longos ou curtos/retos	Subsimétrica	-	Atenuados ou não	Cilíndricas com ápice arredondado ou cônicas com ápice acuminado, com ou sem aerótopos	Cilíndricos ou oblongos	Subapical	Não observados	—	Cilíndricas, com ou sem aerótopos

continua

Tabela 9: Características morfológicas das linhagens estudadas (*continuação*).

Táxon	Linhagem	Forma dos tricomas	Estrutura do tricoma	Constrições	Ápices	Células apicais	Forma dos Acinetos	Posição dos Acinetos	Forma dos Heterocitos	Posição dos Heterocitos	Células vegetativas
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 649	Longos/retos	Metamérica	±	Atenuados ou não	Cônicas, cilíndricas com ápice arredondado ou esféricas, com aerótopos	Cilíndricos, ovalados ou esféricos	Intercalar	Cilíndricos, oblongos ou esféricos	Intercalar	Cilíndricas, oblongas, esféricas, quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 704	Longos/retos	Metamérica ou subsimétrica	+	Atenuados ou não	Cônicas, cilíndricas com ápice arredondado ou esféricas, com aerótopos	Oblongos	Intercalar	Oblongos a esféricos ou cônicos	Intercalar ou terminal	Cilíndricas, quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	SPC 640	Longos ou curtos/retos	Metamérica	±	Atenuados ou não	Longas e acuminadas, cônicas ou cilíndricas com ápice arredondado, com ou sem aerótopos	Cilíndricos	Intercalar	Esféricos ou em forma de barril, com ou sem copinhos nas extremidades	Intercalar	Cilíndricas, oblongas, esféricas, quadráticas ou em forma de barril, com ou sem aerótopos
<i>Aphanizomenon gracile</i>	SPC 668	Longos/retos	Metamérica	+	Não atenuados	Cilíndricas com ápice arredondado ou esféricas, com aerótopos	Cilíndricos ou oblongos	Intercalar	Esféricos ou em forma de barril, com ou sem copinhos nas extremidades	Intercalar	Cilíndricas, quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos

***Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault**

Linhagem SPC 649 (Prancha 1)

Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, não ou levemente atenuados nas extremidades, constrictos ou sem constrições nos septos, longos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cônicas, cilíndricas ou esféricas, com aerótopos ou hialinas, 4,8 a 7,7 μm de comprimento e 3,6 a 7,0 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, oblongas, esféricas, quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos, 2,2 a 8,7 μm de comprimento e 3,8 a 5,8 μm de diâmetro. Heterocitos cilíndricos, oblongos ou esféricos, 3,5 a 10,5 μm de comprimento e 4,1 a 8,0 μm de diâmetro, intercalares, em número de um a nove, com distribuição metamérica ao longo do tricoma. Acinetos cilíndricos, ovalados ou esféricos, 10,1 a 15,1 μm de comprimento e 1,1 a 1,5 μm de diâmetro, intercalares, solitários ou em pares.

Linhagem SPC 704 (Prancha 2)

Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, não ou levemente atenuados nas extremidades, constrictos nos septos, longos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cônicas, cilíndricas com ápice arredondado ou esféricas, com aerótopos, 6,2 a 10,0 μm de comprimento e 2,7 a 4,1 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos, 3,2 a 13,2 μm de comprimento e 2,6 a 4,4 μm de diâmetro. Heterocitos oblongos a esféricos ou cônicos, 4,6 a 9,8 μm de comprimento e 2,2 a 5,7 μm de diâmetro, intercalares, solitários ou em pares, com distribuição metamérica ao longo do tricoma. Terminais e cônicos em tricomas submetidos a carência de nitrogênio. Acinetos

oblongos, 6,2 a 15,1 μm de comprimento e 2,7 a 3,6 μm de diâmetro, intercalares, solitários.

Aphanizomenon cf. gracile

Linhagem SPC 640 (Prancha 3)

Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, atenuados ou não nas extremidades, constrictos ou sem constrictões nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais longas e acuminadas, cônicas ou cilíndricas com ápice arredondado, com ou sem aerótopos, 6,7 a 16,1 μm de comprimento e 2,4 a 5,5 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, oblongas, esféricas, quadráticas ou em forma de barril, com ou sem aerótopos, 3,7 a 13,3 μm de comprimento e 2,3 a 4,8 μm de diâmetro. Heterocitos esféricos ou em forma de barril, com ou sem copinhos nas extremidades, 4,4 a 8,5 μm de comprimento e 3,3 a 7,2 μm de diâmetro, intercalares, solitários ou em pares, com distribuição metamérica ao longo do tricoma,. Acinetos cilíndricos, 4,4 a 8,5 μm de comprimento e 3,4 a 7,2 μm de diâmetro, intercalares, solitários.

***Aphanizomenon gracile* Lemmermann**

Linhagem SPC 668 (Prancha 4)

Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, não atenuados, constrictos nos septos, longos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cilíndricas com ápice arredondado ou esféricas, com aerótopos, 4,1 a 7,6 μm de comprimento e 3,4 a 4,5 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, quadráticas ou em forma de barril, com aerótopos,

2,8 a 10,7 μm de comprimento e 2,7 a 5,6 μm de diâmetro. Heterocitos esféricos ou em forma de barril, com ou sem copinhos nas extremidades 3,4 a 9,8 μm de comprimento e 2,8 a 6,4 μm de diâmetro, intercalares, solitários, com distribuição metamérica ao longo do tricoma. Acinetos cilíndricos ou oblongos, 5,8 a 10,2 μm de comprimento e 2,9 a 5,9 μm de diâmetro, intercalares ou terminais, em número de um a três.

Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis

Linhagem SPC 811 (Prancha 5)

Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, atenuados ou não, não ou levemente constrictos nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cônicas com ápice arredondado ou acuminado, com aerótopos ou hialinas, 6,7 a 30,2 μm de comprimento e 2,5 a 3,7 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, com aerótopos, 5,6 a 17,2 μm de comprimento e 3,5 a 4,1 μm de diâmetro. Heterocitos não observados. Acinetos cilíndricos ou oblongos, 6,5 a 24,6 μm de comprimento e 3,1 a 9,7 μm de diâmetro, em número de um a três, subapicais ou intercalares em tricomas muito longos.

Linhagem SPC 820 (Prancha 6)

Tricomas livre flutuantes, cilíndricos retos, curvos ou sigmóides, atenuados ou não, sem constrições nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cônicas ou acuminadas, com aerótopos ou hialinas, 17,9 a 31,3 μm de comprimento e 1,3 a 3,9 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, com aerótopos, 4,8 a 13,4 μm de comprimento e 2,9 a 3,9 μm de diâmetro. Heterocitos não observados. Acinetos

cilíndricos ou oblongos, 9,0 a 15,0 µm de comprimento e 2,1 a 3,5 µm de diâmetro, solitários, subapicais.

***Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju**

Linhagem SPC 339 (Prancha 7)

Tricomas livre flutuantes, cilíndricos, retos, raramente curvos, atenuados ou não, sem constrições nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cilíndricas ou cônicas com ápice arredondado ou acuminado, com ou sem aerótopos ou hialinas, 5,3 a 20,0 µm de comprimento e 1,8 a 6,0 µm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, com ou sem aerótopos, 5,3 a 20,6 µm de comprimento e 2,5 a 4,3 µm de diâmetro. Heterocitos elípticos, cônicos ou cilíndricos com extremidades arredondadas, com um ou dois poros, 1,4 a 12,4 µm de comprimento e 1,1 a 4,7 µm de diâmetro, terminais. Acinetos cilíndricos ou oblongos, 5,4 a 21,4 µm de comprimento e 3,4 a 4,9 µm de diâmetro, em número de um a três, subapicais.

Linhagem SPC 969 (Prancha 8)

Tricomas livre flutuantes, cilíndricos, retos, atenuados ou não, sem constrições nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cilíndricas ou acuminadas, com ou sem aerótopos, 11,8 a 21,3 µm de comprimento e 1,3 a 2,7 µm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, com ou sem aerótopos, 3,2 a 15,8 µm de comprimento e 2,3 a 4,0 µm de diâmetro. Heterocitos cônicos ou cilíndricos com extremidades arredondadas, com um ou dois poros, terminais, raramente intercalares. Acinetos

cilíndricos, 10,7 a 15,2 μm de comprimento e 1,7 a 2,3 μm de diâmetro, solitários, subapicais.

***Raphidiopsis brookii* P. J. Hill**

Linhagem FURG CY001 (Prancha 9)

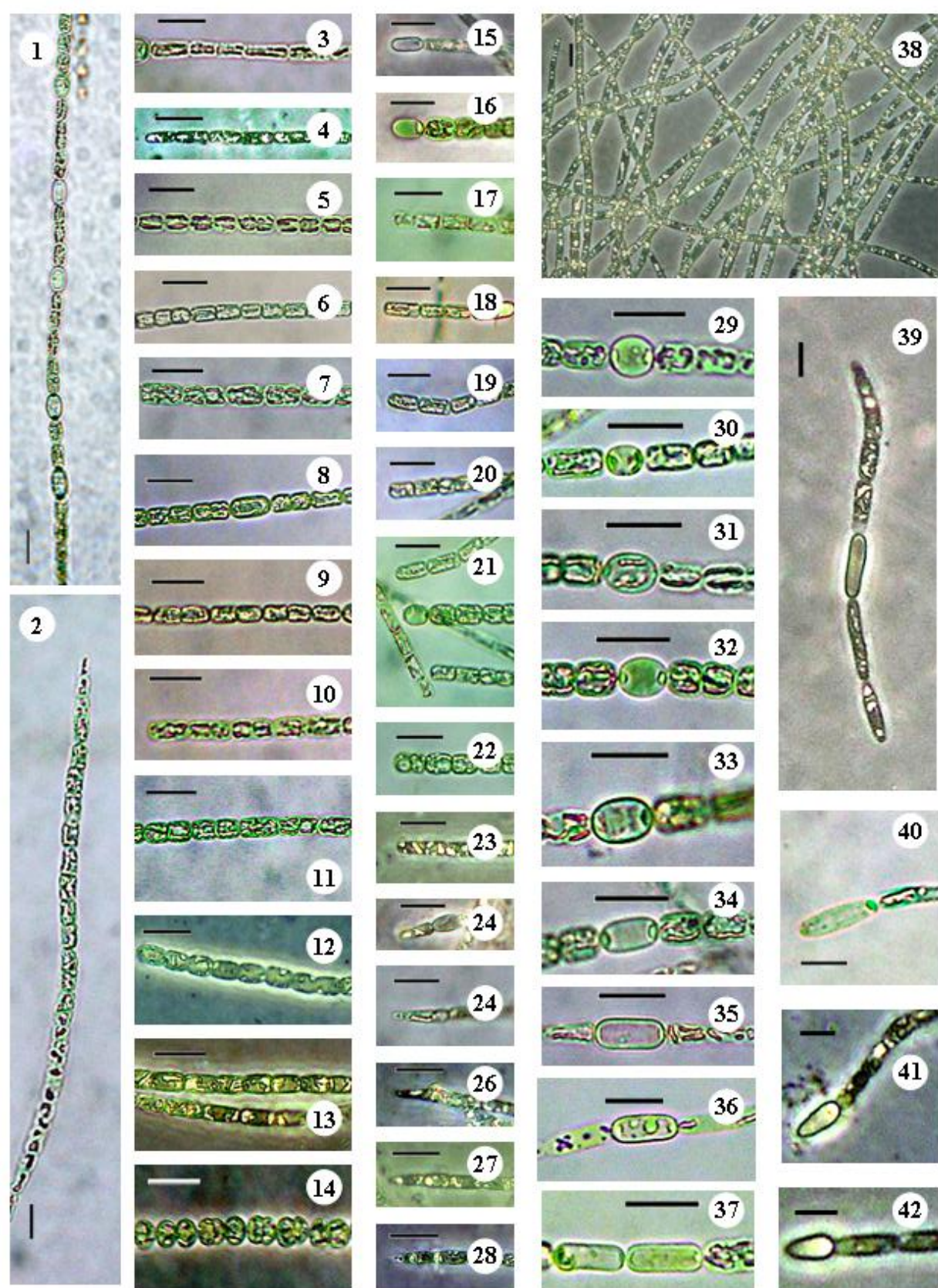
Tricomas livre flutuantes, cilíndricos, retos ou curvos, levemente constrictos ou sem constrictões nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cilíndricas com ápice arredondado ou cônicas com ápice acuminado, 7,6 a 23,4 μm de comprimento e 2,4 a 4,8 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, com ou sem aerótopos, 3,5 a 19,9 μm de comprimento e 2,3 a 4,8 μm de diâmetro. Heterocitos não observados. Acinetos cilíndricos, 11,0 a 15,3 μm de comprimento e 1,9 a 3,4 μm de diâmetro, em número de um a três, subapicais ou intercalares.

Linhagem SPC 338 (Prancha 10)

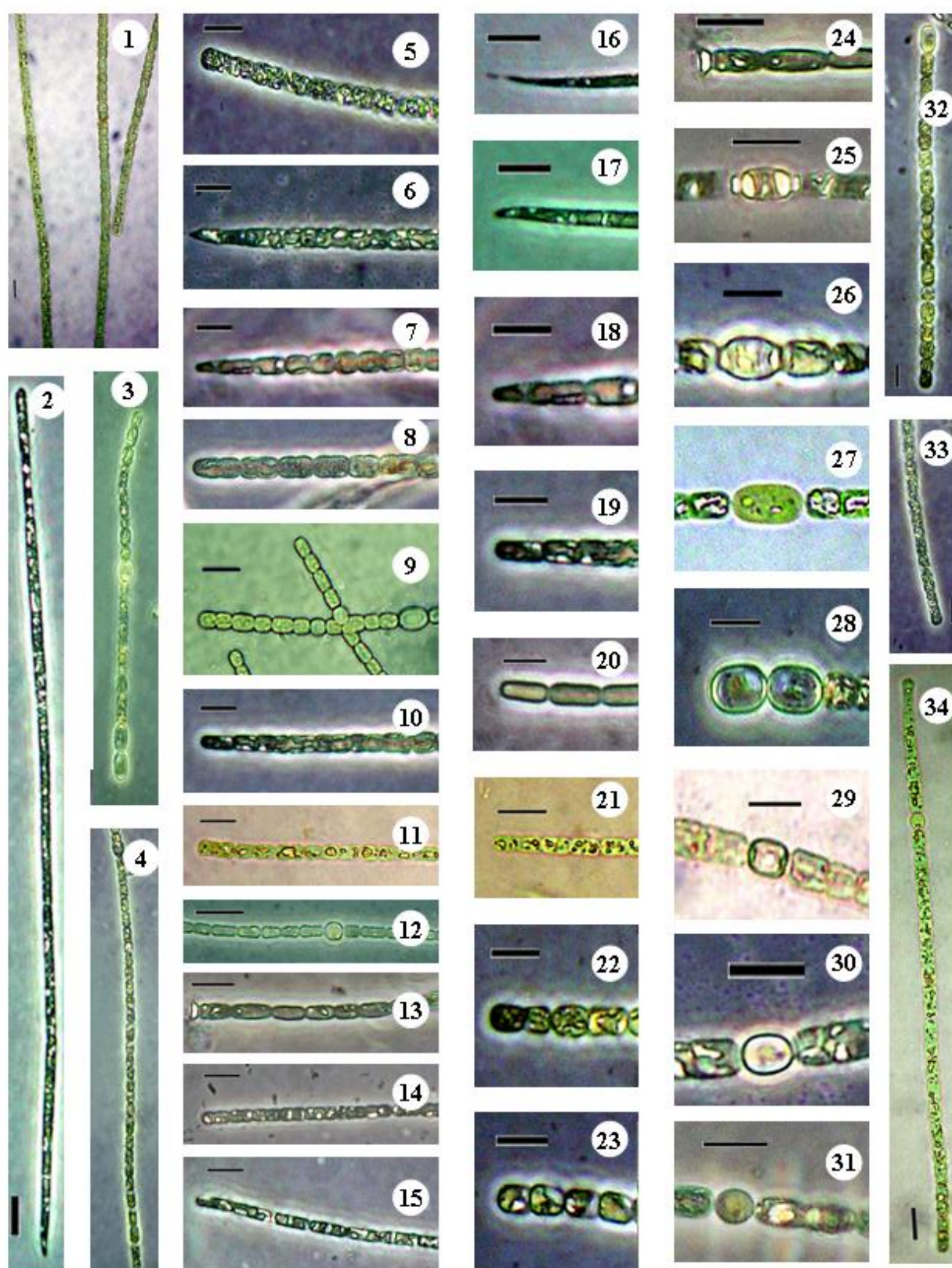
Tricomas livre flutuantes, retos, cilíndricos, sem constrição nos septos, longos ou curtos, alguns tricomas com fina mucilagem difluente. Células apicais cilíndricas com ápice arredondado ou cônicas com ápice acuminado, 5,4 a 34,5 μm de comprimento e 1,8 a 2,5 μm de diâmetro. Células intercalares cilíndricas, 4,9 a 14,8 μm de comprimento e 1,8 a 3,3 μm de diâmetro. Heterocitos não observados. Acinetos cilíndricos ou oblongos, 9,4 a 22,8 μm de comprimento e 2,6 a 4,3 μm de diâmetro, solitários ou em pares, subapicais.



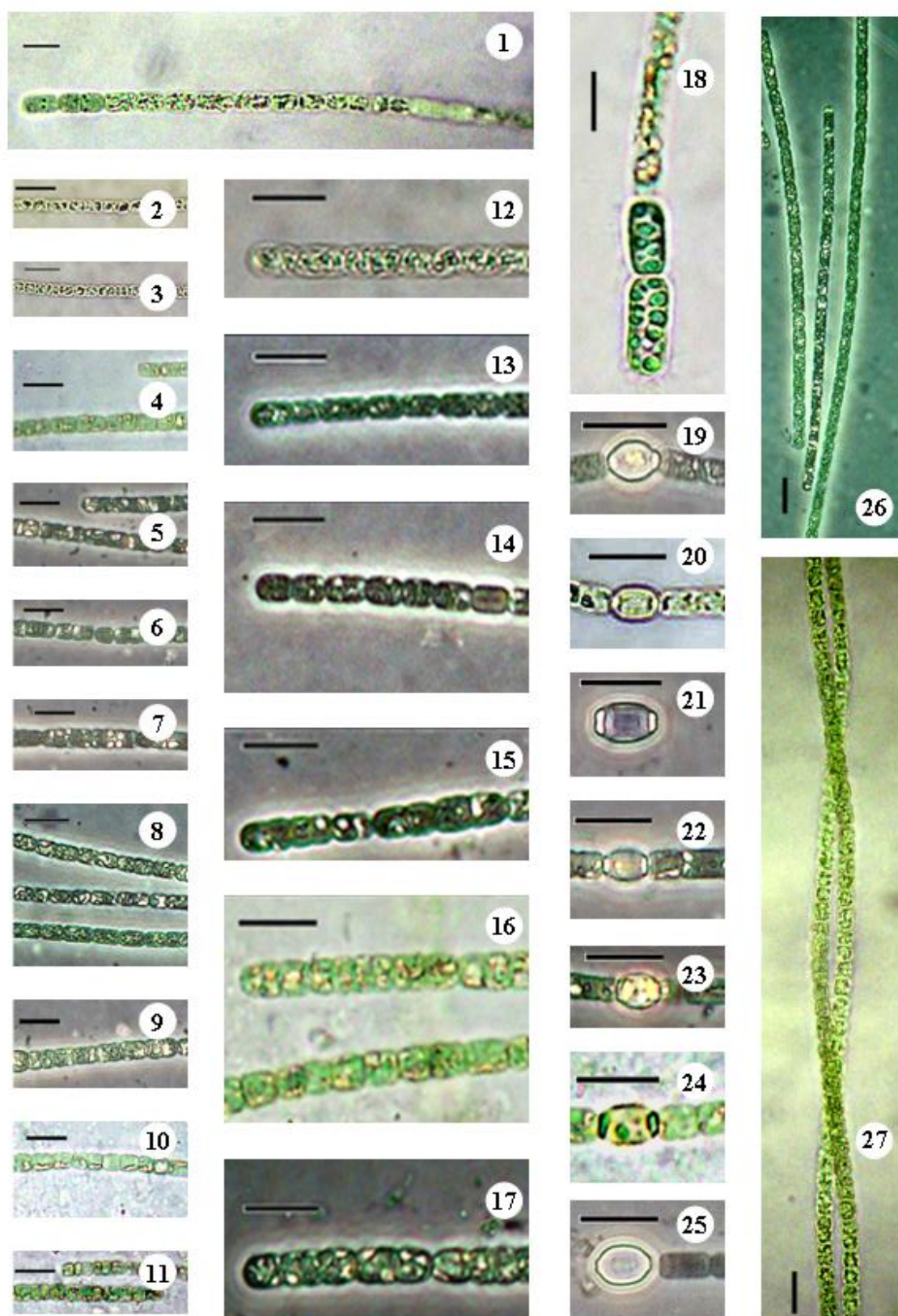
Prancha 1 : SPC 649 (*Aphanizomenon* sp.). 1. Aspecto geral da cultura. 2., 3., 29.-39. Heterocitos. 4.-15. Variação da porção terminal e das células vegetativas (14. e 15. em meio com disponibilidade de nitrogênio reduzida). 16.-28. Variação das células apicais (28 em meio com disponibilidade de nitrogênio reduzida). 29.-39. Variação dos heterocitos. 40., 41. Acinetos. 42. Tricoma com distribuição metamérica de heterocitos em meio com disponibilidade de nitrogênio reduzida. Escalas: 10 µm.



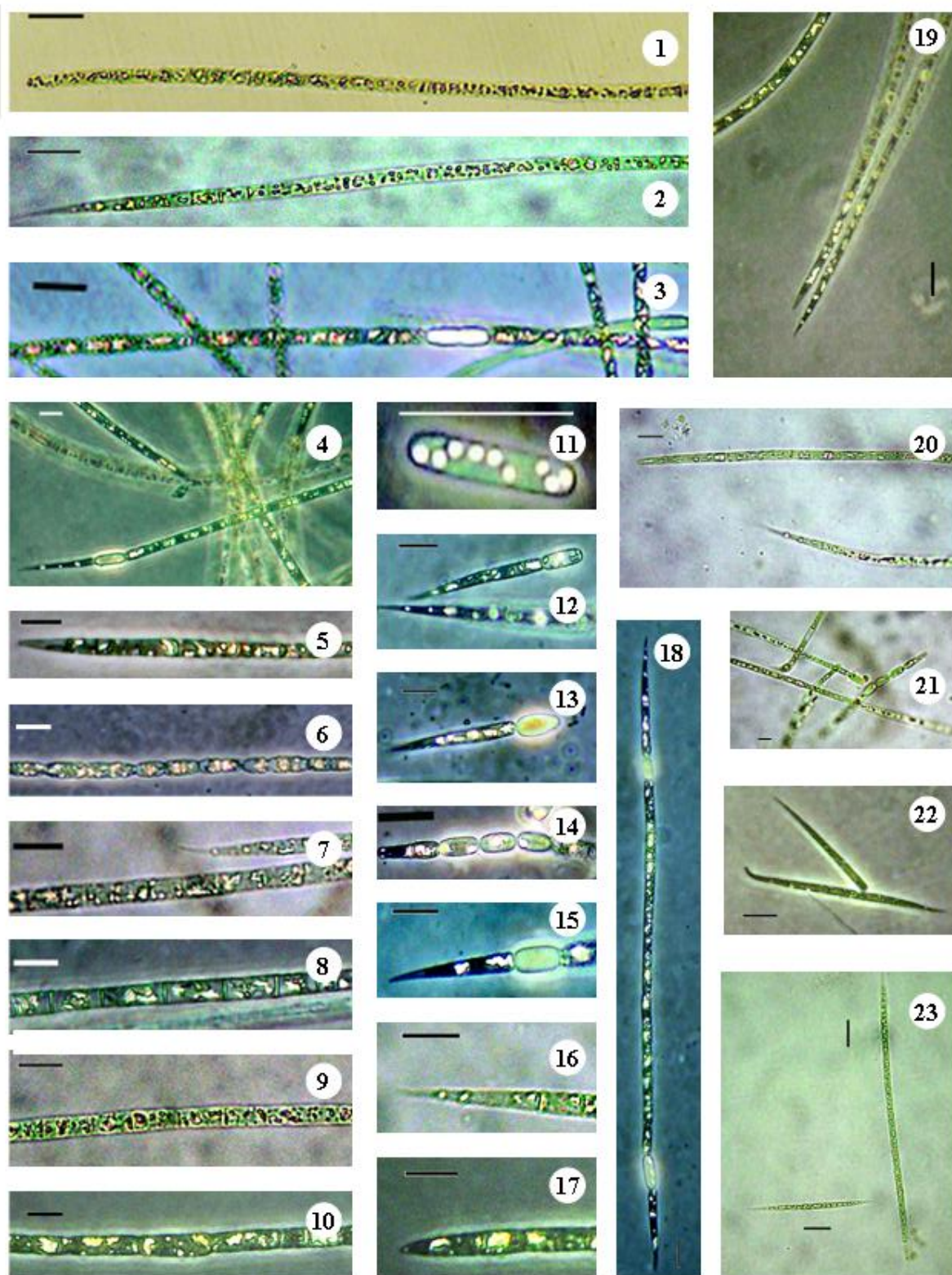
Prancha 2 : SPC 704 (*Aphanizomenon* sp.). 1. Tricoma com heterocitos. 2. Aspecto geral de um tricoma. 3.-14. Variação das células vegetativas. 15.-28. Variação das células apicais. 29.-34. Variação dos heterocitos. 35.-37. Acinetos. 38. Aspecto geral da cultura. 39., 40. Acinetos em meio de cultura com disponibilidade de nitrogênio reduzida. 41., 42. Heterocitos terminais em meio de cultura com disponibilidade de nitrogênio reduzida. Escalas: 10 μ m.



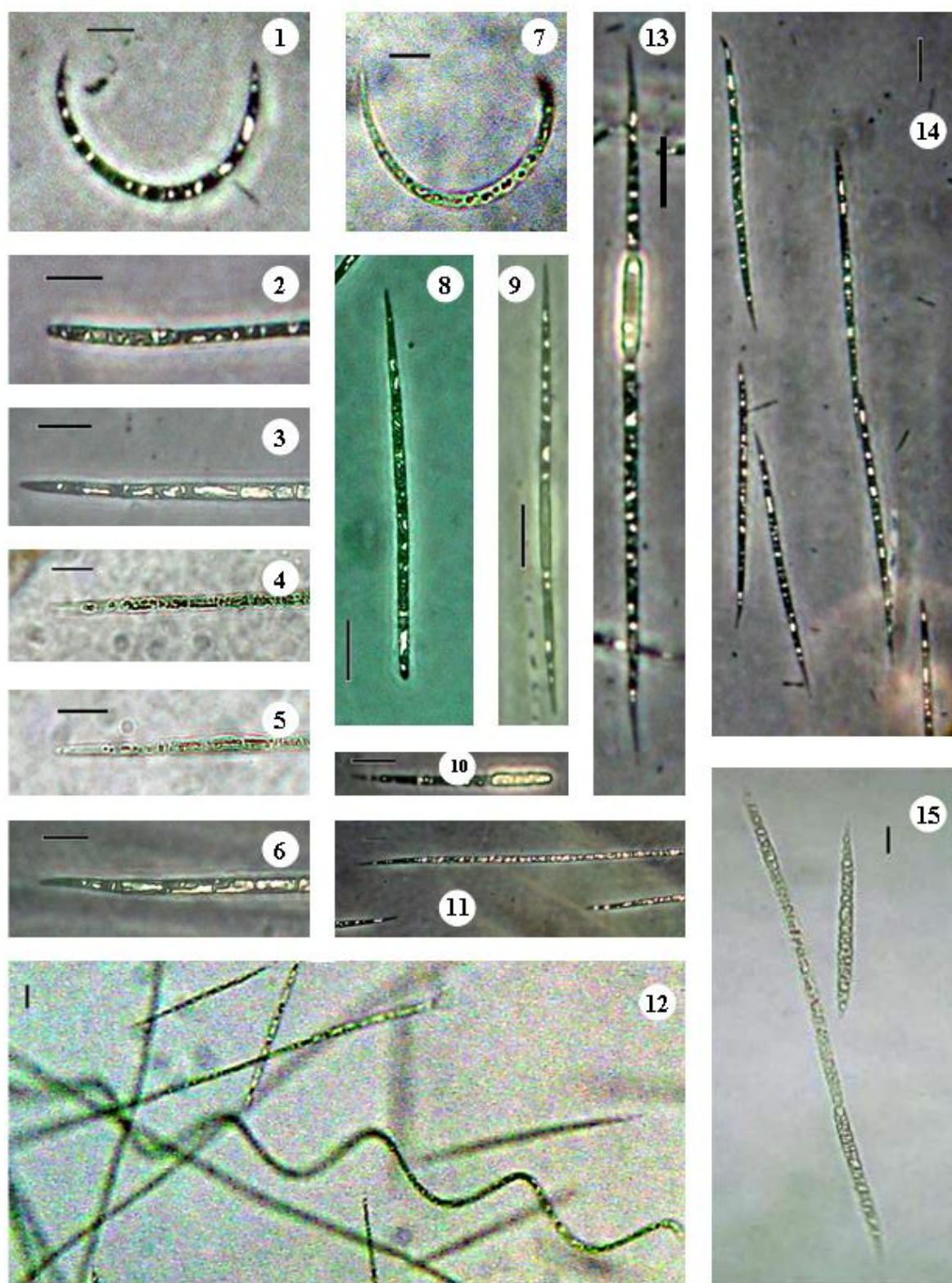
Prancha 3 : SPC 640 (*Aphanizomenon cf. gracile*). 1.-4.e 32.-34. Aspecto geral dos tricomas. 5.-15. Variação da porção terminal dos tricomas e das células vegetativas. 16.-23. Variação das células apicais. 24. Fragmento de copinho apical de heterocito na porção terminal do tricoma. 25, 26. Heterocitos com copinhos apicais. 27.-31. Variação dos heterocitos. Escalas: 10 µm.



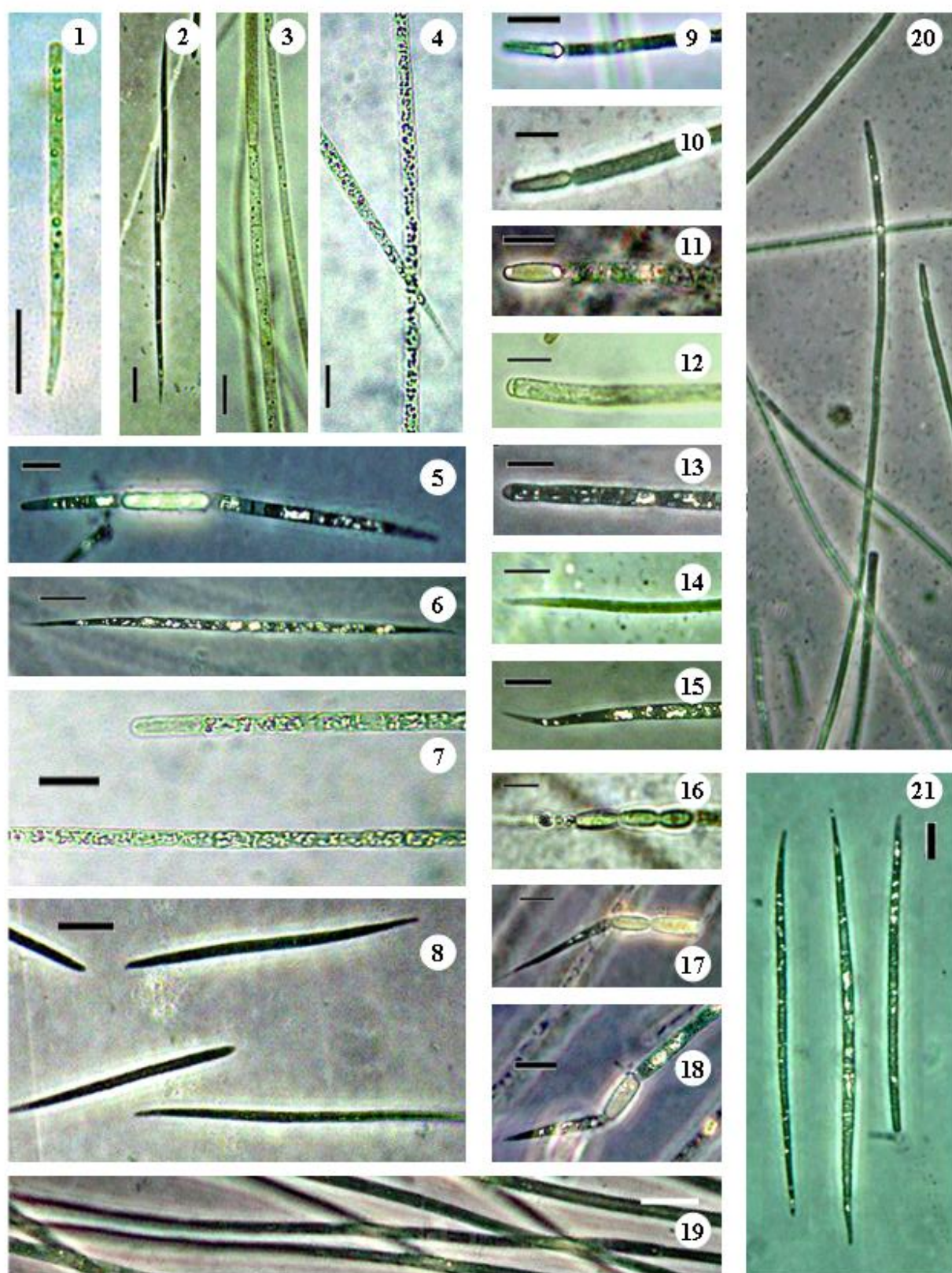
Prancha 4 : SPC 668 (*Aphanizomenon gracile*). 1.-11. Aspecto geral das células vegetativas. 12.17. Porção terminal e célula apical dos tricomas. 18. Acinetos. 19.-25. Heterocitos. 26.-27. Aspecto geral dos tricomas. Escalas: 10 μ m.



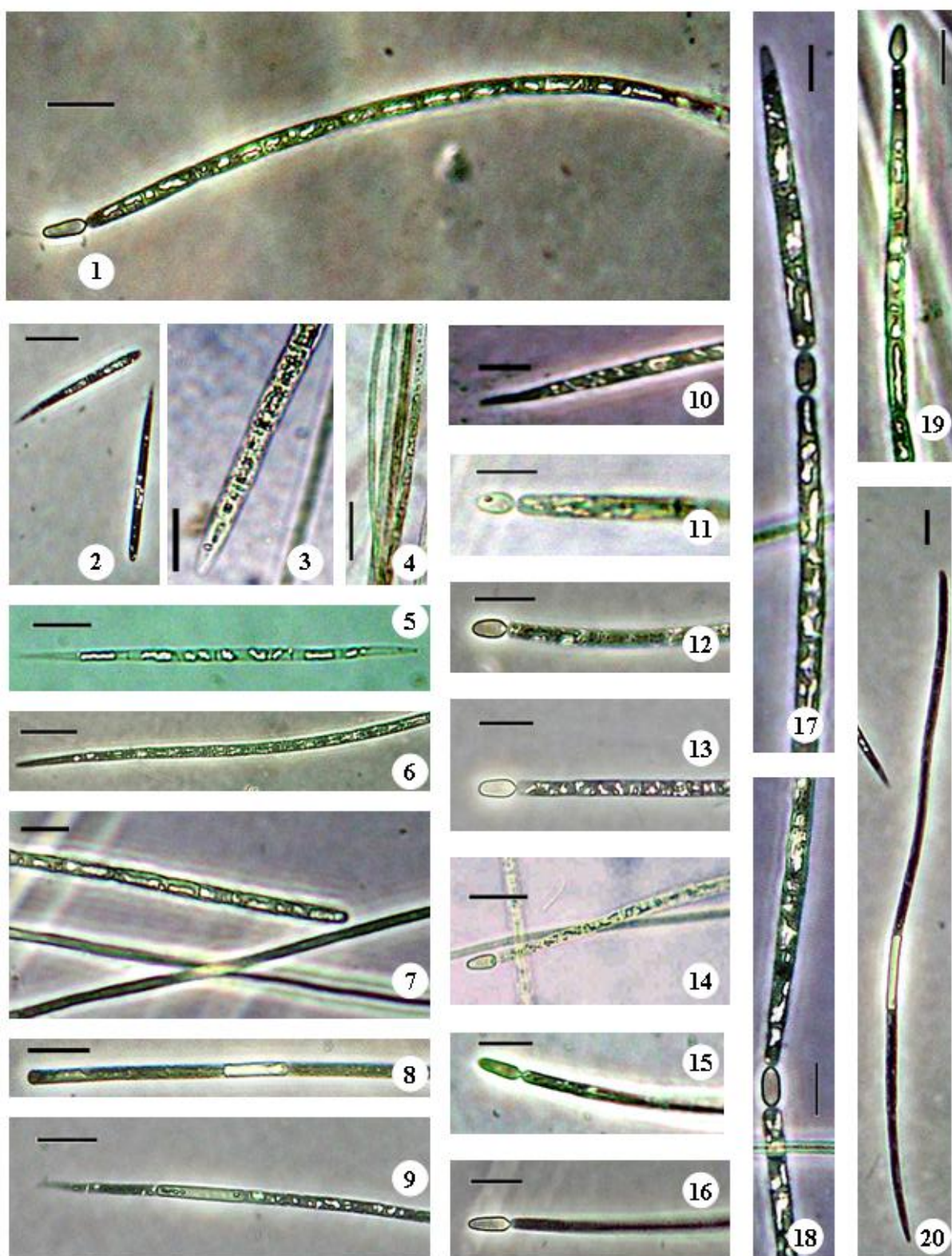
Prancha 5: SPC 811 (*Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*): 1.-4.,18.-23. Aspecto geral dos tricomas. 4.-10. Aspecto geral das células vegetativas. 11.-15. Acinetos. 16., 17. Células apicais. Escalas: 10 μm.



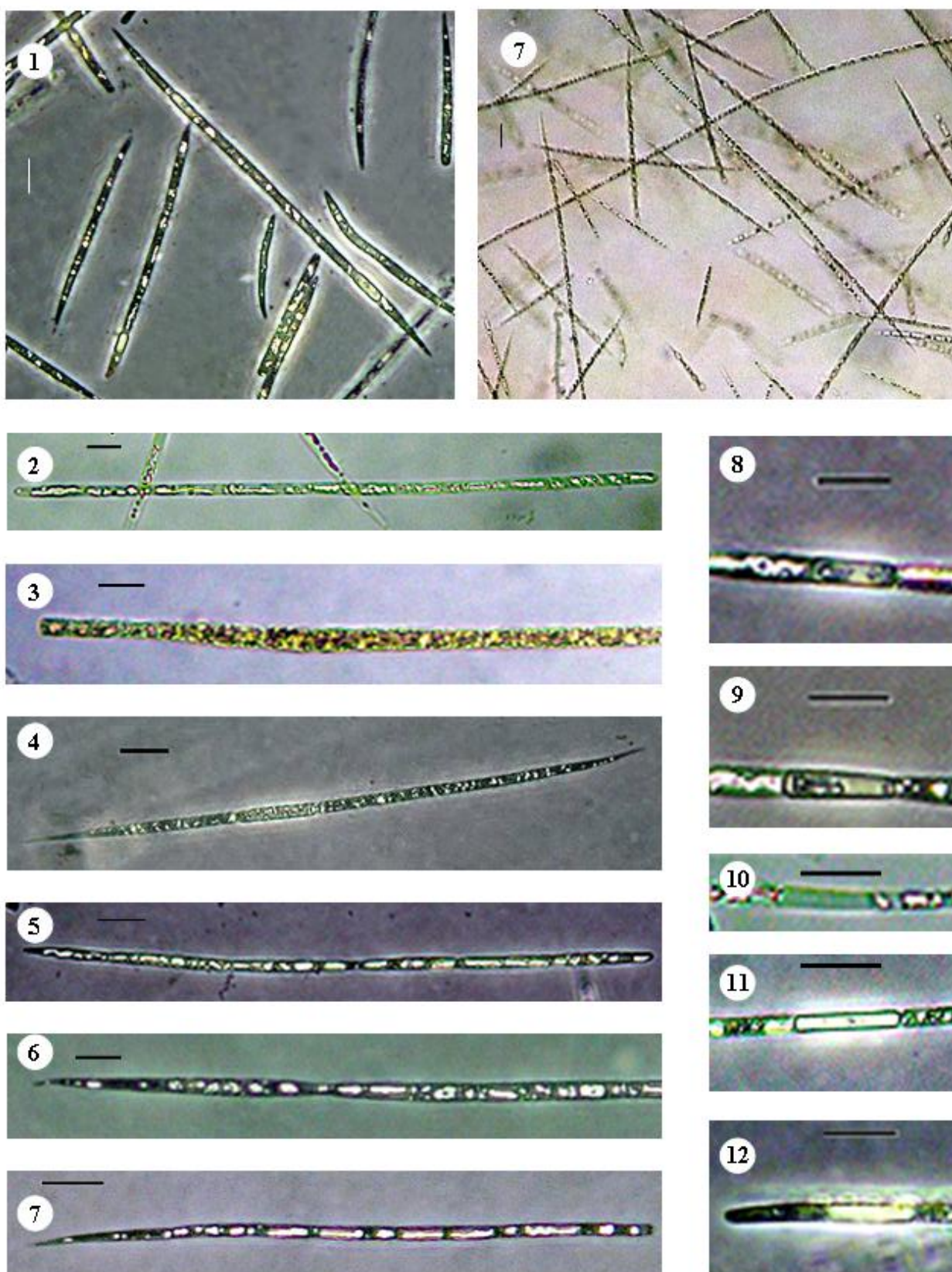
Prancha 6: SPC 820 (*Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*): 1., 7., 8.,12.,14.,15. Aspecto geral dos tricomas. 2.-6.,11. Porção terminal dos tricomas com células apicais. 9. Tricoma como protoacinet. 10., 13. Tricomas com acinet. Escalas: 10 μm.



Prancha 7 : SPC 339 (*Cylindrospermopsis raciborskii*). 1.-4., 8., 19.-21. Aspecto geral dos tricomas. 5., 16.-18. Acinetos. 9.-11. Heterocitos terminais. 12.-15. Variação da célula apical. Escalas: 10 µm.



Prancha 8 : SPC969 (*Cylindrospermopsis raciborskii*). 1., 2., 5.-7. Aspecto geral dos tricomas. 3. Células vegetativas. 4. Tricomas com e sem aerótopos. 8., 9., 20. Tricomas com protoacinetos. 10. Célula apical. 11.-16., 19. Porção terminal dos tricomas com heterocito apical. 17., 18. Heterocitos intercalares. Escalas: 10 μm .



Prancha 9 : FURGCY001 (*Raphidiopsis brookii*). 1., 7. Aspecto geral dos tricomas. 2., 3. Tricomas com célula apical arredondada. 4.-7. Tricomas com célula apical acuminada. 8.-12. Protoacinetos. Escalas: 10 μm.



Prancha 10: SPC 338 (*Raphidiopsis brookii*). 1., 2., 6., 8., 11. Aspecto geral dos tricomas. 3.-5., 7., 9., 10., 13. Tricomas com acinetos. 14.-23. Variação da porção apical dos tricomas. Escalas: 10 μ m.

4.2. Descrição métrica

A tabela 10 apresenta os resultados das medidas de células vegetativas, heterocitos e acinetos.

Tabela 10: Características métricas das linhagens estudadas: média± desvio padrão (mínimo-máximo), em micrômetros. NO= não observado

Táxon putativo	Linhagem	Células vegetativas				Acinetos				Heterocitos			
		Comp.	Diam.	Razão	N	Comp.	Diam.	Razão.	N	Comp.	Diam.	Razão	N
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 649	5,33±1,12 (2,18; 8,69)	4,62±0,45 (3,82-5,80)	0,95±0,24 (0,53-1,97)	350	14,82±2,10 (11,00-17,38)	11,65±1,70 (10,21-15,08)	1,28±0,16 (1,08-1,55)	10	7,52±1,39 (3,53-10,46)	5,37±0,83 (4,14-8,03)	1,39±0,24 (0,62; 2,23)	38
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 704	6,52±1,49 (3,18-13,24)	3,19±0,49 (2,56-4,44)	1,53±0,39 (0,71-2,56)	359	10,32±4,48 (6,21-15,10)	3,12±0,46 (2,68- 3,59)	1,94±1,57 (0,49-3,60)	10	6,84±1,17 (4,58-9,84)	3,58±1,01 (2,17-5,71)	2,02±0,53 (1,24-3,44)	29
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	SPC 640	6,59±1,59 (3,74-13,35)	3,35±0,51 (2,28-4,81)	1,57±0,65 (0,83-6,25)	421	10,66±3,85 (5,77- 15,15)	5,19±2,98 (2,93-9,24)	2,36-1,02 (1,21-3,59)	10	5,87±0,92 (4,37-8,49)	4,53±0,67 (3,34-7,17)	1,32±0,12 (0,99-1,83)	31
<i>Aphanizomenon gracile</i>	SPC 668	5,15±1,22 (2,78-10,71)	3,91±0,66 (2,71-5,57)	1,22±0,36 (0,54-2,34)	514	7,84 ±1,85 (5,82- 10,21)	5,07±1,12 (2,89-5,86)	1,62-0,53 (1,07±2,36)	10	6,56±1,24 (3,44-9,84)	4,56±0,79 (2,83-6,36)	1,46±0,25 (0,63-2,37)	71
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 811	9,96±2,75 (5,61-17,18)	4,09±0,64 (3,46-4,09)	1,96±0,48 (1,06-4,28)	290	11,06±3,85 (6,47-24,60)	4,65±1,32 (3,16-9,69)	2,48-0,87 (1,00-5,24)	42	—	—	—	NO
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 820	8,02±1,71 (4,78-13,39)	3,41±0,28 (2,95-3,86)	2,36±0,53 (1,09-10,61)	252	12,63±1,60 (9,00-15,07)	2,9±0,38 (2,1-3,48)	4,45±0,89 (2,59-6,37)	15	—	—	—	NO
<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i>	SPC 339	12,05±2,96 (5,34-20,62)	3,37±0,48 (2,47-4,29)	3,64 ±1,00 (1,24-7,80)	165	11,04±3,07 (5,38-21,44)	4,24±0,46 (3,45-4,97)	2,65±0,92 (1,41-6,21)	25	10,52±1,47 (8,74-13,63)	2,90±1,03 (1,11-4,73)	3,57±1,03 (1,23-5,22)	20
<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i>	SPC 969	8,65±2,3 (3,24-15,8)	3,10±0,37 (2,35-3,97)	3,16±1,12 (1,30-8,29)	213	13,59±1,98 (10,70-15,15)	2,11±0,19 (1,74-2,29)	6,52±1,36 (4,67-8,46)	10	6,70±1,00 (4,85- 8,36)	3,02±0,67 (1,72-5,15)	2,30±0,60 (1,19-4,47)	25
<i>Raphidiopsis brookii</i> .	FURG001	8,38±2,62 (3,55-19,9)	3,38±0,50 (2,34-4,83)	2,49±0,85 (1,00-8,38)	200	13,58±1,62 (11,02-15,30)	2,66-0,47 (1,95-3,38)	5,20±0,87; (3,90-6,37)	10	—	—	—	NO
<i>Raphidiopsis brookii</i>	SPC 338	9,20±1,85 (4,97-14,8)	2,59±0,30 (1,85-3,26)	2,93±0,81 (1,57-5,80)	281	14,43±3,66 (9,46-22,83)	3,22±0,42 (2,61-4,29)	4,52±1,17 (2,49-7,27)	26	—	—	—	NO

A figura 1 apresenta a tendência de distribuição, em porcentagem, das células vegetativas nas diferentes classes de tamanho. No caso do comprimento celular, houve o agrupamento das linhagens SPC640, SPC668 e SPC649, todas pertencentes ao gênero *Aphanizomenon*. A linhagem SPC704, também do gênero *Aphanizomenon*, encontra-se em posição intermediária. As linhagens SPC969 (*Cylindrospermopsis*), SPC338 e FURGCI001 (ambas *Raphidiopsis*), SPC 811 e SPC 820 (ambas *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*) constituem outro agrupamento. Por fim, a linhagem SPC339 apresenta uma distribuição mais homogênea das células nas classes de tamanho, deslocada para os comprimentos maiores.

Com relação ao diâmetro celular, são igualmente observados agrupamentos com distribuição semelhante de células pelas classes de tamanho, mas tais agrupamentos não reúnem linhagens do mesmo gênero. Assim, um primeiro grupo reúne as linhagens SPC338 (*Raphidiopsis*) e SPC969 (*Cylindrospermopsis*); um segundo as linhagens SPC668, SPC704 (ambas *Aphanizomenon*), SPC339 (*Cylindrospermopsis*), SPC820 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*) e FURGCI001 (*Raphidiopsis*), e um terceiro, deslocado para os tamanhos celulares maiores, as linhagens SPC640, SPC649 (ambas *Aphanizomenon*) e SPC811 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*).

A razão comprimento/diâmetro apresenta os seguintes agrupamentos: SPC649, SPC668, SPC640, SPC704 (todas pertencentes ao gênero *Aphanizomenon*) e SPC811 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*); SPC338, FURGCI001 (ambas *Raphidiopsis*), SPC820 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*) e SPC969 (*Cylindrospermopsis*) e, por fim, a linhagem SPC339 deslocada para os valores maiores de razão celular. Assim sendo, novamente linhagens de diferentes gêneros estão reunidas em agrupamentos de distribuição semelhante das células por classe de razão celular.

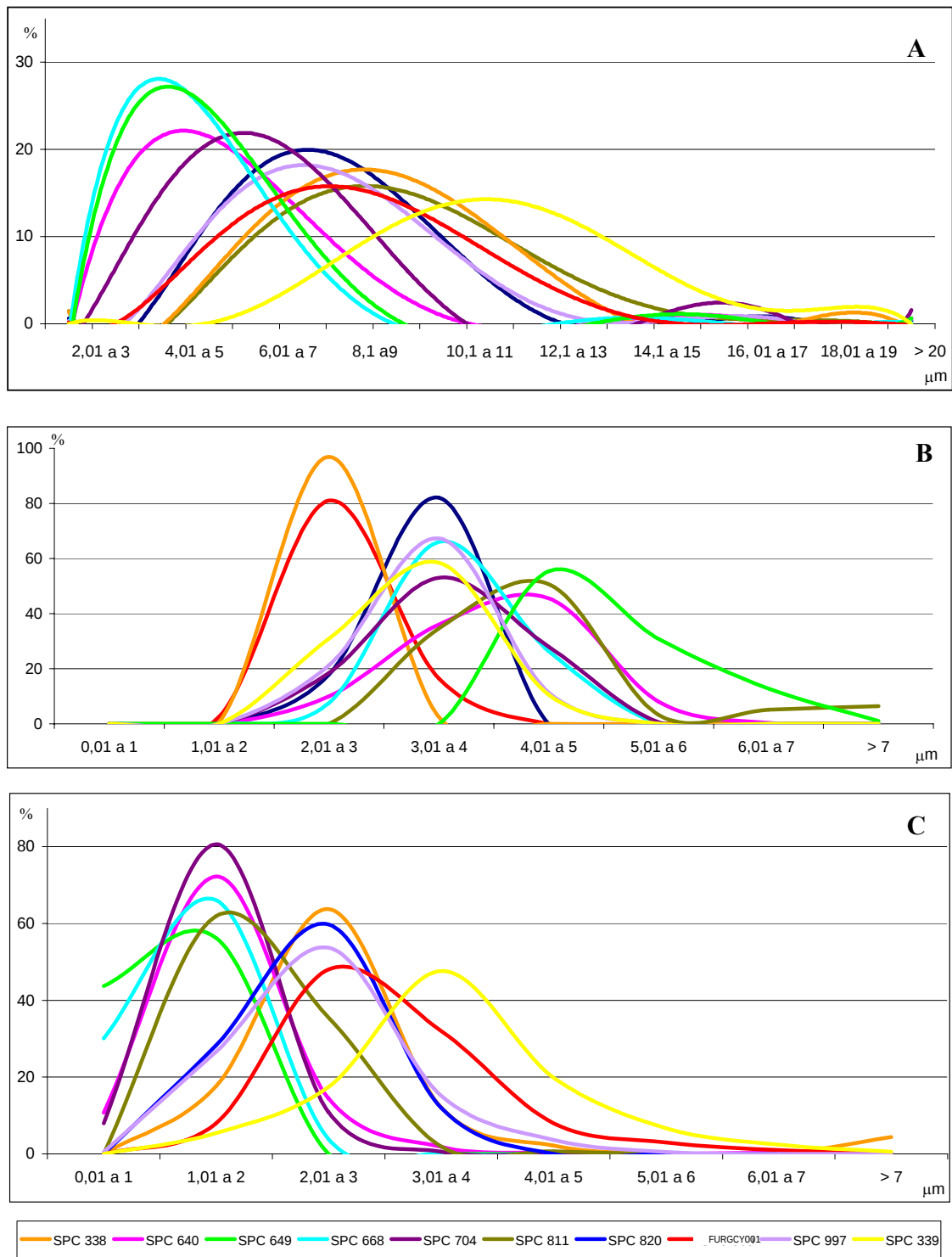
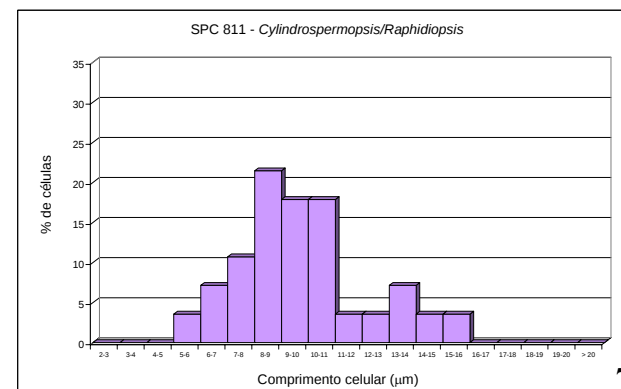
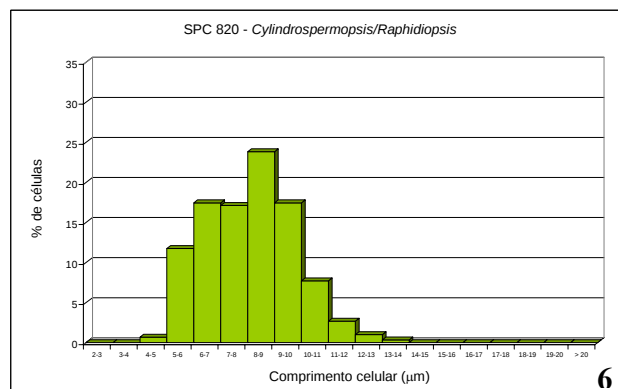
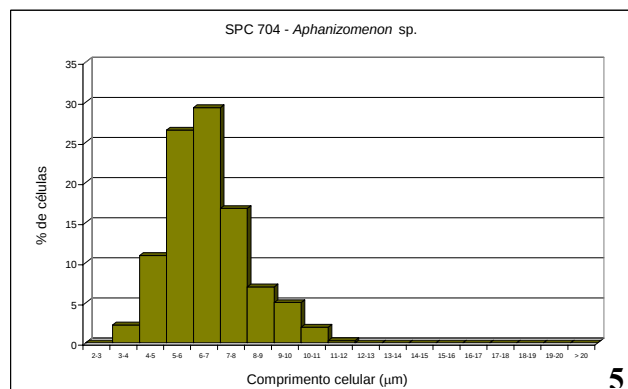
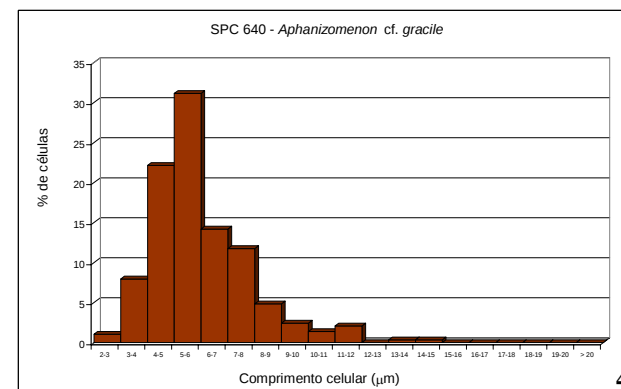
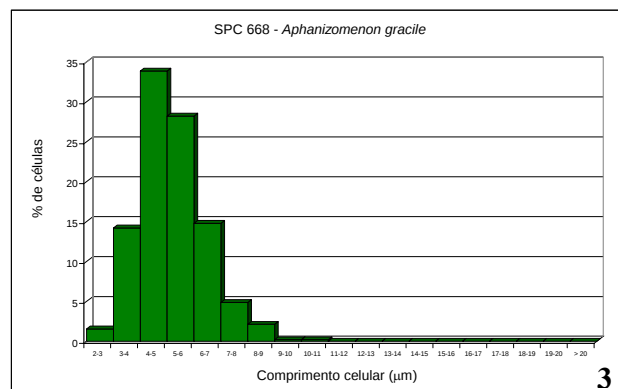
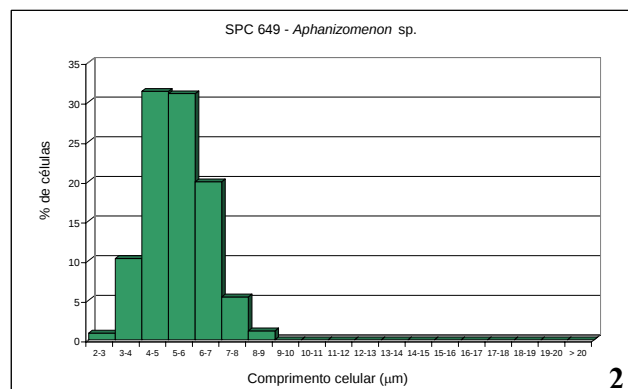
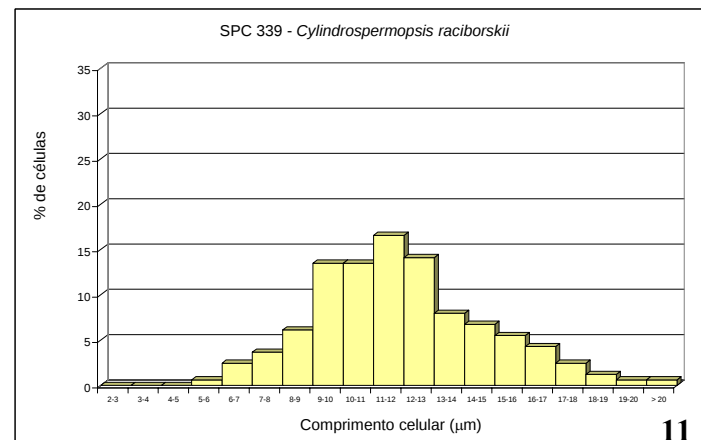
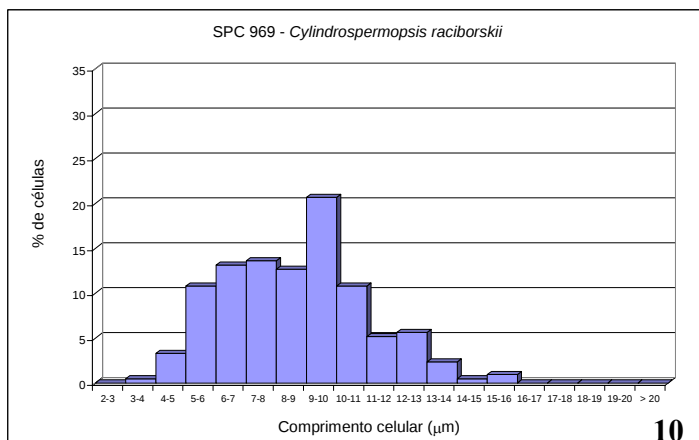
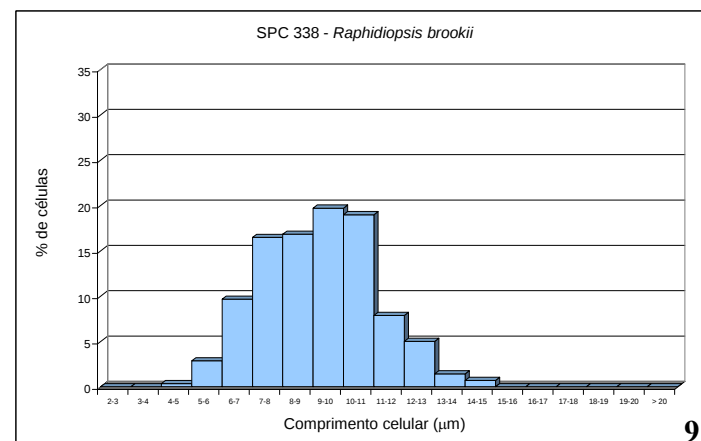
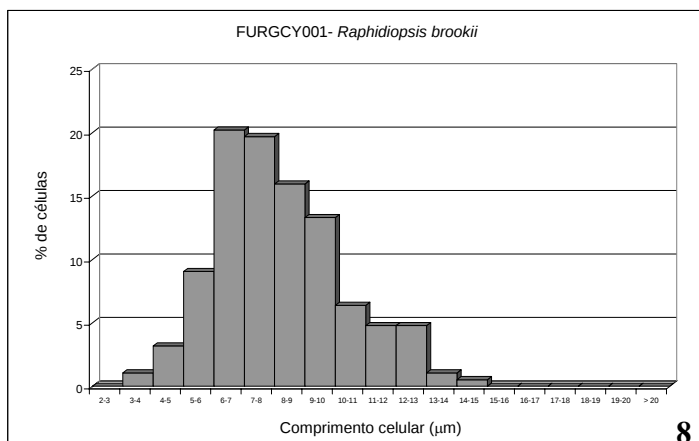


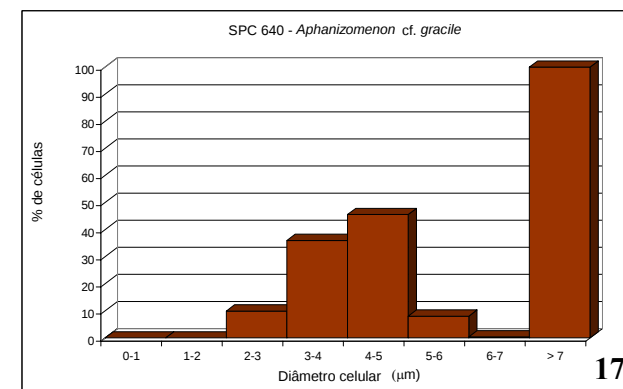
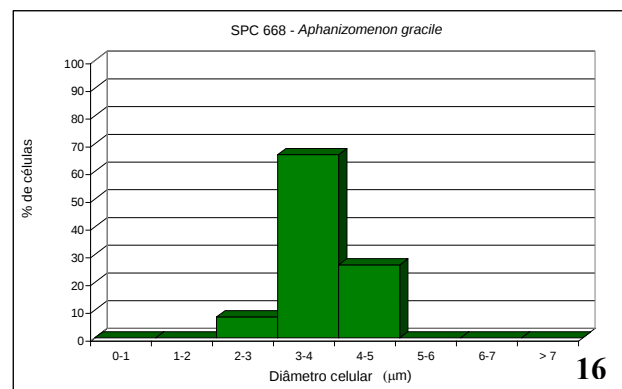
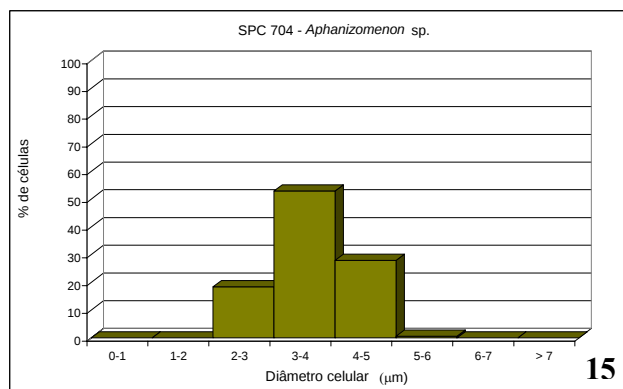
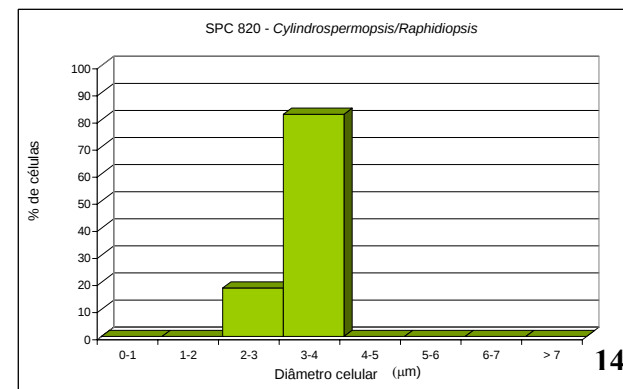
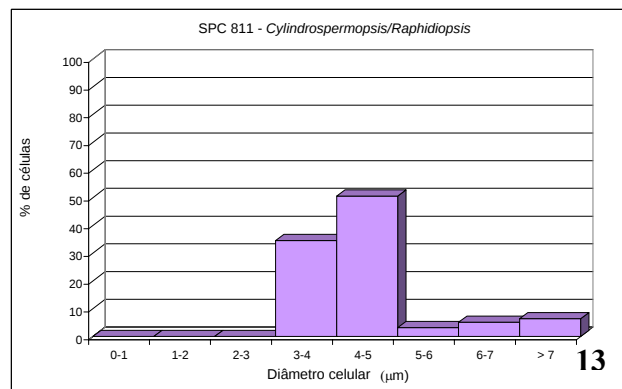
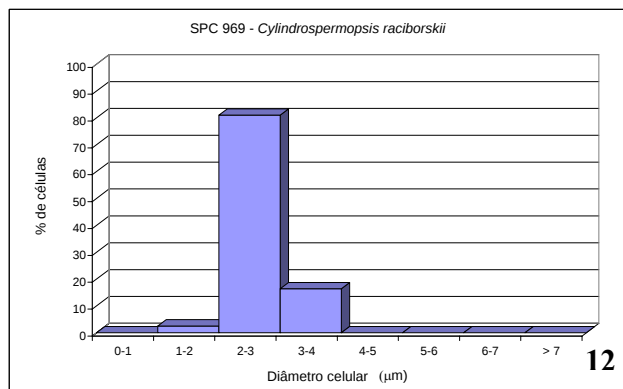
Figura 1: Linhas de tendência da distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classe de tamanho. **A:** Comprimento, **B:** Diâmetro, **C:** Razão Comprimento/Diâmetro ($N \geq 200$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis*; SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*.



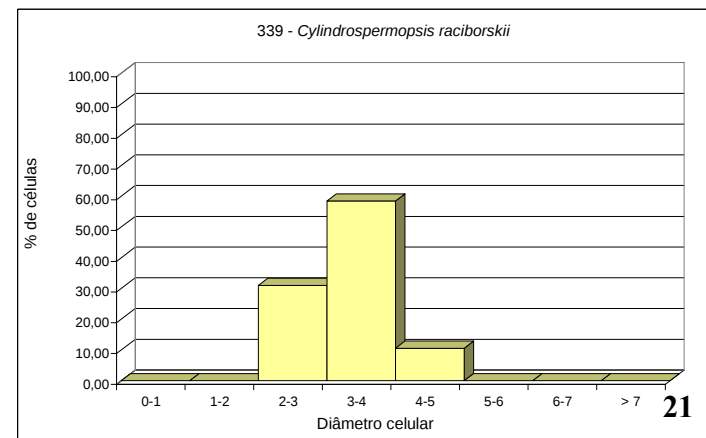
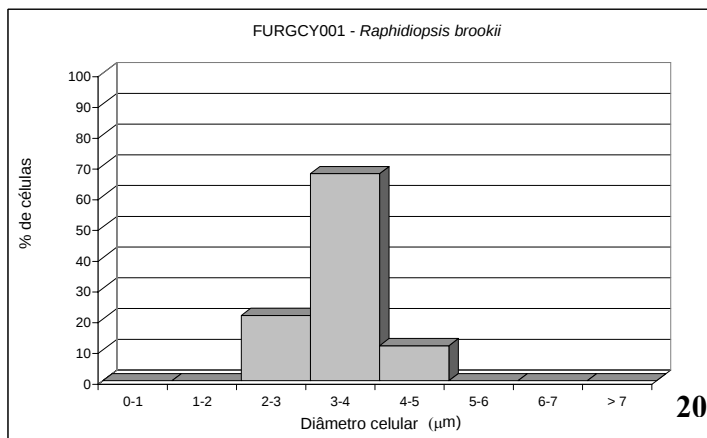
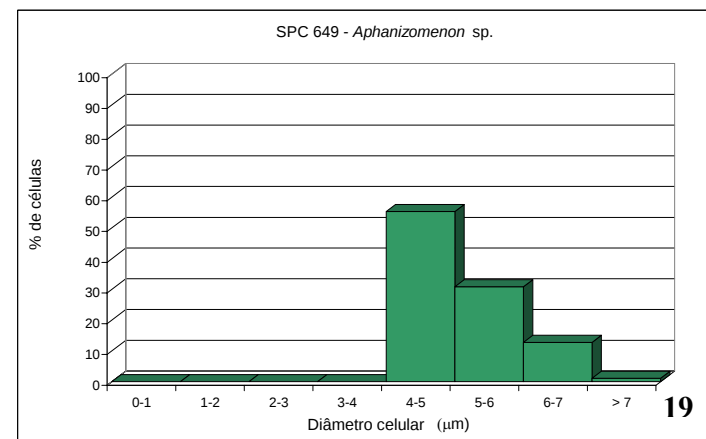
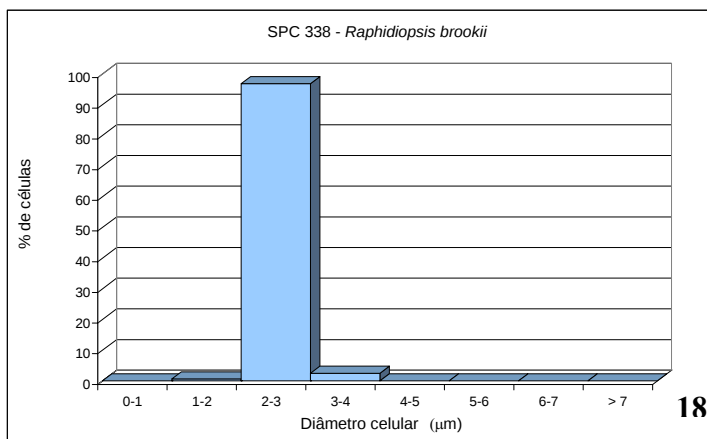
Figuras 2 a 7: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de comprimento celular ($N \geq 200$).



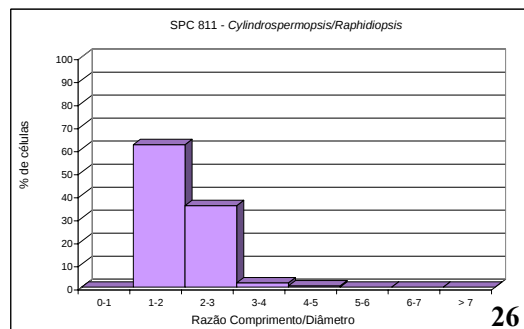
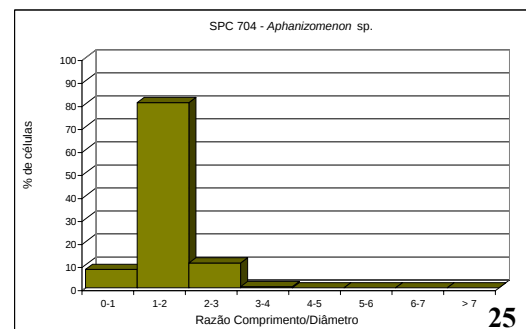
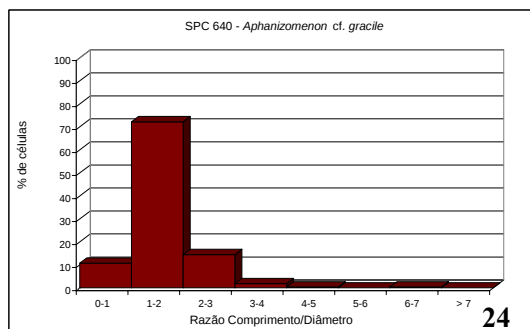
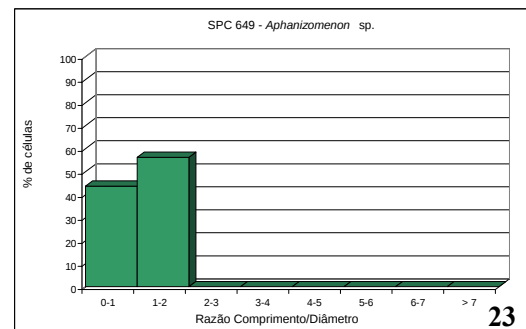
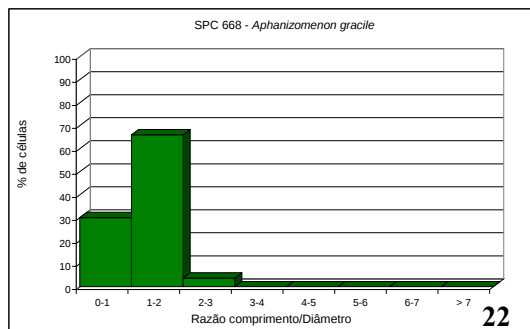
Figuras 8 a 11: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de comprimento celular ($N \geq 200$).



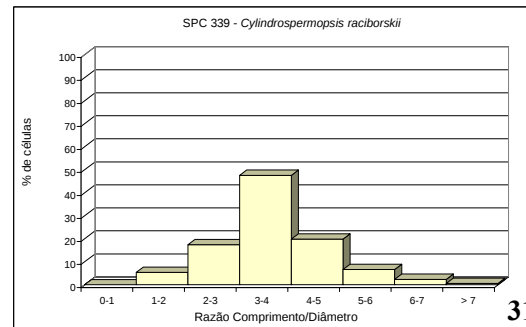
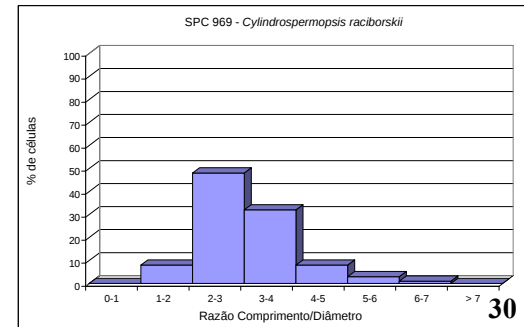
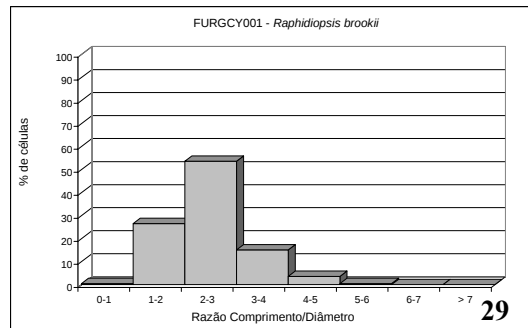
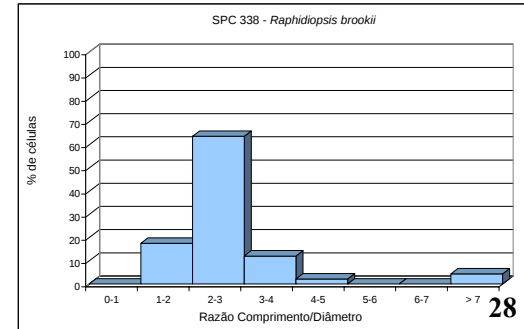
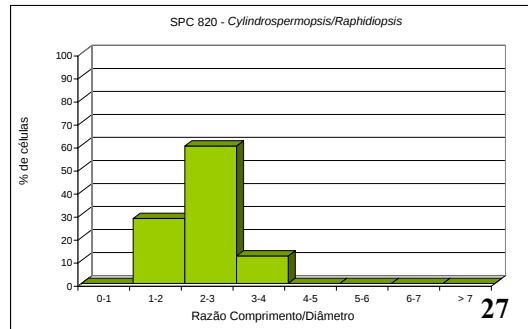
Figuras 12 a 17: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de diâmetro celular ($N \geq 200$).



Figuras 18 a 21: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de diâmetro celular ($N \geq 200$).



Figuras 22 a 26: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de razão comprimento/diâmetro celular ($N \geq 200$).



Figuras 29 a 31: Distribuição da porcentagem de células vegetativas intercalares por classes de razão comprimento/diâmetro celular ($N \geq 200$).

A figura 32 apresenta os limites de variação das dimensões das células vegetativas intercalares, podendo-se observar os limites de sobreposição das variáveis entre as diferentes linhagens.

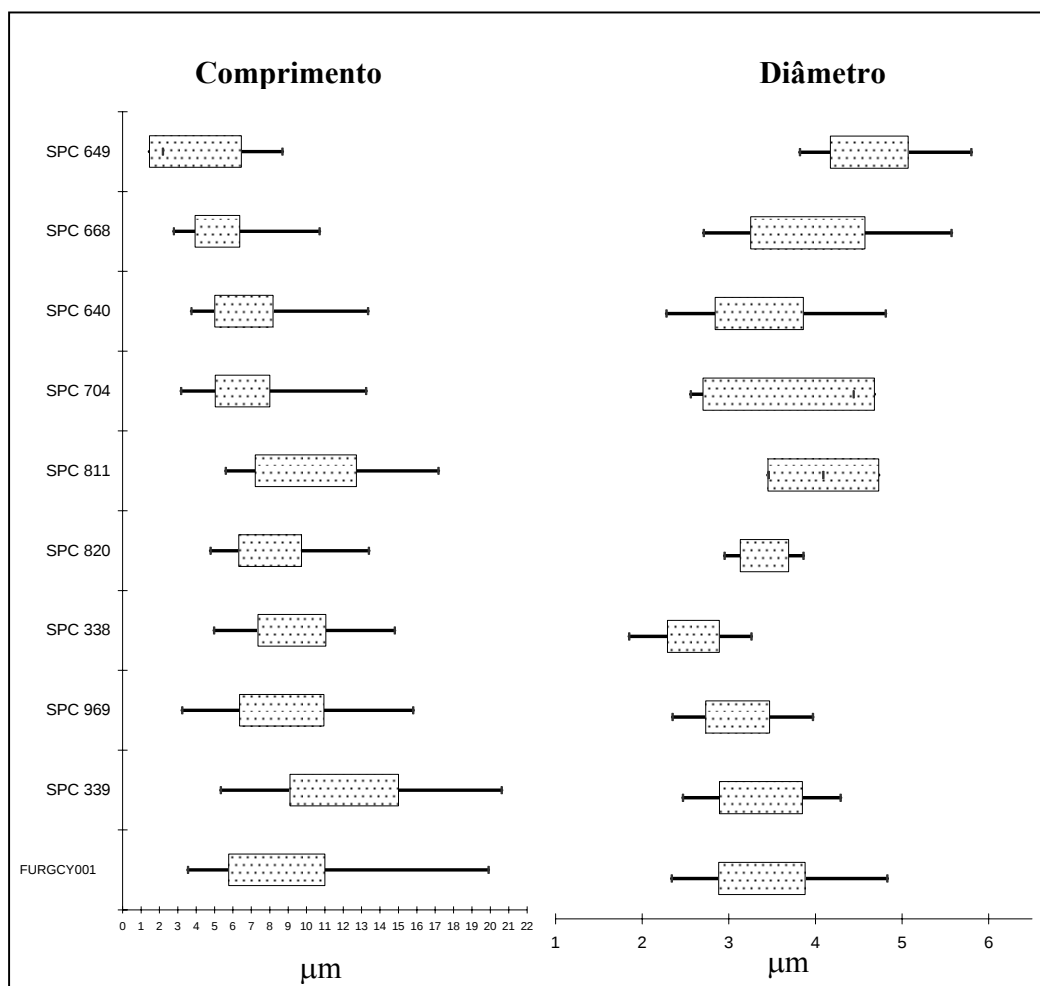


Figura 32: Variação das dimensões das células vegetativas intercalares (retângulo: desvio padrão; linha: limites mínimo e máximo; $N \geq 200$). SPC649, SPC668, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cyndrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cyndrospermopsis*; SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*.

Na figura 33, estão plotados simultaneamente, em um gráfico comparativo, os limites de variação de comprimento e diâmetro das células vegetativas intercalares, novamente indicando a amplitude de variação e a sobreposição das medidas. A figura 34 apresenta, comparativamente, os limites de variação de comprimento e diâmetro das 30 primeiras células da região apical de, no mínimo, 15 tricomas.

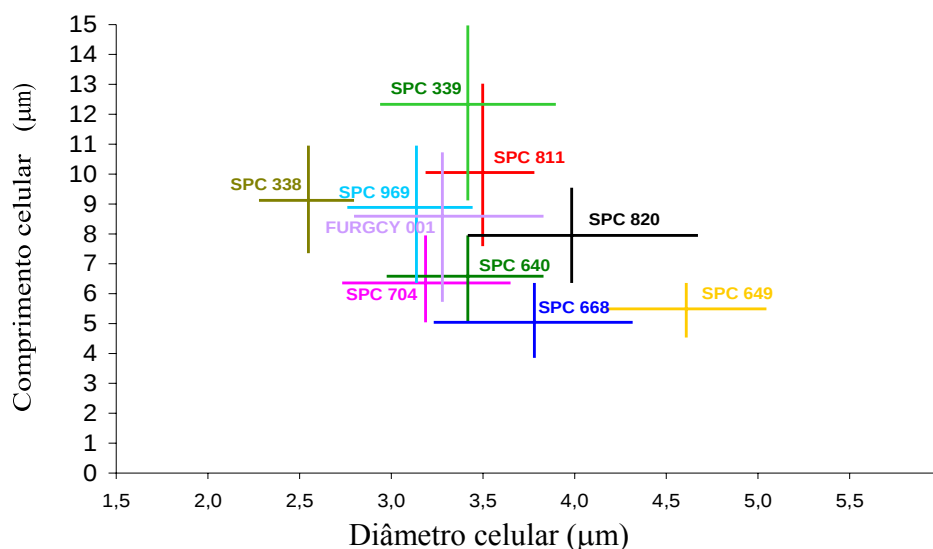


Figura 33: Comprimento e diâmetro das células vegetativas intercalares (limites inferiores: média-desvio padrão; limites superiores: média + desvio padrão; $N \geq 200$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis*; SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*.

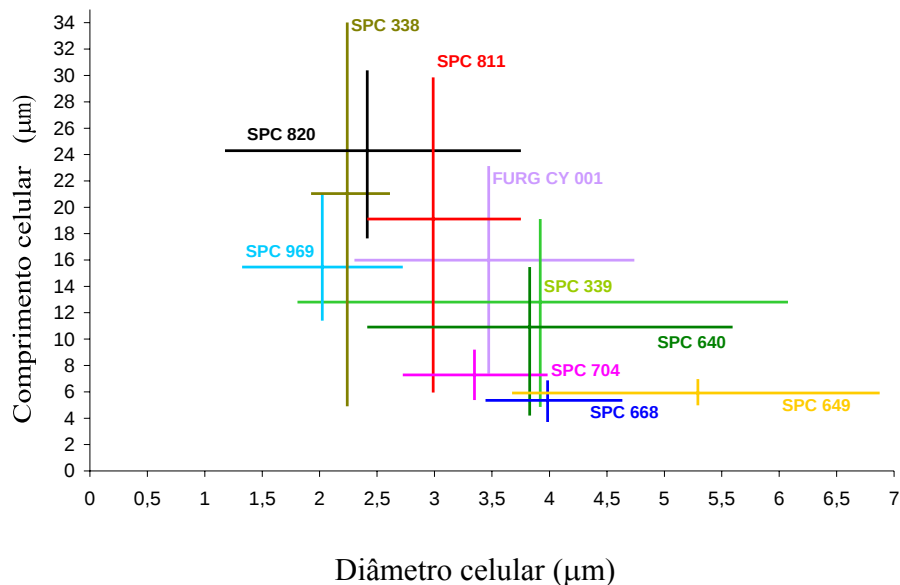
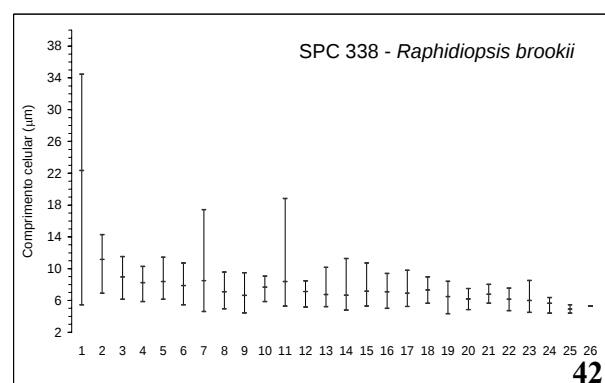
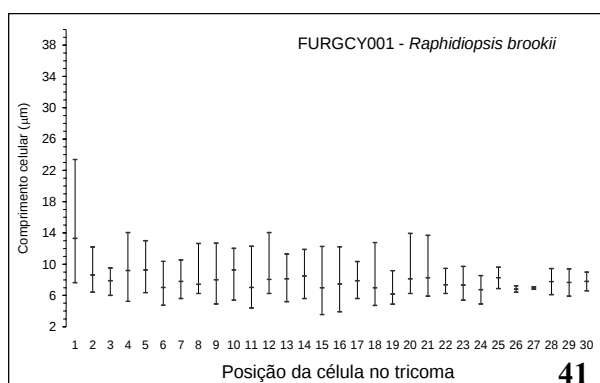
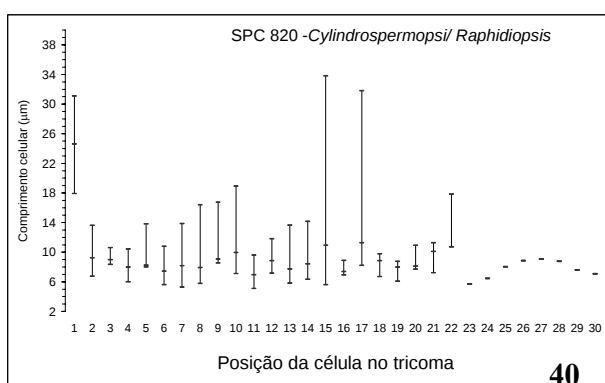
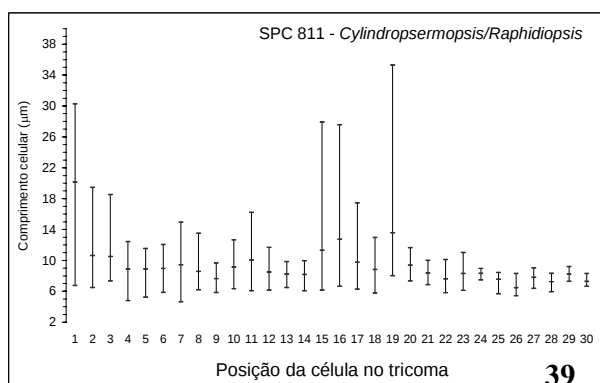
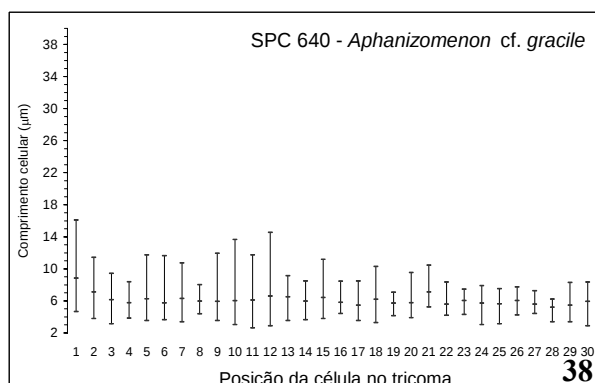
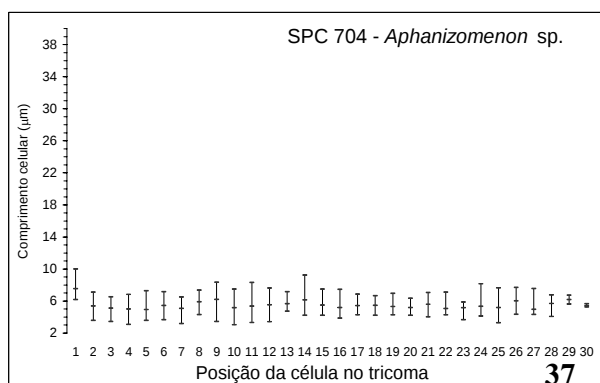
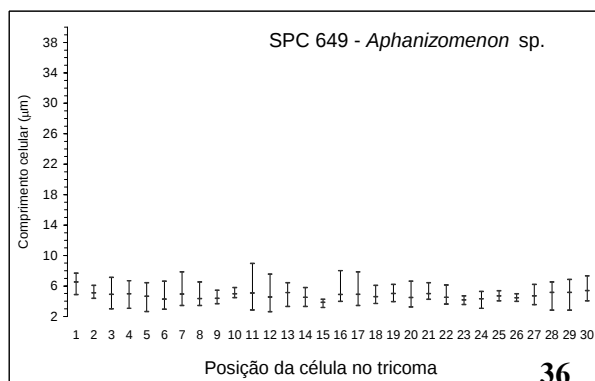
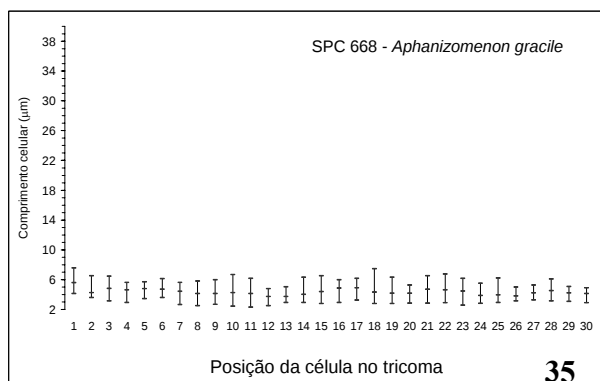


Figura 34: Comprimento e diâmetro das 30 primeiras células da porção apical do tricoma (limites inferiores: média - desvio padrão; limites superiores: média + desvio padrão; $N \geq 15$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis*; SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*.

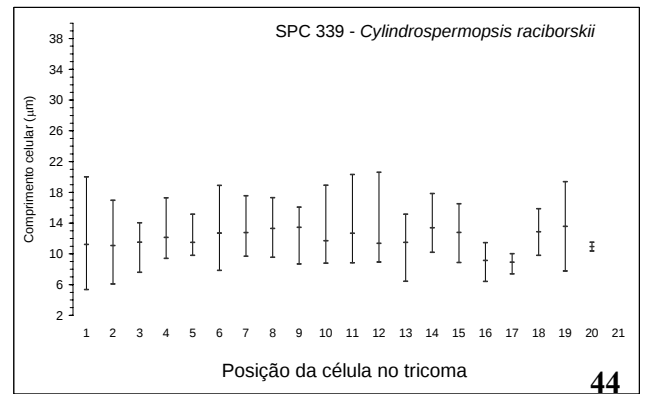
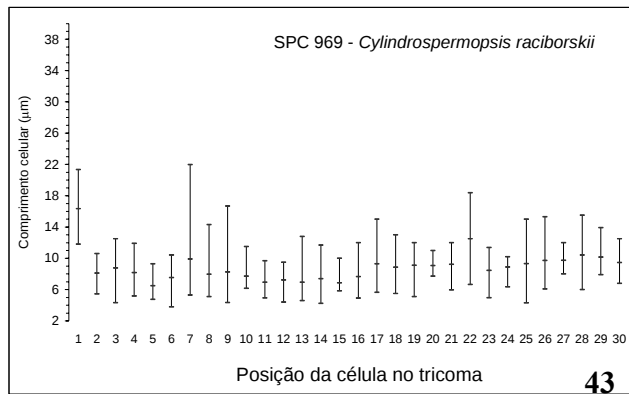
As figuras 35 a 44 apresentam, graficamente, a variação de comprimento das 30 primeiras células da porção apical de 15 tricomas, com os valores médios. As figuras 45 a 54 apresentam a variação de diâmetro das 30 primeiras células da porção apical de 15 tricomas, com os valores médios. A figura 55 ilustra o comprimento médio das 30 células primeiras células da porção apical de 15 tricomas. Observa-se a presença de zona meristemática na linhagem SPC338 (*Raphidiopsis*), ausente nas demais linhagens, e a célula apical alongada comparativamente às demais células nas linhagens do grupo *Cylindrospermopsis-Raphidiopsis* (SPC338, SPC811, SPC820, SPC969 e FURGCY001), à exceção da linhagem SPC339 (*Cylindrospermopsis*). Na figura 56, está ilustrado o diâmetro médio das 30 primeiras células da porção apical de 15 tricomas. As linhagens SPC820 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*) e a linhagem SPC969 (*Cylindrospermopsis*)

apresentam leve estreitamento na região apical. As linhagens SPC338 (*Raphidiopsis*), SPC339 (*Cylindrospermopsis*) e SPC811 (*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*) apresentam a célula apical estreitada.

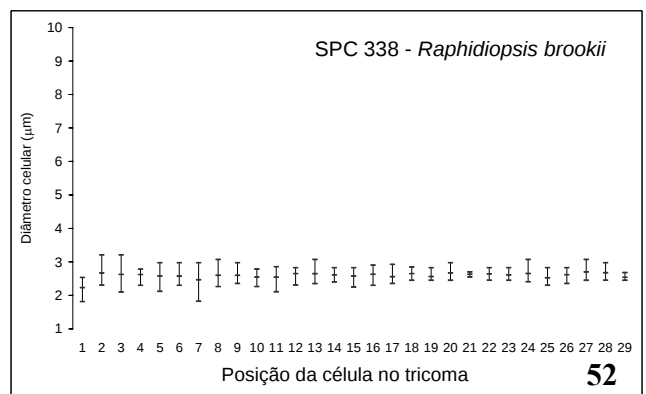
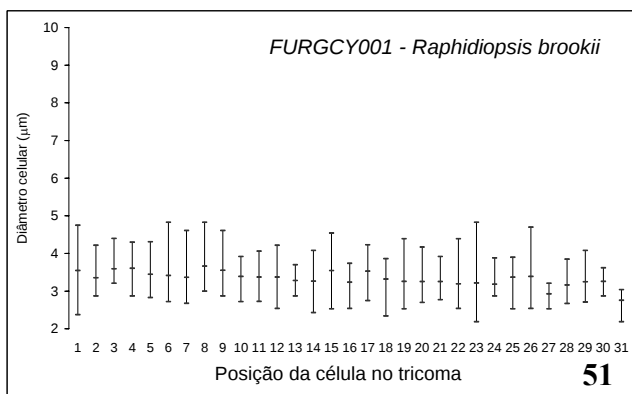
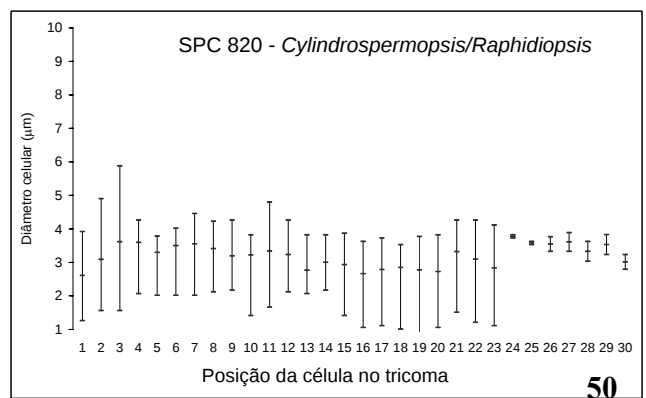
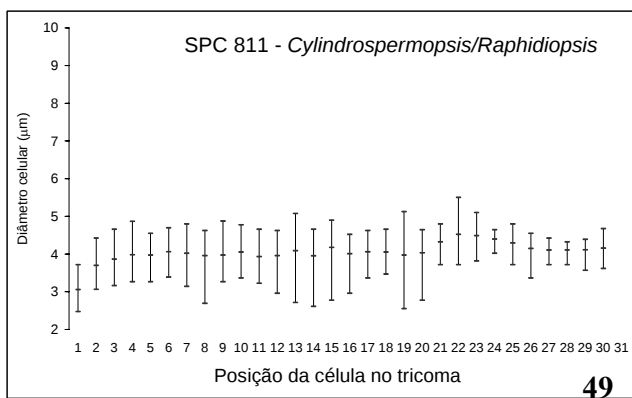
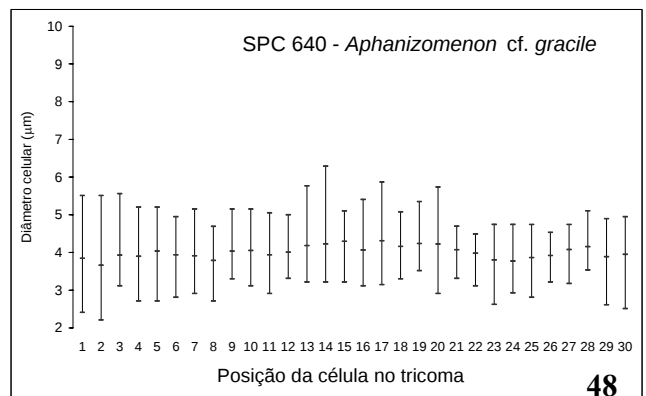
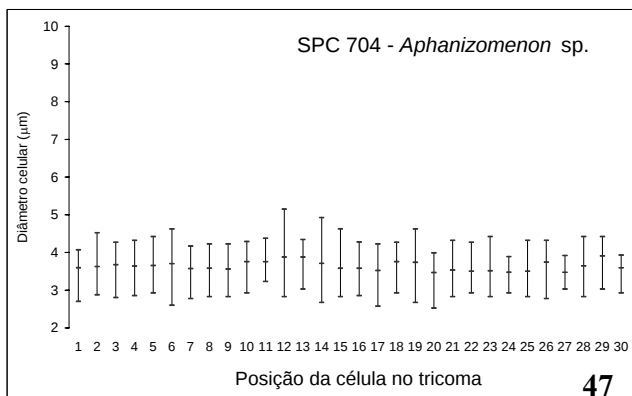
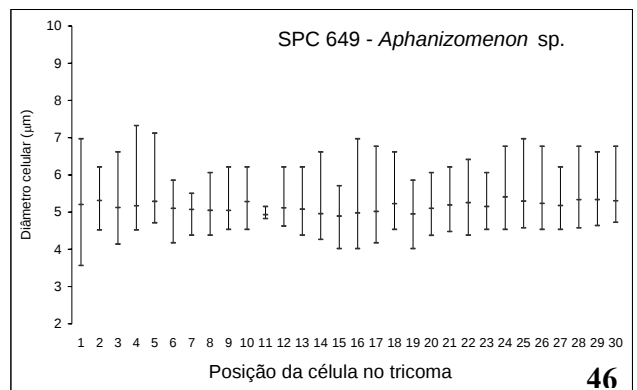
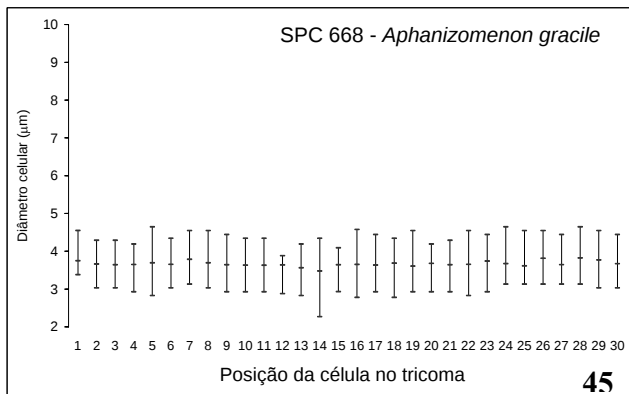
As figuras 57, 58 e 59 apresentam os limites de variação das dimensões das células apicais, heterocitos e acinetos, respectivamente.



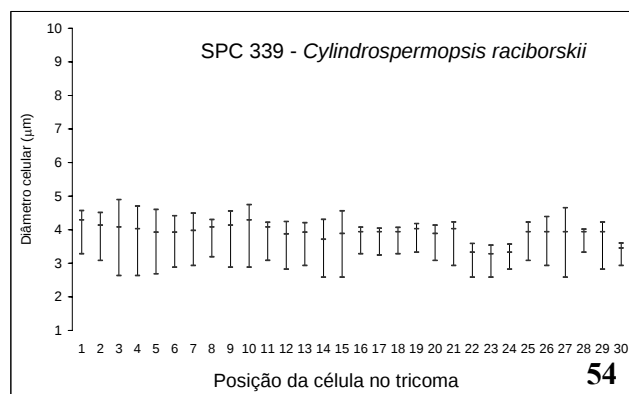
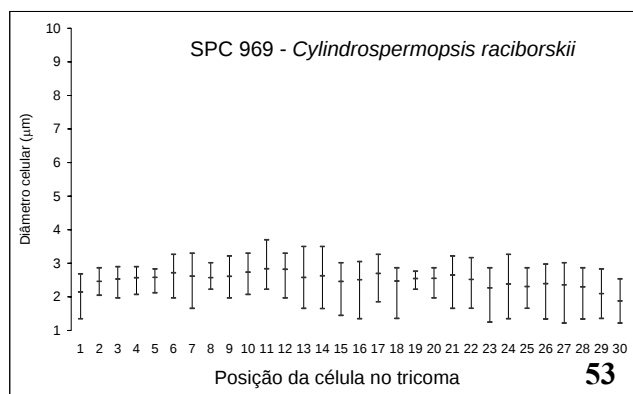
Figuras 35 a 42: Variação do comprimento das células da porção apical do tricoma (μm) (mínimo- médio- máximo, $N \geq 15$).



Figuras 43 a 44: Variação do comprimento das células da porção apical do tricoma (μm) (mínimo- médio- máximo, $N \geq 15$).



Figuras 45 a 52: Variação do diâmetro das células da porção apical do tricoma (μm) (mínimo- médio- máximo, $N \geq 15$).



Figuras 53 e 54: Variação do diâmetro das células da porção apical do tricoma (µm) (mínimo-médio- máximo, $N \geq 15$).

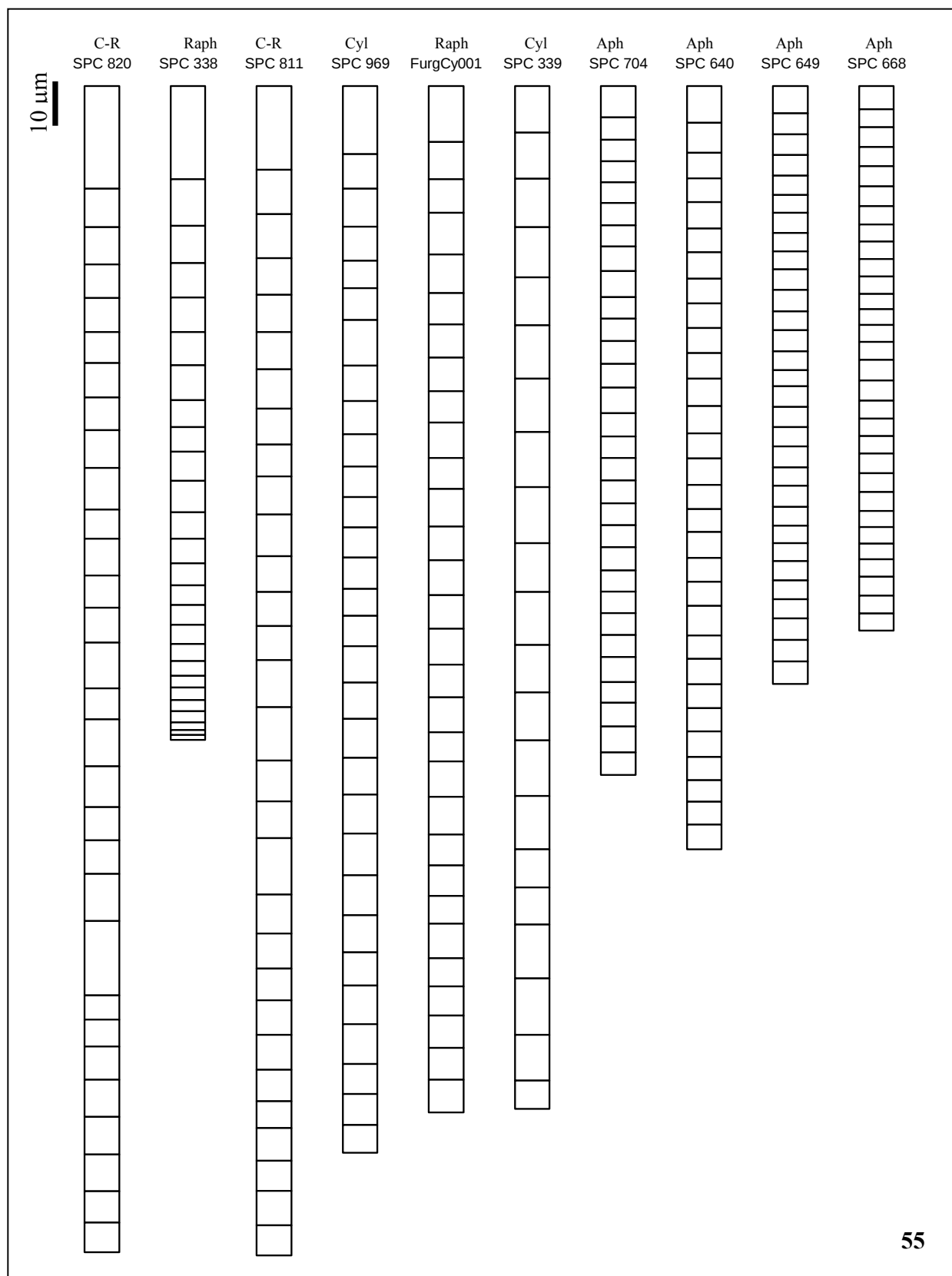


Figura 55: Comprimento médio das 30 primeiras células da porção apical do tricoma ($N \geq 15$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURG CY001: *Raphidiopsis* (Raph).

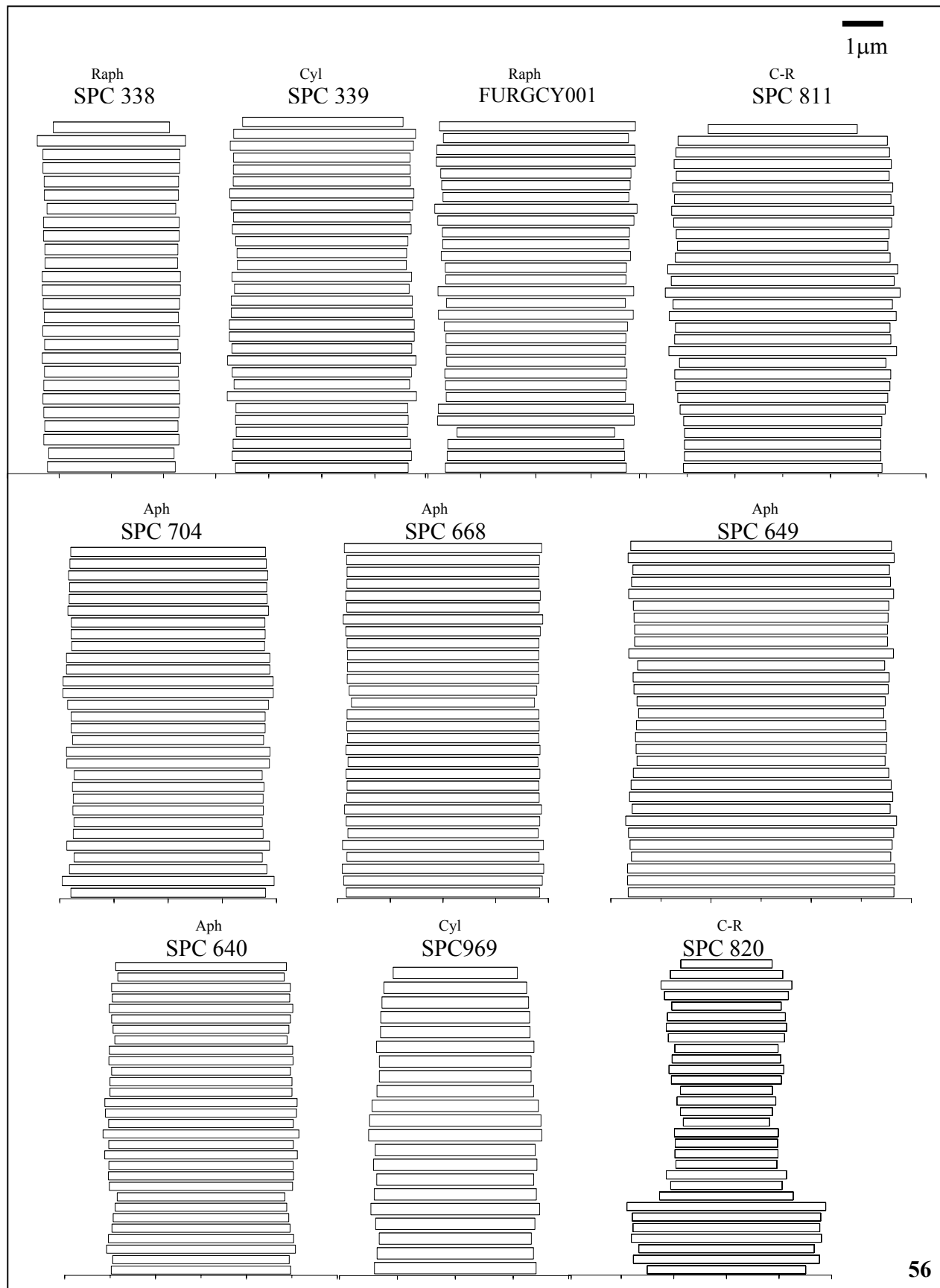


Figura 56: Diâmetro médio das 30 primeiras células da porção apical do tricoma ($N \geq 15$), SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis*; SPC338 e FURG CY001: *Raphidiopsis*.

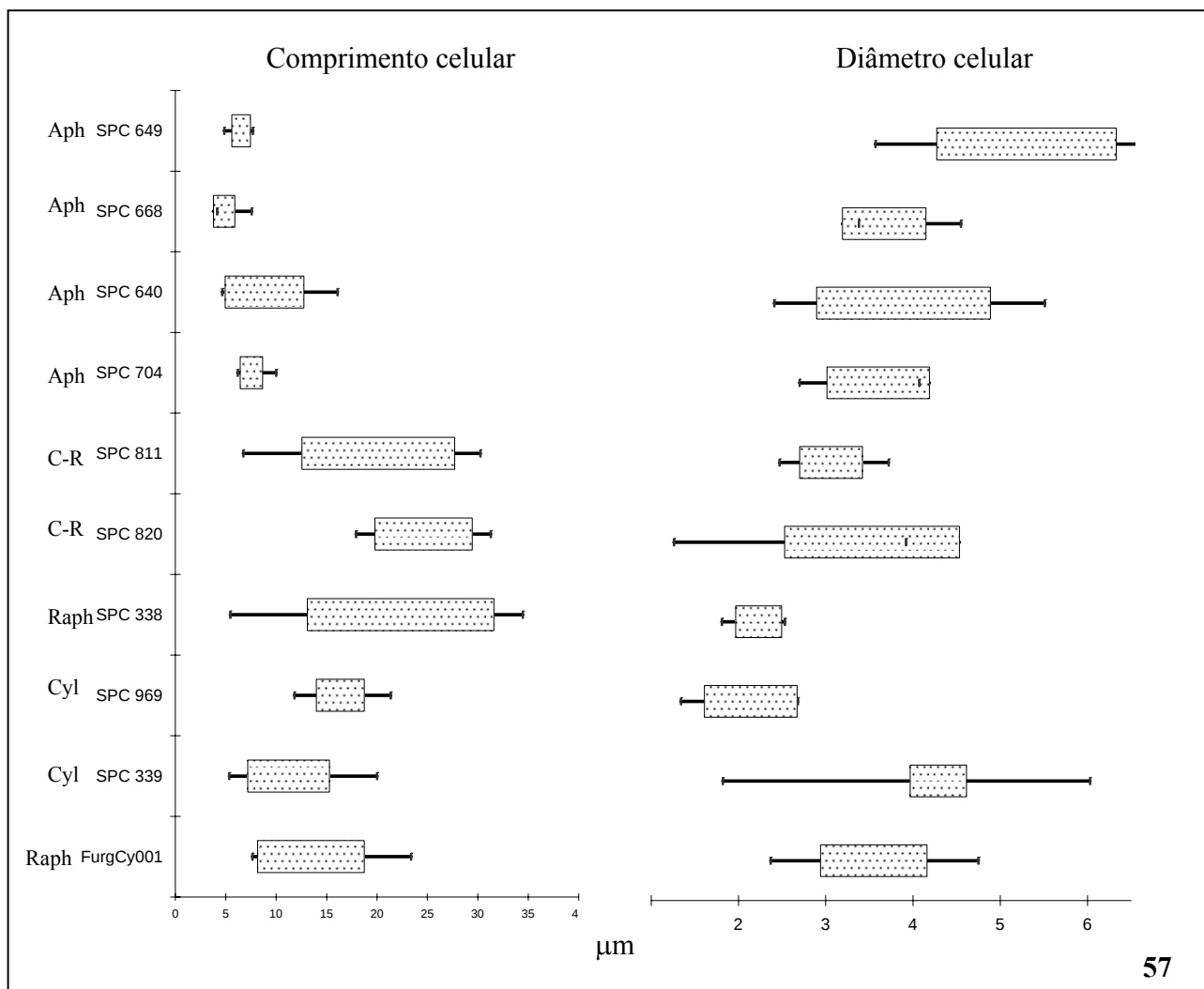


Figura 57: Variação das dimensões da primeira célula apical (retângulo: desvio padrão; linha: limites mínimo e máximo; $N \geq 15$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*(Raph).

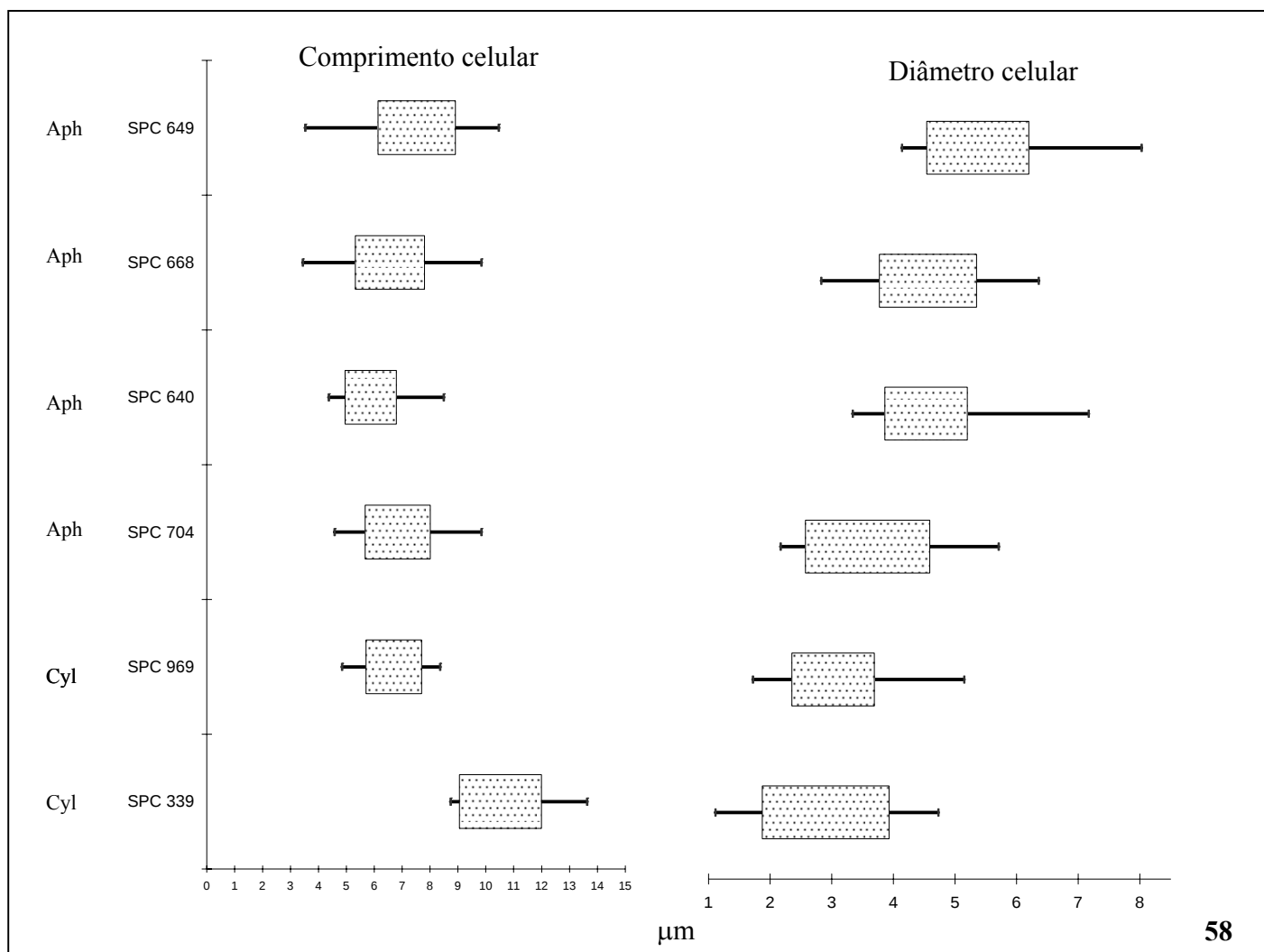


Figura 58: Variação das dimensões dos heterocitos (retângulo: desvio padrão; linha: limites mínimo e máximo; $N \geq 20$). SPC649, SPC668, SPC640 e SPC704: *Aphanizomenon* (Aph); SPC969 e SPC339: *Cylindrospermopsis* (Cyl).

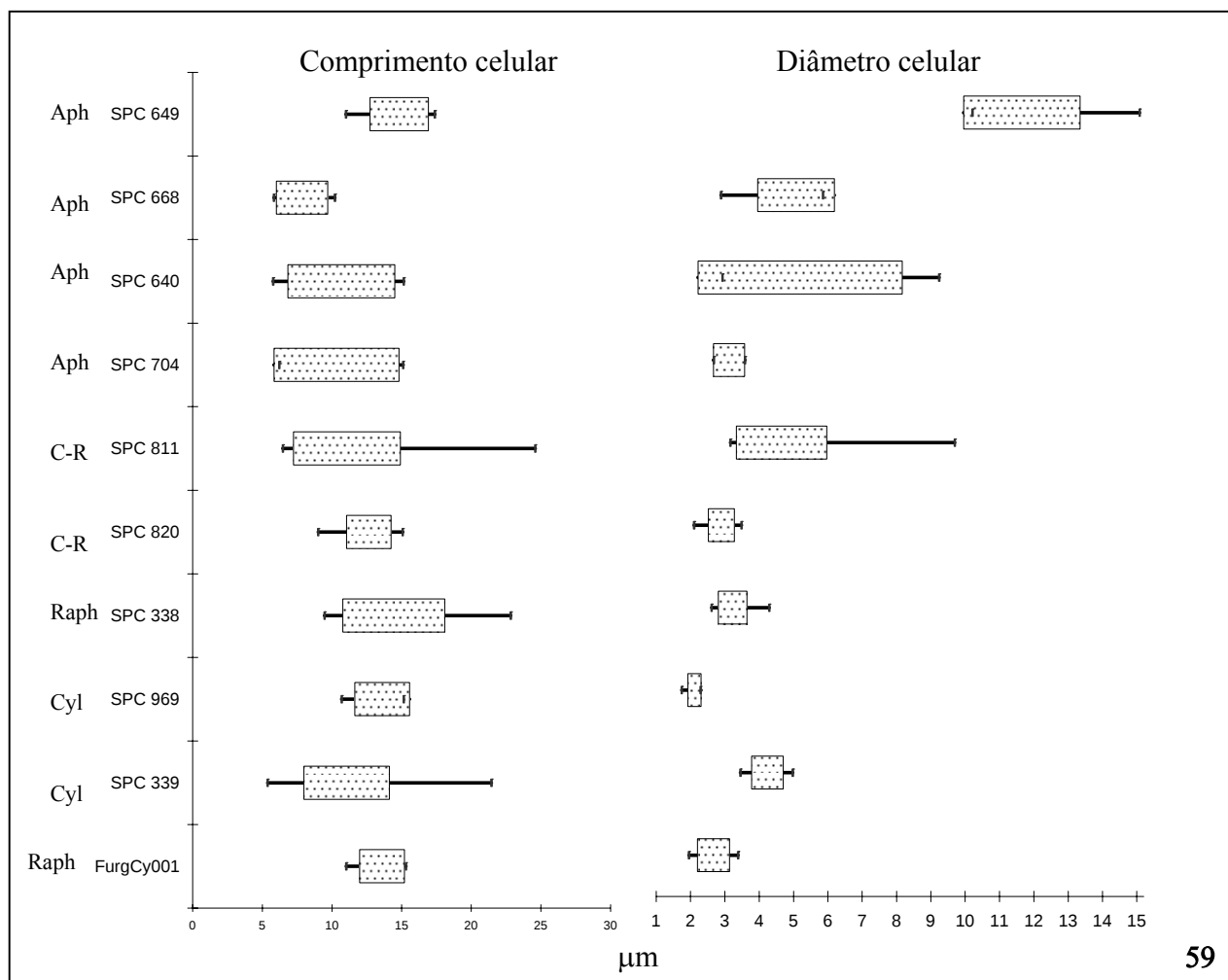


Figura 59: Variação das dimensões dos acinetos (retângulo: desvio padrão; linha: limites mínimo e máximo; $N \geq 10$).). SPC649, SPC668, SPC640 e SPC704: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC969 e SPC339: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURG CY001: *Raphidiopsis* (Raph).

4.3. Testes de comparação múltipla

As tabelas 11 a 18 apresentam os resultados dos testes de comparação múltipla. As variáveis métricas apresentaram-se significativamente diferentes ($p < 0,01$) entre as linhagens em quase todos os casos, com uma exceção: a razão comprimento/diâmetro da célula apical não resultou em diferenças significativas entre as linhagens do grupo *Cylindrospermopsis-Raphidiopsis*.

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640	+	+		+	—	+	+	+	+	+
Aph	SPC 668	—	+	+		+	+	+	+	—	+
C-R	SPC 811	+	+	+	+		+	+	+	+	+
C-R	SPC 820	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Cyl	SPC 339	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Cyl	SPC 969	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Raph	FURGCY001	+	+	+	+	+	+	+	—		+
Raph	SPC 338	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabela 11. Teste de Dunn para as células vegetativas intercalares (comprimento na porção superior direita, diâmetro na porção inferior esquerda do gráfico, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 200$).). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis* (Raph).

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704			+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640				+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 668					+	+	+	+	+	+
C-R	SPC 811						+	+	+	+	+
C-R	SPC 820							+	+	+	+
Cyl	SPC 339								+	+	+
Cyl	SPC 969									+	+
Raph	FURGCY001										+
Raph	SPC 338										

Tabela 12. Teste de Dunn para as células vegetativas intercalares (razão comprimento:diâmetro, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 200$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis* (Raph).

		Cyl	Aph	Aph	Aph	Aph
	Linhagem	SPC 969	SPC 649	SPC 668	SPC 704	SPC 640
Cyl	SPC 969		+	+	+	+
Aph	SPC 649	+		+	+	+
Aph	SPC 668	+	+		+	+
Aph	SPC 704	+	—	+		—
Aph	SPC 640	+	+	+	+	

Tabela 13. Teste de Dunn para os heterocitos (comprimento na porção superior direita, diâmetro na porção inferior esquerda do gráfico, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p<0,01$, $N\geq 20$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl).

		Cyl	Aph	Aph	Aph	Aph
	Linhagem	SPC 969	SPC 649	SPC 668	SPC 704	SPC 640
Cyl	SPC 969		+	+	+	+
Aph	SPC 649			+	+	+
Aph	SPC 668				+	+
Aph	SPC 704					+
Aph	SPC 640					

Tabela 14. Teste de Dunn para os heterocitos (razão comprimento:diâmetro, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p<0,01$, $N\geq 20$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl).

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704	+		+	—	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640	+	—		+	+	+	+	—	+	+
Aph	SPC 668	+	+	+		+	+	+	+	+	+
C-R	SPC 811	+	+	+	+		+	+	+	+	+
C-R	SPC 820	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Cyl	SPC 339	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Cyl	SPC 969	+	+	+	—	+	+	+		+	+
Raph	FURG CY001	+	+	+	+	—	+	+	+		+
Raph	SPC 338	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabela 15. Teste de Dunn para os acinetos (comprimento na porção superior direita, diâmetro na porção inferior esquerda do gráfico, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 10$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURG CY001: *Raphidiopsis* (Raph).

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704			+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640				+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 668					+	+	+	+	+	+
C-R	SPC 811						+	+	+	+	+
C-R	SPC 820							+	+	+	+
Cyl	SPC 339								+	+	+
Cyl	SPC 969									+	+
Raph	FURGCY001										+
Raph	SPC 338										

Tabela 16. Teste de Dunn para os heterocitos (razão comprimento:diâmetro, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 10$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis* (Raph).

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640	+	—		—	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 668	+	+	+		+	+	+	+	+	+
C-R	SPC 811	+	+	+	+		+	+	+	+	+
C-R	SPC 820	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Cyl	SPC 339	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Cyl	SPC 969	+	+	+	+	+	+	+		+	—
Raph	FURGCY001	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Raph	SPC 338	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabela 17. Teste de Dunn para as células apicais (comprimento na porção superior direita, diâmetro na porção inferior esquerda do gráfico, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 15$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis* (Raph).

		Aph	Aph	Aph	Aph	C-R	C-R	Cyl	Cyl	Raph	Raph
	Linhagem	SPC 649	SPC 704	SPC 640	SPC 668	SPC 811	SPC 820	SPC 339	SPC 969	FURG CY001	SPC 338
Aph	SPC 649		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 704			+	+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 640				+	+	+	+	+	+	+
Aph	SPC 668					+	+	+	+	+	+
C-R	SPC 811						—	—	—	—	—
C-R	SPC 820							—	—	—	—
Cyl	SPC 339								—	—	—
Cyl	SPC 969									—	—
Raph	FURGCY001										—
Raph	SPC 338										

Tabela 18. Teste de Dunn para as células apicais (razão comprimento:diâmetro, amarelo=diferenças não significativas entre as linhagens, branco=diferenças significativas, $p < 0,01$, $N \geq 15$). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon* (Aph); SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* (C-R); SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis* (Cyl); SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis* (Raph).

4.4. Análise de Componentes Principais

Na análise de componentes principais (figura 60), 79,82% da variabilidade dos dados está relacionada ao primeiro eixo de ordenação (tabela 19). As linhagens posicionadas do lado negativo do eixo (SPC649, SPC640, SPC668 e SPC704), todas pertencentes ao gênero *Aphanizomenon*, estão associadas a maiores valores médios do diâmetro da célula apical (SPC640, SPC668 e SPC704) e do diâmetro do acineto (SPC649). As linhagens agrupadas do lado positivo do eixo (SPC969, SPC811, SPC338, SPC820), todas pertencentes ao complexo *Cylindrospermopsis-Raphidiopsis*, estão associadas a maiores valores médios do comprimento da célula apical e da razão comprimento/diâmetro da mesma (SPC338=*Raphidiopsis* e SPC820=*Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*), bem como a maiores valores médios da razão comprimento/diâmetro das células vegetativas e do acineto (SPC811= *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis* e

SPC969=*Cylindropermopsis*).

Com relação às linhagens SPC339 (*Cylindropermopsis*) e FURGCY001 (*Raphidiopsis*), as variáveis analisadas não foram suficientes para posicioná-las em nenhum dos dois grupos acima mencionados.

Tabela 19: Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis morfológicas e métricas das linhagens e o primeiro eixo de ordenação (em negrito, as variáveis consideradas).

Variável	Abreviação	Componente Principal
		Eixo 1
Comprimento das células vegetativas	CVC	0,585
Diâmetro das células vegetativas	CVD	-0,495
Razão comprimento/diâmetro das células vegetativas	CVR	0,619
Comprimento do acineto	ACC	0,453
Diâmetro do acineto	ACD	-0,564
Razão comprimento/diâmetro do acineto	ACR	0,715
Morfologia apical	Ápices	-0,096
Morfologia da célula apical	CelAp	-0,521
Posição do acineto	PosAc	-0,007
Comprimento da célula apical	CélApC	0,992
Diâmetro da célula apical	CélApD	-0,683
Razão comprimento/diâmetro da célula apical	CélApR	0,971
Total de explicabilidade:		79,82%

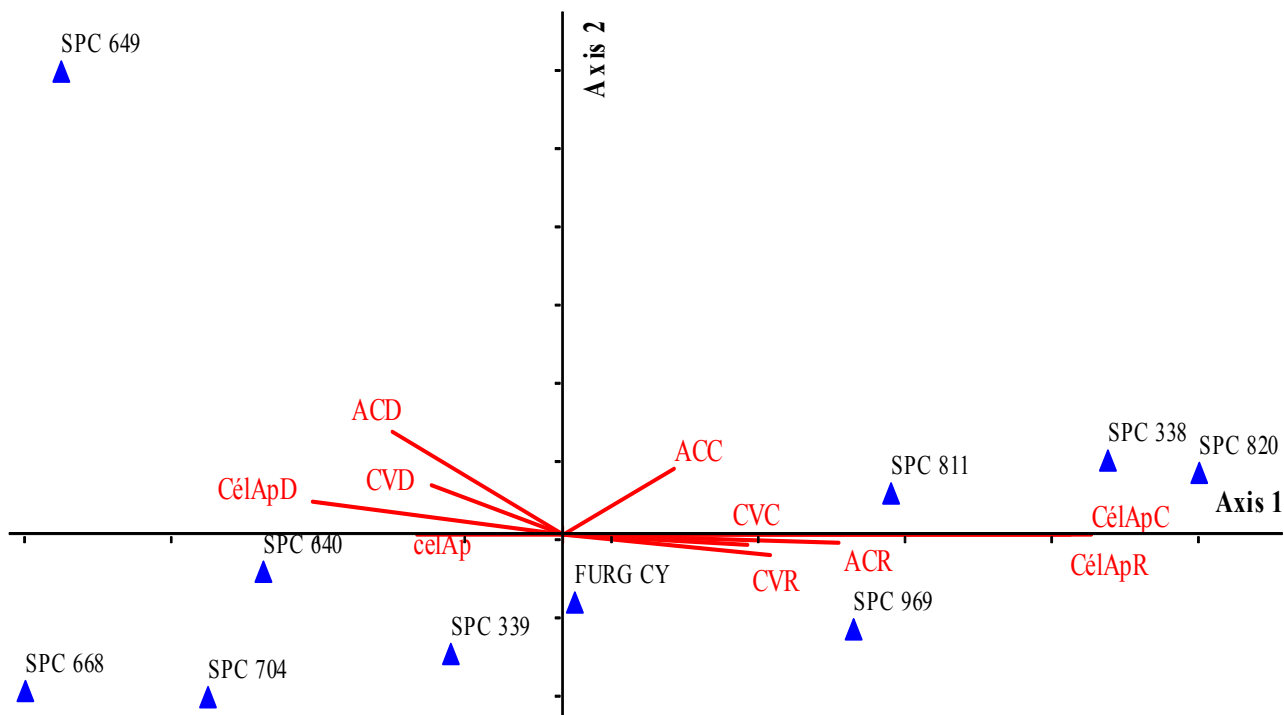


Figura 60: Ordenação biplot, pela ACP, das linhagens estudadas e suas características métricas e morfológicas.). SPC649, SPC704, SPC640 e SPC668: *Aphanizomenon*; SPC811 e SPC820: *Cylindrospermopsis* ou *Raphidiopsis*; SPC339 e SPC969: *Cylindrospermopsis*; SPC338 e FURGCY001: *Raphidiopsis*. CVC: comprimento das células vegetativas; CVD: diâmetro das células vegetativas; CVR: razão comprimento/diâmetro das células vegetativas; ACC: comprimento dos acinetos; ACD: diâmetro dos acinetos; ACR: razão comprimento/diâmetro dos acinetos; CélApC: comprimento da célula apical; CélApD: diâmetro da célula apical; CélApR: razão comprimento/diâmetro da célula apical; celAp: morfologia da célula apical.

5. Discussão

Segundo Hoffmann (1988), as características citomorfológicas quantitativas não são adequadas para a distinção de gêneros de cianobactérias, pois, estando sujeitas a um contínuo de variabilidade, não permitem a delimitação de entidades discretas. Assim sendo, a classificação genérica deveria privilegiar características qualitativas estáveis. Em nível de espécie, o autor considera as características quantitativas apropriadas somente no caso de apresentarem uma descontinuidade inequívoca.

No presente estudo, todas as linhagens apresentaram grande plasticidade morfológica e morfométrica, não sendo possível, muitas vezes, atribuir tricomas isolados a um determinado gênero. Porém, quando da avaliação estatística de cada cepa como população, quase todas as variáveis morfométricas estudadas apresentaram diferenças significativas entre linhagens. Tais diferenças, porém, não permitem a reunião de cepas pertencentes ao mesmo gênero por critérios morfométricos, à exceção da razão comprimento/diâmetro da célula apical, que possibilitou o agrupamento de todas as linhagens pertencentes ao complexo *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*. Assim sendo, este constitui caráter útil na distinção dos gêneros *Aphanizomenon* de um lado e *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* do outro. Com relação à circunscrição de espécies, as características morfométricas não foram úteis na delimitação das mesmas, uma vez que apresentaram descontinuidade em nível subespecífico.

Entre as características qualitativas, a morfologia da célula apical e a morfologia da porção terminal do tricoma são consideradas características estáveis em populações naturais (Komárek & Kovácik 1989, Rajaniemi *et al.* 2005) e empregadas como diacríticas na separação dos gêneros *Aphanizomenon* e *Anabaena*. Komárek e Kovácik (1989) discutem,

contudo, que as espécies de *Aphanizomenon* com célula apical não alongada e não hialina e porção terminal do tricoma estreitada (*Aphanizomenon manguinii*, *A. ovalisporum*, *A. gracile*) podem ser confundidas com espécies de *Anabaena* de morfologia semelhante (*Anabaena bergii*, *A. minderii*). Neste caso, os autores recomendam a utilização de outros critérios para diferenciar os gêneros, em especial a estrutura metamérica do tricoma característica de *Anabaena* em contraposição à estrutura subsimétrica de *Aphanizomenon*. No caso das linhagens de *Aphanizomenon* estudadas, a linhagem SPC649 (Prancha 1) apresentou, em condições normais de cultivo (meio ASM1), características morfológicas de *Aphanizomenon gracile*, em especial a célula apical não vacuolizada e levemente capitada (Prancha 1, Figura 13). Todavia, essa característica não foi constante, pois a linhagem apresentou, igualmente, tricomas com células apicais cônicas e mais ou menos hialinas (Prancha 1, Figuras 16 a 22). Assim sendo, e pelo fato de apresentar mais de três heterocitos em cadeia (Prancha 1, Figura 2), a cepa não se enquadra claramente em nenhuma das espécies listadas por Komárek & Kovácik (1989), descritas como possuindo heterocitos em número de um a três em posição irregular no tricoma. Em condições de cultura com meio alterado (redução da fonte de nitrogênio), a linhagem SPC649 apresentou características típicas de *Anabaena*: estrutura metamérica do tricoma (Prancha 1, Figura 42) e células vegetativas e apicais esféricas (Prancha 1, Figuras 14, 15 e 28). Portanto, os caracteres usualmente usados na distinção dos gêneros não são robustos e estáveis, dependendo, em alguns casos, das condições ambientais.

A linhagem SPC704, também classificada como *Aphanizomenon*, apresentou igualmente alterações morfológicas profundas quando da modificação do meio de cultura. Em condições normais, seus heterocitos se desenvolveram intercaladamente no tricoma (Prancha 2, Figuras 29 a 37). Em condições de redução da fonte de nitrogênio, a cepa

desenvolveu os heterocitos tipicamente terminais, cônicos e com um poro, do gênero *Cylindrospermopsis* (Prancha 2, Figuras 41 e 42). Deste modo, o tipo de desenvolvimento do heterocito tampouco parece ser um caráter diacrítico estável.

Por fim, nenhuma das quatro linhagens de *Aphanizomenon* estudadas apresentou estreitamento terminal do tricoma.

Com relação às linhagens do complexo *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*, a identificação de duas linhagens (SPC339 e SPC969, Pranchas 7 e 8, respectivamente) dependeu do desenvolvimento de heterocitos terminais cônicos com um poro, característica diacrítica de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Na ausência dos mesmos, nenhuma outra característica foi capaz de distinguir entre os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, fato já observado anteriormente por inúmeros autores em populações naturais. Assim, as linhagens SPC811 e SPC820 (Pranchas 5 e 6), anteriormente identificadas como *Cylindrospermopsis* (identificação constante no banco de dados da Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica), não se diferenciaram morfológicamente das linhagens identificadas como *Raphidiopsis* (FURGCY001 e SPC338, Pranchas 9 e 10, respectivamente), nem das linhagens SPC339 e SPC969 (*Cylindrospermopsis raciborskii*). Como não produziram heterocitos, sua atribuição a um ou outro gênero permanece em aberto.

Em condições de disponibilidade reduzida de nitrogênio, a linhagem SPC 969 produziu, além dos heterocitos terminais característicos do gênero, heterocitos intercalares (Prancha 8, Figuras 17 e 18). Deste modo, a característica diacrítica do gênero não se mantém em determinadas condições de cultivo, observação já realizada anteriormente por Shafik (2003).

Com relação a *Raphidiopsis*, Komárek (1989) menciona a produção de acinetos

solitários pelo gênero. Contudo, vários autores já haviam referido a formação de dois ou mais acinetos em cadeia, observação confirmada no presente trabalho (Prancha 10, Figura 15).

Para finalizar, a linhagem SPC338 (Prancha 10), identificada (porém não ilustrada) em estudos toxicológicos como *C. raciborskii* (Lagos *et al.* 1999), ou como “cultura mista de espécies de *Cylindrospermopsis raciborskii*” (Castro *et al.* 2004.), não desenvolveu heterocitos sob as condições reduzidas de disponibilidade de nitrogênio. Segundo critérios morfológicos trata-se, portanto, de linhagem pertencente ao gênero *Raphidiopsis*.

6. Conclusões

As conclusões do presente trabalho podem ser resumidas da seguinte maneira:

1. Embora a literatura não considere as características citomorfológicas quantitativas adequadas para a distinção de gêneros de cianobactérias, no caso da circunscrição dos gêneros *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis*, a razão comprimento/diâmetro da célula apical permitiu, na ausência de heterocitos, diferenciar os dois grupos.
2. As características diacríticas qualitativas usadas na distinção dos gêneros *Aphanizomenon* e *Anabaena* não são estáveis, pois linhagens de *Aphanizomenon* desenvolvem características típicas de *Anabaena* dependendo das condições do meio ambiente.
3. Nenhum outro marcador morfológico além dos heterocitos foi capaz de diferenciar os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, corroborando as observações de vários autores em populações naturais.
4. A característica diacrítica do gênero *Cylindrospermopsis*, heterocitos exclusivamente apicais, não se mantém em condições de cultura.

7. Referências bibliográficas

- Anand, N.** 1988. Culture studies and taxonomy of blue-green algae-certain identification problems. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80:141-7.
- Bazzichelli, G. & Abdelahad, N.** 1994. Caractérisation morphométrique et statistique de deux populations d'*Aphanizomenon* du groupe *Aphanizomenon ovalisporum* FORTI des lacs Nemi et Albano (Italie). Algological Studies 73:1-21.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Kryš, S. & Fontaine, J.J.** 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. Environmental Toxicology 18(3):176 – 186.
- Branco, C.W.C. & Senna, P.A.C.** 1991. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique 61:85-91.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Coute, A. & Bernard, C.** 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. Water Research 36(13):3183-3192.
- Briand, J.F., Le Boulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C. & Dufour, P.** 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming? Journal of Phycology 40(2): 231–238.
- Burford, M.A., McNeale, K.L. & McKenzie-Smith, F.J.** 2006. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. Freshwater Biology 51(11):2143-2153.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcia, C. & Vasquez, M.** 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. - Toxicon 44:483-9.
- Chen, Y., Liu, J. & Yang W.** 2003. Effect of *Aphanizomenon flos-aquae* toxins on some blood physiological parameters in mice. Wei Sheng Yan Jiu 32(3):195-197.
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W. & Theeragool, G.** 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan.- FEMS Microbiol Ecol

48 (3): 345-355.

- Cronberg, G.** 1973. Development and Ecology of *Raphidiopsis mediterranea* Skuja in the Swedish lake Trummen. Svensk Botanisk Tidskrift (67): 59-64.
- Dyble, J., Paerl, H.W. & Neilan, B.A.** 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2567-2571.
- Dyble, J., Tester, P.A. & Litaker, R. W.** 2006. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. African Journal of Marine Science 28(2):309-312.
- Falconer, I. R. & Humpage, A.R.** 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. Environmental Toxicology 16(2):192-195.
- Falconer, I.R. & Humpage, A.R.** 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. Environmental Toxicology 21(4): 299.
- Fastner, J., Rückert, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A. & Wiedner, C.** 2007. Occurrence of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Germany. Environmental Toxicology 22 (1), 26-32.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K. & Chorus, I.** 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two german lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. Toxicon 42: 313-321.
- Gautier, Q., Bezerara, K., Moreira, D., Kazmierczak, J., Guyot, F., Kempe, S. & López-García, P.** 2007. Molecular diversity of cyanobacteria and other members of the microbial community associated to microbialites from Satonda Crater Lake, Indonesia. Abstracts of the 17th symposium of the International Association for Cyanophyte Research, Mérida, México, June 25-29: 55.
- Gkelis, S., Moustaka, M., Sivonen, K. & Lanaras, T.** 2005. First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. Journal of Plankton Research 27(12):1295-1300.

- Gorham, P.R., McLachlan, J.S., Hammer, U.T. & Kim, W.K.** 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb) de Bréb. Verhandlungen des Internationalen Vereins für Theoretische und Angewandte Limnologie 15:796-804.
- Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Couté, A., Humbert, J.-F. & Sivonen, K.** 2002b. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology 52, 1867–1880.
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. & Humbert, J.F.** 2005. Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* strains isolated from four continents. Applied and Environm Microbiology, 71 (2): 1097-1100.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B. & Falconer, I.R.** 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacetrrium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Applied and Environmental Microbiology 50: 1292–1295.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. & Falconer, I.A.** 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon 35: 314-346.
- Hawkins, P.R., Putt, E., Falconer, I.A. & Humpage, A.** 2001. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. Environmental Toxicology 16: 460–467.
- Hill, H.** 1970. A new form of *Raphidiopsis mediterranea* found in Minnesota lakes. *Raphidiopsis mediterranea* var. *grandis*. Phycologica 9:73.
- Hill, H.** 1972. A new *Raphidiopsis* species (Cyanophyta, Rivulariaceae) from Minnesota lakes. Phycologia 11(2): 213-215.
- Hindák, F.** 1987. Morphological variation of trichomes in *Raphidiopsis curvata* Fritsch et Rich (Cyanophyta). Biologia 42(9): 847-854.
- Hindák, F.** 1988. Plankton species of two related genera *Cylindrospermopsis* and *Anabaenopsis* from Western Slovakia. Arch. Hydrobiol. 89:283–302.
- Hindák, F.** 2000. Morphological variation of four planktic nostocalean cyanophytes – members of the genus *Aphanizomenon* or *Anabaena*? Hydrobiologia 438 (1-3): 107-116.
- Hong, Y., Steinman, A., Biddanda, B., Rediske, R. & Fahnenstiel, G.** 2006. Occurrence

- of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. *Journal of Great Lakes Research* 32:645-652.
- Horecká, M. & Komárek, J.** 1979. Taxonomic position of three planktonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. *Preslia, Praha* 51: 289–312.
- Istvanovics, V., Shafik, H.M., Presing, M. & Juhos, S.** 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology* 43: 257-275.
- Jungblut, A.D. & Neilan, B.A.** 2006 Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins microcystin and nodularin synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 185:107-114.
- Kellmann, R., Mills, T. & Neilan, B.A.** Functional Modeling and Phylogenetic Distribution of Putative Cylindrospermopsin Biosynthesis Enzymes. *Molecular Evolution* 62(3):267-280.
- Kiss, T., Vehovszky, Á., Hiripi, L., Kovács, A. & Vörös, L.** 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131(2):167-176.
- Kling, H.J., Findlay, D.L. & Komárek, J.** 1994. *Aphanizomenon schindleri* sp. nov.: a new nostocacean cyanoprokaryote from the Experimental Lakes Area, northwestern Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51:2267-2273.
- Komárek, J.** 1984. Sobre las Cianofíceas de Cuba: *Aphanizomenon volzii*. *Acta Bot. Cubana* 18:1-30.
- Komárek, J.** 1994. Current trends and species delimitation in the cyanoprokaryote taxonomy. *Algological Studies* 75: 11-29
- Komárek, J.** 2000. Problems in cyanobacterial taxonomy: implication for most common toxin producing species. Istituto Superiore di Sanità, Workshop: Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo. Roma, 17 ottobre 2000.
- Komárek, J.** 2006A. The modern classification of cyanoprokaryotes (cyanobacteria). – *Oceanological and Hydrobiological Studies (Gdansk)* 34, Suppl. 3: 5-17.

- Komárek, J.** 2006B. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21(4):349-375.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 4 - Nostocales. *Algological Studies* 56:247-345.
- Komárek, J. & Kling, H.** 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Arch. Hydrobiol., Suppl.* 88, *Algological Studies* 61: 21–45.
- Komárek J. & Kaštovský J.** 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie/ Algological Studies* 109 (Papers of Cyanobacterial Research 4): 305-325.
- Komárek, J. & Komárková, J.** 2003. Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); review 2002. *Czech Phycology, Olomouc*, 3: 1-30.
- Komárek J. & Kováček L.** 1989. Trichome structure of four *Aphanizomenon* taxa (Cyanophyceae) from Czechoslovakia, with notes on the taxonomy and delimitation of the genus, *Pl. Syst. Evol.* 164: 47-64.
- Komárková, J.** 1998. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In *Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia*. M.T.P. Azevedo, D.P. Santos, L.S.C. Pinto, M. Menezes, M.T. Fujii, N.S. Yokoya, P.A.C. Senna & S.M.P.B. Guimarães (eds.). Sociedade Ficológica da America Latina e Caribe, São Paulo. v.1, p.327-340.
- Komárková, J., Laudares-Silva, R. & Senna, P.A.C.** 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. *Algological Studies* 94:207-222.
- Komárková, J. & Tavera, R.** 2003. Steady state of phytoplankton assemblage in the tropical Lake Catemaco (Mexico). *Hydrobiologia*, 502: 187-196
- Kováček L. & Holečková H.** 1984. Biometric evaluation of populations of *Aphanizomenon flos-aquae* from Trebon pond basin (Czechoslovakia). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67(3): 283-298.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O. & Oshima, Y.** 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brasil. *Toxicon*, 37(10): 1359-1373.

- Li, R., Watanabe, M. & Watanabe, M. M.** 1997. Akinete formation in planktonic *Anabaena* spp. (Cyanobacteria) by treatment with low temperature. *Journal of Phycology* 33: 576-584.
- Li, R., Watanabe, M. & Watanabe, M. M.** 2000a. Taxonomic studies of planktic species of *Anabaena* based on morphological characteristics in cultured strains. *Hydrobiologia* 438: 117-138.
- Li, R., Carmichael, W.W., Liu, Y. & Watanabe, M.M.** 2000b. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. *Hydrobiologia* 438: 99–105.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, M., Kaya, K. & Watanabe, M.M.** 2001a. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 39: 973-980.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D. & Watanabe, M.M.** 2001b. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37:1121–1126.
- Li, R., Pereira, P. & Carmichael, W. W.** 2003. Morphological and 16S rRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA 31 as *Aphanizomenon issatschenkoi*. *Journal of Phycology* 39:814-818.
- Litvaitis, M. K.** 2002. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468, 135–145.
- McCune, B. & Mefford, J.J.** 1997. PC-ORD. Multivariate analysis on ecological data, version 3.0. Oregon MjM Software Design. 47p.
- Metcalf, J. S., Beattie, K. A. Birmingham, S., Saker, M. L., Törökne, A. K. & Codd, G. A.** 2002. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40(8):1115-1120.
- Moore, D., McGregor, G. B. & Shaw, G.** 2004. Morphological changes during akinete

- germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). Journal of Phycology 40(6):1098-1105.
- Moore, D., O'Donohue, M., Shaw, G. & Critchley, C.** 2003. Potential triggers for akinete differentiation in an Australian strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205/1). Hydrobiologia 506-509:175-180.
- Moore, D., O'Donohue, M., Garnett, C., Critchley, C. & Shaw, G.** 2005. Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). Freshwater Biology 50(2):345-352.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H. & Oishi, S.** 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon. 2003 Oct;42(5):533-8.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Fujiwara, T., Nagai, H., Niki, T., Harigaya, E., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S.** 2004. Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. Chemical Research in Toxicology. 17:1692-1696.
- Neilan, B.A., Dyble, J. & Paerl, H.W.** 2002. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA-IGS* nucleotide sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology 68(5): 2567-2571.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., TÖrÖkne, A., Burnes, B.P.** 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* . Molecular Ecology 12:113-140.
- Nogueira, I. C. G., Saker, M. L., Pflugmacher, S., Wiegand, C. & Vasconcelos, V.M.** 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology 19(5):453-459.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A. & Moore, M.R.** 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environmental Toxicology (14)1:163-165.
- Ogawa, R.E. & Carr, J.F.** 1969. The influence of nitrogen on heterocyst production in

- blue-green algae. Limnology and Oceanography 3:342-351.
- Ohtani, I., Moore, R.E. & Runnegar, M.T.C.** 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of American Chemical Society 114: 7941-7942.
- Padisák, J.** 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Arch. Hydrobiol. Suppl. 107:563-593.
- Palinska, K., Thomasius, C. F., Marquardt, J. & Golubic, S.** 2006. Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2253–2263.
- Pereira, P; Li, R., Carmichael, W.W., Dias, E. & Franca, S.** 2004 Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. European Journal of Phycology 39 (4) : 361-368.
- Pomati, F., Neilan, B., Suzuki, T., Manarolla, G. & Rossetti, C.** 2003. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). Journal of Phycology 39 (3), 535–542.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P. & Neilan, B.A.** 2004a. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 Microbiology 150:455-61.
- Pomati F., Moffitt M.C., Cavaliere R. & Neilan B.A.** 2004b. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. Biochim Biophys Acta 1674:60-67.
- Présing, M., Herodek, S., Vörös, L. & Kóbor, I.** 1996. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Balaton. Algological Studies 136: 553–562.
- Preussel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I. & Fastner, J.** 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47: 156 – 162.
- Rao, K.J.** 1957. On a form of *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Journal of the Indian

Botanical Society 26(1):87-91.

- Rajaniemi, P., Komárek, J., Willame, R., Hrouzek, P., Kastovska, K., Hoffmann, L. & Sivonen, K.** 2005a. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies* 117:372-391.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. & Sivonen, K.** 2005b. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 11–26.
- Saker, M.L. & Eaglesham, G.K.** 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 37: 1065-1077.
- Saker, M.L., Neilan B.A. & Griffiths, D.J.** 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *Journal of Phycology* 35(3):599-606.
- Saker, M.L. & Griffiths, D.J.** 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39: 349–354.
- Saker, M.L. & Neilan, B.A.** 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1839-1845.
- Saker, M., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Neilan, B., Eaglesham, G. & Pereira, P.** 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 243-250.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Vasconcelos, V.M.** 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 43(2):185-194.

- Schembri, M.A., Neilan, B.A. & Saint, C.P.** 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16: 413–421.
- Shafik, H.M., Herodek, S., Présing, M. & Vörös, L.** 2001 Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju. *Algological Studies* 103:75–93.
- Shepherd, G. J.** 1996. Fitopac 1: Manual de usuário. Departamento de Botânica, Unicamp. 95p. Campinas.
- Shafik, H. M.** 2003. Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju in laboratory cultures. *Acta Biologica Hungarica* 57(1):121-136.
- Shafik, H.M., Vörös, L., Spröber, P. , Présing, M.& Kovács, A. W.** 2003. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. *Hydrobiologia* 506-509:163-167.
- Shen, X., Lam, P.K.S., Shaw, G.R. & Wickramasinghe, W.** 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40(10):1499-1501.
- Singh, R.N.** 1962. Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. *Hydrobiologia* 20(1):87-91.
- Spröber, P., Shafik, H.M., Présing, M., Kovács, A. W. & Herodek, S.** 2003. Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. *Hydrobiologia* 506-50:169-174.
- Stewart, I., Seawright, A.A., Schluter, P.J. & Shaw, G.R.** 2006. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *Dermatology* 6(5):1-12.
- Tóth, L.G. & Padisák, J.** 1986. Meteorological factors affecting the bloom of *Anabaenopsis raciborskii* Wolsz. (Cyanophytoa: Hormogonales) in the shallow lake Balaton, Hungary. *Journal of Plankton Research* 8:353–363.
- Tucci, A. & Sant’Anna. C.L.** 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Suba Raju (Cyanobacteria): weekly variation and relation with

- environmental factors in an eutrophic lake, São Paulo, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1):97-112.
- Valerio, E., Pereira, P., Saker, M. L., Franca, S. & Tenreiro, R.** 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* 4 (6): 1044-1052.
- Watanabe, M.** 1991. Studies on the planktonic blue-green algae 3. Some *Aphanizomenon* species in Hokkaido, northern Japan. *Bull. Natl. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 17:141–50.
- White, S.H., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L.D. & Eaglesham, G.K.** 2006. Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon* 47(5):497-509.
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R. & Nixdorf, B.** 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152:473–484.
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Komárek, J., Hoffmann, L. & Wilmotte, A.** 2005. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology* 42:1312–1332.
- Willmote, A. & Herdman, M.** 2001. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone, D.R. and Castenholz, R.W., Eds.) 2nd ed., vol. 1, pp. 487–493. Springer Verlag, New York.
- Wilson, K. M., Schembri, M. A., Baker, P. D. & Saint, C. P.** 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* 66, 332-338.
- Wood, S.A., Rasmussen, J.P., Holland, P.T., Campbell, R., Crowe, A.L. M.** 2007. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 43 (2), 356–365.
- Zar, J.H.** 1984. *Biostatistical Analysis*. 2nd. ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs. 718pp.

CAPÍTULO 2

**Relações filogenéticas de linhagens brasileiras de cianobactérias
potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e
Raphidiopsis (Nostocales)**

ABSTRACT – (Phylogenetic relations of Brazilian strains of potentially toxic Cyanobacteria from the genera *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales))

Although the potentially toxic cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 and *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) are very similar from the morphological point of view, their phylogenetic relations are still poorly understood. Therefore, the present study aimed to establish, based on 16S rRNA sequences, the phylogenetic relationship between ten Brazilian strains belonging to the three genera. The studied *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* strains grouped together in a monophyletic clade with public *Cylindrospermopsis* sequences. Two of the studied *Aphanizomenon* strains grouped with public *Aphanizomenon* and *Anabaena* strains, whereas other two *Aphanizomenon* strains located, in the neighbor joining and maximum parsimony trees, in an intermediary clade between the *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* group and the *Aphanizomenon/Anabaena* group. The two analysed *Raphidiopsis* sequences showed over 98% identity with all studied *Cylindrospermopsis* sequences, pointing to the weakness of the genus.

KEY WORDS: 16S rRNA, Neighbor Joining, Maximum Parsimony

RESUMO – (Relações filogenéticas de linhagens brasileiras de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindropermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (Nostocales))

As relações filogenéticas existentes entre cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindropermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 e *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) são pouco conhecidas, a despeito de sua semelhança morfológica. O presente estudo teve como objetivo estabelecer as relações filogenéticas existentes entre dez linhagens brasileiras pertencentes aos três gêneros, com base em seqüências do gene RNAr 16S. As linhagens pertencentes aos gêneros *Cylindropermopsis* e *Raphidiopsis* constituíram, nas árvores de *neighbor joining* e máxima parcimônia, clado monofilético entre si e com seqüências de *Cylindropermopsis* disponíveis no *GenBank*, ao passo que duas linhagens de *Aphanizomenon* se agruparam com seqüências de *Aphanizomenon* e *Anabaena* disponíveis no *GenBank* e duas constituíram clado de posição intermediária entre o grupo *Cylindropermopsis/Raphidiopsis* e o grupo *Aphanizomenon/Anabaena*. A identidade das duas seqüências de RNAr 16S de *Raphidiopsis* estudadas foi superior a 98% com todas as seqüências de *Cylindropermopsis* analisadas, apontando para a fragilidade do gênero.

PALAVRAS-CHAVE: *NeighborJoining*, Máxima Parcimônia, RNAr 16S

1. Introdução

Os organismos procariontes são classificados segundo critérios morfológicos, bioquímicos, ecológicos e genéticos. O sistema de classificação polifásico de *Archaea* e *Bacteria* recomenda o uso do gene *rrs*, codificador da subunidade menor (16S) do RNA ribossômico (RNAr), para o estabelecimento das relações de parentesco existentes entre esses microrganismos (Ludwig & Klenk 2001, Rosselló-Mora 2005). As seguintes características tornam o gene apropriado para a reconstrução filogenética: universalidade, constância funcional, combinação de regiões conservadas com regiões variáveis e número adequado de unidades informativas (cerca de 1500 nucleotídeos) (Ludwig & Klenk 2001, Wilmutte 1994). Além disso, embora o RNAr 16S esteja sujeito a transferência horizontal (Mylvaganam & Dennis 1992, Wang & Zhang 2000) e variação intragenômica (Acinas *et al.* 2004), aparentemente é recalcitrante à transferência lateral na natureza. Assim sendo, o impacto desta sobre as filogenias baseadas no gene é diminuto (Coenye *et al.* 2005). Identities superiores a 97,5% entre diferentes seqüências apresentam boa correlação com o valor de 70% ou mais de reassociação DNA-DNA e $T_m < 5^{\circ}\text{C}$, critério genético definidor de espécie bacteriológica segundo Wayne *et al.* (1987) (Stackebrandt & Goebel 1994). Recentemente, sua adequação para estudos filogenéticos em nível supra-específico foi confirmada através de comparação com a identidade média de nucleotídeos e aminoácidos de genomas e proteomas inteiramente seqüenciados (Konstantinidis & Tiedje 2005a,b). Em nível específico e infra-específico, entretanto, o gene é demasiadamente conservado (Fox *et al.* 1992, Ward *et al.* 1992) e marcadores mais variáveis, sobretudo o espaço intergênico transcrito das subunidades do RNA ribossômico 16S-23S (ITS1), muitas vezes têm se mostrado mais apropriados (Gugger *et al.* 2005).

Para os gêneros *Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault, *Cylindrospermopsis*

(Woloszynska) Seenayya & Subba Raju e *Raphidiopsis* Fritsch & Rich (Nostocaceae, Nostocales), 114 seqüências de *rrs* já se encontram depositadas em bancos de dados públicos. Destas, 82 constituem seqüências mais completas (entre 1285 e 1500 pares de bases).

Das 61 seqüências de RNAr 16S do gênero *Cylindrospermopsis* depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), quatro são de linhagens brasileiras. Destas, somente duas possuem mais de 1300 pares de bases. Para *Raphidiopsis*, há apenas quatro seqüências disponíveis no *GenBank*, duas das quais não foram publicadas e duas parciais de linhagens brasileiras, com menos de 400 pares de bases. O gênero *Aphanizomenon* possui 49 seqüências de RNAr 16S depositadas, sendo 29 com mais de 1300 pares de bases e nenhuma de linhagens procedentes do continente sul-americano.

Os trabalhos dedicados à inferência filogenética e à resolução de problemas sistemáticos baseados nestas seqüências estão resumidos na tabela 1. Sua avaliação aponta para:

1. A heterogeneidade genética do gênero *Aphanizomenon*;
2. A semelhança genética, tanto entre seqüências mais conservadas (16S RNAr), como entre seqüências mais variáveis (ITS1 e *rbcLX*), de representantes dos gêneros *Aphanizomenon* e *Anabaena* oriundos de regiões temperadas, a despeito das diferenças morfológicas existentes;
3. A ausência de estudos moleculares comparativos de espécies tropicais de *Aphanizomenon*, embora o gênero tenha incluído, no passado, representantes tropicais de *Cylindrospermopsis* incorretamente identificados por critérios morfológicos (Komárková 1998);

4. A escassez de estudos sobre a relação filogenética de *Cylindrospermopsis* com outros gêneros, tendo os esforços de pesquisa baseados no RNAr 16S do gênero se concentrado exclusivamente no estudo da variação infraespecífica de uma única espécie, *Cylindrospermopsis raciborskii*, na tentativa de esclarecer sua origem geográfica e rota de expansão pelo mundo;
5. A escassez de informações sobre a identidade genética de representantes do gênero *Raphidiopsis*, apesar de sua grande semelhança morfológica, na ausência de heterocitos, com o gênero *Cylindrospermopsis*.

Tabela 1. Trabalhos baseados em seqüências de RNAr 16S de *Aphanizomenon*, *Cylindropermopsis* e *Raphidiopsis*.

Autores e Data	Objetivos	Resultados
Saker <i>et al.</i> 1999	Morfologia, produção de toxinas e seqüenciamento do RNAr 16S de linhagem reta e espiralada de <i>Cylindropermopsis raciborskii</i> isoladas na Austrália.	Confirmação da estabilidade das diferenças morfológicas e fisiológicas (produção de toxinas), porém identidade genética de 99,08% dos dois morfotipos.
Barker <i>et al.</i> 2000	Estudo da diversidade genética de colônias de <i>Aphanizomenon</i> do Mar Báltico e da América do Norte (espaço intergênico juntamente com regiões flanqueadoras dos genes <i>cpcB</i> e <i>cpcA</i> , integrantes do operon ficocianina). Uma seqüência parcial de RNAr 16S comparada <i>in silico</i> com seqüências depositadas no <i>GenBank</i> .	Baixa variabilidade da seqüência parcial de RNAr 16S impedindo inferência filogenética robusta.
Lyra <i>et al.</i> 2001	Estudo da diversidade genética de linhagens de <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Microcystis</i> (RLFP e seqüenciamento do 16S rRNA).	Agrupamento de <i>Aphanizomenon</i> não-tóxica e <i>Anabaena</i> tóxica (95,7 a 100% de identidade) morfolologicamente distintas: variabilidade morfológica não reflete variabilidade genética.
Gugger <i>et al.</i> 2002	Seqüenciamento do RNAr 16S, ITS1 e <i>rbcLX</i> (do operon da D-ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase) de 26 linhagens de <i>Anabaena</i> e 14 de <i>Aphanizomenon</i> .	Proposição do agrupamento, em um único gênero, de <i>Aphanizomenon</i> com as linhagens planctônicas de <i>Anabaena</i> . Importância da revisão dos gêneros.
Iteman <i>et al.</i> 2002	Posição filogenética de 11 táxons de cianobactérias heterocitadas, incluindo <i>Aphanizomenon</i> e <i>Cylindropermopsis</i> (RNAr 16S, ITS1).	Formas planctônicas agrupam-se em clado com 5 subgrupos, nos quais <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i> distribuídos em diversos ramos, nem sempre em coerência com a classificação morfológica. A linhagem de <i>Cylindropermopsis</i> constitui clado próprio.

continua

Tabela 1. Trabalhos baseados em seqüências de RNAr 16S de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (continuação).

Autores e Data	Objetivos	Resultados
Neilan <i>et al.</i> 2003	Variação genética de 26 linhagens de <i>C. raciborskii</i> oriundas de vários países da Europa, Estados Unidos, Brasil e Austrália (seqüenciamento do RNAr 16S e <i>fingerprinting</i> de seqüências repetitivas).	Seqüências de RNAr 16S apresentaram identidade superior a 99,1% e não permitiram segregação das linhagens. Análise das seqüências repetitivas agrupou as linhagens do continente americano. As linhagens européias e australianas constituíram agrupamento distinto.
Komárek & Kastovsky 2003	Avaliação do sistema de classificação de cianobactérias tradicional com a árvore filogenética construída <i>in silico</i> a partir de seqüências de RNAr 16S depositadas no GenBank.	A topologia da árvore filogenética mostrou-se coerente com a classificação baseada em marcadores morfológicos apenas para as ordens heterocitadas. A linhagem de <i>Cylindrospermopsis</i> incluída no estudo agrupou-se em clado irmão ao clado que reuniu <i>Aphanizomenon</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Anabaena</i> . Monofilia das duas linhagens de <i>Aphanizomenon</i> avaliadas.
Gugger <i>et al.</i> 2005	Estudo da diversidade genética de duas linhagens brasileiras de <i>Raphidiopsis brookii</i> e 7 linhagens de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> oriundas da América, Europa, Ásia e Oceania, com base no ITS1 e seqüências parciais de RNAr 16S, <i>rpoC1</i> (gene codificador da RNA polimerase) e <i>nifH</i> (gene codificador da nitrogenase).	O RNAr 16S de <i>Raphidiopsis</i> apresentou identidade de 100% com as sete linhagens de <i>Cylindrospermopsis</i> seqüenciadas e 25 depositadas no GenBank. Resultados de <i>rpoC1</i> e ITS1 confirmaram maior identidade entre <i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Raphidiopsis</i> oriundos do continente americano do que entre <i>Cylindrospermopsis</i> de continentes diferentes.
Pereira <i>et al.</i> 2004	Morfologia, produção de toxinas e seqüenciamento do RNAr 16S de linhagem portuguesa de <i>Aphanizomenon</i> .	Identificação, por critérios morfológicos e genéticos, da linhagem como <i>A. gracile</i> (identidade > 98,1% com linhagens da espécie depositadas no GenBank).
Rajaniemi <i>et al.</i> 2005	Avaliação morfológica e análise filogenética (RNAr 16S, <i>rpoB</i> and <i>rbcLX</i>) em <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Trichormus</i> .	Agrupamento de <i>Anabaena</i> (planctônicas e bentônicas) e <i>Aphanizomenon</i> em um clado com ambos os gêneros intermisturados e similaridade do RNAr 16S > 94,8%. As 3 linhagens de <i>Cylindrospermopsis</i> incluídas no estudo (1 brasileira, 1 norte-americana e 1 australiana) agruparam-se em clado separado.

continua

Tabela 1. Trabalhos baseados em seqüências de 16S rRNA de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (continuação).

Autores e Data	Objetivos	Resultados
Rajaniemi <i>et al.</i> 2005	Reavaliação do valor taxonômico de características fenotípicas de <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i> , através de comparação com resultados moleculares.	Definição de novo gênero, <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> , de acordo com critérios citomorfológicos e moleculares.
Zwart <i>et al.</i> 2005	Estudo da diversidade de cianobactérias pelágicas de lago holandês por seqüenciamento de RNAr 16S em amostras ambientais e em isolados, filogenia das linhagens obtidas com outras depositadas no <i>GenBank</i> .	Agrupamento de <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> em clado-irmão a <i>Cylindrospermopsis</i> .
Willame <i>et al.</i> 2006	Estudo morfológico e genético (seqüenciamento do 16S RNAr) de 95 linhagens de cianobactérias isoladas de corpos d'água da Bélgica e de Luxemburgo, incluindo 14 linhagens de <i>Aphanizomenon</i> e, para construção das árvores filogenéticas, uma de <i>Cylindrospermopsis</i>	Polifilia de <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> e discrepância entre características genotípicas e fenotípicas.

2. Objetivos

Diante do acima exposto e considerando a escassez de informações sobre a relação sistemática entre os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, bem como de filogenias que incluam linhagens brasileiras dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, o presente trabalho tem como objetivo seqüenciar o gene codificador da subunidade menor do RNA ribossômico (RNAr 16S) de dez linhagens brasileiras pertencentes aos três gêneros, a fim de estabelecer as relações filogenéticas existentes entre as mesmas, bem como entre linhagens brasileiras e espécies conhecidas depositadas no GenBank do NCBI. As seqüências obtidas serão depositadas neste banco de dados.

3. Material e Métodos

A tabela 2 apresenta as dez linhagens estudadas. Nove pertencem à Coleção de Culturas de Algas e Cianobactérias do Instituto de Botânica da Secretaria de Estado de Meio Ambiente de São Paulo e uma é originária da Coleção de Culturas do Departamento de Ciências Morfo-Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul.

Tabela 2. Linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas.

Táxon putativo^a	Linhagem	Origem Geográfica	Ano de isolamento
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 649	Lagoa Manguaba, Maceió, AL (9°40'S 35°48' W)	
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 704	Maceió, AL	
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	SPC 640	Lago Bolonha, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Aphanizomenon gracile</i>	SPC 668	Reservatório Água Preta, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 811	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2000
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 820	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2001
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 339 ^b	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 969	Represa do Broa, São Carlos, SP (22°12'S 47°52'W)	2004
<i>Raphidiopsis brookii</i>	SPC 338 ^c	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Raphidiopsis brookii</i> .	FURG CY 001	Lago dos Biguás, Rio Grande, RS (32°04' S 52°10' W)	2004

^a Identificações segundo capítulo 1 da presente tese. ^b denominada de *Braz2* por Dyble *et al.* 2002 e Neilan *et al.* 2003; *Brazil 2* por Wilson *et al.* 2000; e como *T3* por Lagos *et al.* 1999, Pomati *et al.* 2004, Jungblut & Neilan 2006 e Kellmann *et al.* 2006. ^c classificada como *Cylindrospermopsis raciborskii* por Lagos *et al.* 1999 e Castro *et al.* 2004 e denominada de T2 pelos primeiros autores e de C10 por Castro *et al.* 2004.

3.1. Condições de cultura

Para extração do DNA, as linhagens foram cultivadas no Laboratório de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. As culturas uniespecíficas não-axênicas foram cultivadas em meio ASM1 (Gorham *et al.* 1964), temperatura de $23,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância de $40 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes e fotoper\u00edodo de 14 hs.

3.2. Extração do DNA, amplificação do 16S RNAr, clonagem e seq\u00eancia

O processamento das amostras e o seq\u00eancia do RNAr 16S foram realizados pela equipe do Laborat\u00f3rio de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP-Campus Piracicaba e est\u00e3o descritos a seguir.

3.2.1. Extração do DNA

O DNA total foi extra\u00eddo de uma suspens\u00e3o de 3 mL de c\u00e9lulas, colhida quatro semanas ap\u00f3s inocula\u00e7\u00e3o das linhagens em meio fresco. A suspens\u00e3o de c\u00e9lulas foi concentrada por centrifuga\u00e7\u00e3o a 13000 rpm durante cinco minutos. O “pelete” obtido foi lavado com \u00e1gua deionizada est\u00e9ril, novamente centrifugado e submetido \u00e0 extra\u00e7\u00e3o segundo m\u00e9todo descrito por Fiore *et al.* (2000). Para cada amostra, uma al\u00edquota de 5 μL do DNA extra\u00eddo foi testada para sua integridade por corrida eletrofor\u00e9tica juntamente com padr\u00e3o de DNA de tamanho conhecido (*Lambda DNA/EcoRI + Hind III*, PROMEGA). Para tanto, as amostras e o padr\u00e3o foram acrescidos de tamp\u00e3o de carregamento com 15% de ficol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol e carregados em gel de agarose 1,2% com brometo de et\u00eddio (0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gel). Foi utilizado tamp\u00e3o de corrida 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM,

EDTA 1 mM, pH 8,0). O gel resultante foi documentado no programa Multi Analyst do Fluor-STM MultiImager (BioRad, Hercules, CA, EUA).

O DNA extraído foi armazenado a -20°C até seu processamento subsequente.

3.2.2. Amplificação do RNAr 16S

O gene RNAr 16S foi amplificado do DNA genômico por reação de PCR automatizada (equipamento Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems) em 30 ciclos desnaturação-anelamento-extensão de 94°C (dez segundos), 50°C (20 segundos) e 72°C (um minuto), antecidos por reação de desnaturação inicial a 95°C por três minutos e finalizados por reação de extensão das cadeias de nucleotídeos a 72°C por sete minutos. Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F1 (5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (Neilan et al.1997), confeccionados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). O volume de reação foi de 25 µL, contendo 10 ng do DNA genômico, 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM dNTP, 3,0 mM MgCl₂, 1X buffer de PCR e 1,5 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a reação de PCR, os amplicons foram testados por meio de corrida eletroforética como descrito anteriormente.

3.2.3. Clonagem e Seqüenciamento

Os produtos da PCR foram clonados utilizando-se o kit de clonagem “*pGEM®-T Easy Vector Systems*” (PROMEGA), segundo instruções do fabricante. Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por eletroporação e, após plaqueamento e cultivo, os plasmídeos recombinantes foram extraídos de colônias brancas pelo método alcalino de Birnboim & Doly (1979).

A reação de PCR de seqüenciamento foi efetuada com o kit de reação *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). Os iniciadores usados na reação de amplificação por PCR foram os sítios iniciadores T7 e M13 do vetor, bem como os iniciadores internos 357F (CCTACGGGAGGCAGCAG), 357R (CTGCTGCCTCCCGTAGG), 704F (GTAGS GGTGAAATSCGTAGA), 704R (TCTACGSATTTACCSCTAC), 1114F (GCAACGAGC GCAACCC) e 1114R (GGGTTGCGCTCGTTGC). A PCR de seqüenciamento foi realizada em equipamento Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems), iniciando-se a 96°C por dois minutos, seguindo-se 25 ciclos de dez segundos a 96°C, dez segundos a 52°C e dois minutos a 60 °C. Ao término da reação, finalizadores de reação residuais foram removidos por lavagem com isopropanol 75% e etanol 70%. O produto purificado foi ressuspenso em formamida HiDi (Applied Biosystems) e seqüenciado bidirecionalmente em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Foram seqüenciados os produtos de, no mínimo, três reações independentes. Os fragmentos de seqüências resultantes foram montados com o programa computacional *PHRED/PHRAP/CONSED* (Ewing & Green 1998), sendo consideradas somente bases com qualidade superior a 20.

4. Análise filogenética

As seqüências foram submetidas a alinhamento seqüencial múltiplo (*ClustalW*) com seqüências publicadas dos três gêneros depositadas no GenBank (tabela 4). Para tanto, usou-se o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999). Depois de alinhadas, as seqüências foram inspecionadas visualmente e os *gaps* iniciais e finais removidos manualmente.

As árvores filogenéticas foram construídas pelo software MEGA versão 4.0 (Tamura *et*

al. 2007), segundo os métodos de máxima parcimônia (MP) e *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou & Nei 1997), com análise de reamostragem para 1000 replicações (*bootstrap*=1000) (Swofford *et al.* 1986) e demais parâmetros mantidos segundo padrão do programa. A linhagem *Escherichia coli* K12 (Acesso GenBank NC 000913.2), com 1452 pares de bases (pb), figurou como grupo externo nas árvores.

As seqüências foram ainda submetidas à análise *online* de *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool* para seqüências medianamente semelhantes) do *NCBI* (Altschul *et al.* 1999), bem como ao classificador bayesiano do *Ribosomal Database Project II* (Wang *et al.* 2007). Algumas seqüências representativas dos três gêneros, com porcentagem de cobertura no *BLAST* superior a 99%, foram selecionadas para cálculo da identidade com as linhagens estudadas. Somente seqüências publicadas foram selecionadas para a análise.

Tabela 4. Sequências de RNAr 16S disponíveis no *GenBank* utilizadas para a inferência filogenética.

Táxon	Linhagem	Número de acesso no <i>GenBank</i>	pb	Origem geográfica	Referências
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Florida I	AF516746	1444	Florida/EUA	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Florida F	AF516745	1436	Florida/EUA	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Germany 2	AF516736	1420	Alemanha	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Brazil 2	AF516734	1453	Brasil	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Brazil 1	AF516733	1444	Brasil	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	05E	AF516732	1467	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	23B	AF516731	1490	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	23D	AF516730	1549	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	24C	AF516729	1470	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	09a	AF516728	1450	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Mk	AF516726	1417	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	LJ	AF516725	1446	Australia	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	PMC98.14	AJ582102	1435	França	Gugger <i>et al.</i> 2005
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Form 2 (straight)	AF067819	1444	Australia	Saker <i>et al.</i> 1999
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	Form 1 (coiled)	AF067818	1435	Australia	Saker <i>et al.</i> 1999
<i>Cylindrospermopsis. raciborskii</i>	4799	AF516741	1447	Portugal	Neilan <i>et al.</i> 2003
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	NIES81	AJ293131	1463	Japão	Gugger <i>et al.</i> 2002, Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon. flos-aquae</i>	PMC9707	AJ293130	1463	França	Gugger <i>et al.</i> 2002, Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	PMC9706	AJ293129	1463	França	Gugger <i>et al.</i> 2002
<i>Aphanizomenon. flos-aquae</i>	PMC9401	AJ293126	1463	França	Gugger <i>et al.</i> 2002

continua

Tabela 4. Sequências de RNAr 16S disponíveis no *GenBank* utilizadas para a inferência filogenética (*continuação*).

<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> var. <i>klebahnii</i>	PH218	AJ293123	1463	Dinamarca	Gugger <i>et al.</i> 2002
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> var. <i>klebahnii</i>	PH83	AJ293122	1463	Dinamarca	Gugger <i>et al.</i> 2002
<i>Aphanizomenon. issatschenkoi</i>	0tu37s7	AJ630446	1486	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon gracile</i>	1tu26s16	AJ630445	1451	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon gracile</i>	HEANEY/Camb 1986	AJ630444	1460	Irlanda	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon gracile</i>	PMC9402	AJ293127	1463	França	Gugger <i>et al.</i> 2002
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	1tu26s2	AJ630443	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	1tu37s13	AJ630442	1415	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	1tu29s19	AJ630441	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena cylindrica</i>	XP6B	AJ630414	1417	Finlândia (bentônica marinha)	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena circinalis</i>	1tu34s5	AJ630415	1413	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena circinalis</i>	1tu30s11	AJ630416	1486	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena circinalis</i>	1tu33s12	AJ630417	1486	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena compacta</i>	ANACOM-KOR	AJ630418	1462	República Tcheca)	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena lemmermannii</i>	256	AJ293113	1465	Dinamarca	Gugger <i>et al.</i> 2002
<i>Anabaena augustumnalis</i>	Schmidke Jahnke/4a	AJ630458	1462	Alemanha	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena spiroides</i>	1tu39s17	AJ630440	1486	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005

continua

Tabela 4. Sequências de RNAr 16S disponíveis no *GenBank* utilizadas para a inferência filogenética (*continuação*).

<i>Anabaena smithii</i>	1tu39s8	AJ630436	1416	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena sigmoidea</i>	0tu36s7	AJ630434	1480	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena planctonica</i>	1tu36s8	AJ630433	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena planctonica</i>	1tu33s8	AJ630432	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena planctonica</i>	1tu30s13	AJ630431	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena planctonica</i>	1tu28s8	AJ630430	1460	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena oscillarioides</i>	BO HINDAK 1984/43	AJ630428	1462	Canadá	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena mucosa</i>	1tu35s5	AJ630425	1415	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena lemmermannii</i>	1tu32s11	AJ630424	1462	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena flos-aquae</i>	1tu35s12	AJ630423	1471	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena flos-aquae</i>	0tu33s2a	AJ630421	1482	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena flos-aquae</i>	0tu33s15	AJ630420	1482	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005
<i>Nostoc sp.</i>	1tu14s8	AJ630453	1467	Finlândia	Rajaniemi <i>et al.</i> 2005

5. Resultados

5.1. Sequências

As seqüências de RNAr 16S das dez linhagens estudadas estão apresentadas no anexo 1.

5.2. Alinhamento, BLAST e Identidade

O tamanho final da matriz de alinhamento após remoção dos *gaps* iniciais e finais foi de 1449 posições.

A tabela 5 apresenta a porcentagem de identidade entre as seqüências de RNAr 16S das linhagens estudadas. Foram consideradas como pertencentes ao mesmo gênero as linhagens com identidade igual ou superior a 95% (Ludwig *et al.* 1998).

A tabela 6 contém os resultados da análise de *BLAST* entre as linhagens estudadas e seqüências representativas do GenBank, apresentando sua porcentagem de identidade.

A tabela 7 apresenta as porcentagens de identidade entre as seqüências depositadas no GenBank utilizadas para o cálculo de identidade com as seqüências analisadas no presente estudo.

Tabela 5.: Porcentagem de identidade entre as seqüências de RNAr 16S das linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas (linhagens morfologicamente diferentes e pertencentes ao mesmo gênero genético em azul; linhagens morfologicamente semelhantes e pertencentes a gêneros genéticos diferentes em vermelho, linhagens morfologicamente semelhantes e pertencentes ao mesmo gênero genético em negrito e itálico).

	SPC 338 <i>Raphidiopsis</i>	FURGCY001 <i>Raphidiopsis</i>	SPC 640 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 649 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 668 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 704 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 811 <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	SPC 820 <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	SPC 969 <i>Cylindrospermopsis</i>
FURGCY001- <i>Raphidiopsis</i>	99,6459								
SPC 640- <i>Aphanizomenon</i>	93,4982	93,3522							
SPC 649- <i>Aphanizomenon</i>	96,1891	96,1891	93,8689						
SPC 668- <i>Aphanizomenon</i>	93,1449	93,0742	97,5921	94,0099					
SPC 704- <i>Aphanizomenon</i>	96,3907	96,3907	93,9887	99,2237	94,1301				
SPC 811- <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	99,5751	99,6459	93,2815	96,1186	93,1400	96,3199			
SPC 820- <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	99,2918	99,2210	93,4229	95,9069	93,2156	96,1076	99,1501		
SPC 969- <i>Cylindrospermopsis</i>	99,5043	99,5751	93,2862	96,3303	93,0085	96,5322	99,5043	99,0793	
SPC 339- <i>Cylindrospermopsis</i>	99,5043	99,5751	93,5689	96,3303	93,2862	96,5322	99,5043	99,2210	99,7167

Tabela 6.: Porcentagem de identidade entre as seqüências de RNAr 16S das linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas e seqüências representativas dos três gêneros depositadas no *GenBank* (linhagens morfológicamente diferentes e pertencentes ao mesmo gênero genético em azul; linhagens morfológicamente semelhantes e pertencentes a gêneros genéticos diferentes em vermelho; linhagens morfológicamente semelhantes e pertencentes ao mesmo gênero genético em negrito e itálico).

	SPC 640 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 668 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 649 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 704 <i>Aphanizomenon</i>	SPC 969 <i>Cylindrospermopsis</i>	SPC 339 <i>Cylindrospermopsis</i>	SPC 820 <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	SPC 811 <i>Cylindrospermopsis</i> ou <i>Raphidiopsis</i>	SPC 338 <i>Raphidiopsis</i>	FURGCY001 <i>Raphidiopsis</i>
<i>C. raciborskii</i> Germany 2	92,8068	91,9492	95,7012	95,8333	98,5866	98,7279	98,2332	98,3746	98,5159	98,4452
<i>C. raciborskii</i> PMC98.14	93,5120	93,0889	96,8288	96,7514	99,3640	99,5053	99,0106	99,1519	99,5042	99,2226
<i>C. raciborskii</i> 09A	93,3004	93,0183	96,4764	96,3983	99,0813	99,2226	98,7279	98,8693	99,2210	98,7994
<i>C. raciborskii</i> 24C	93,1642	92,9528	96,4085	96,3303	98,8701	99,0113	98,5876	98,7994	99,0800	98,3769
<i>C. raciborskii</i> Florida I	92,6554	92,3023	96,3329	96,2623	98,9399	98,9399	98,4452	98,7986	99,1507	98,7986
<i>C. raciborskii</i> Brazil 2	92,5247	92,2426	96,1322	96,0536	99,0826	99,2943	98,4474	98,7306	99,1513	98,8011
<i>C. raciborskii</i> Brazil 1	92,0960	91,8843	95,9859	95,9068	98,7288	98,7994	98,0932	98,3769	99,0085	98,4474
<i>Aph. flos-aquae</i> NIES81	95,8982	95,2650	92,8723	92,5141	92,6554	92,9379	92,7260	92,5848	92,7260	92,6554
<i>Aph. gracile</i> 1tu26s	95,6897	95,5460	92,9699	92,8981	93,0416	93,3286	93,1133	92,9699	93,1851	93,0416
<i>Aph. gracile</i> HEANEYCamb1	95,7615	95,6178	93,0416	92,9699	93,1133	93,4003	93,1851	93,0416	93,2568	93,1133
<i>Aph. issatschenkoi</i> 0tu37s7	97,5972	98,8685	94,3622	94,0056	93,0233	93,3051	93,2347	93,0233	92,8723	93,0937
<i>A. augstumalis</i> SCHMIDKE JAHNKE/4a	94,5698	94,2131	95,4993	95,4225	94,4915	94,4915	94,2797	94,1426	94,7368	94,3503
<i>A. oscillarioides</i> BO HINDAK 1984/43	94,8519	95,3291	95,3048	95,2281	94,9894	94,9894	94,7777	94,7777	95,1477	94,8483
<i>A. flos-aquae</i> 1tu26s2	95,7615	94,9713	92,5395	92,4677	92,6112	92,8981	92,6829	92,5395	92,8981	92,6112
<i>Anabaena spiroides</i> 1tu39s17	95,6958	94,5481	92,9699	92,8981	93,1851	93,4720	93,4003	93,2568	93,4720	93,3286
<i>Nostoc</i> sp. 1tu14s8	93,2046	92,7754	90,8571	90,7857	91,5714	91,8571	91,5714	91,5000	91,6429	91,5714

Tabela 7.: Porcentagem de identidade entre as seqüências de RNAr 16S de linhagens representativas depositadas no *GenBank*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> Germany 2															
2 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> PMC98.14	99,5717														
3 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 09A	99,3562	99,5819													
4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 24C	99,1441	99,4398	99,2372												
5 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> Florida I	99,6372	99,7145	99,3562	99,0057											
6 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> Brazil 2	98,8571	99,2259	99,0182	98,7448	99,1429										
7 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> Brazil 1	98,6409	99,0141	98,8772	98,4050	98,9270	98,7509									
8 <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NIES81	93,3530	93,1755	93,1755	92,9972	92,7247	92,4701	92,4701								
9 <i>Aphanizomenon gracile</i> 1tu26s16	93,6484	93,3706	93,3706	93,2073	93,0100	92,6554	92,6554	99,4487							
10 <i>Aphanizomenon gracile</i> HEANEYCamb	93,7223	93,5101	93,5101	93,3473	93,0813	92,7362	92,7362	99,5890	99,8622						
11 <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> 0tu37s7	92,9387	93,4403	93,3706	93,2773	93,0100	92,5952	92,5952	96,1644	96,1406	97,6744					
12 <i>Anabaena augstumalis</i> SCHMIDKE JAHNKE	94,5792	95,0454	94,8360	94,6116	94,2160	94,0056	94,0056	94,9384	94,9759	95,1436	95,4856				
13 <i>Anabaena oscillarioides</i> BO HINDAK	94,9358	95,3245	95,3245	95,1714	94,4948	94,4288	94,4288	95,1436	95,2512	95,4172	95,6908	96,5116			
14 <i>Anabaena flos-aquae</i> 1tu26s2	93,4959	93,2310	93,0216	92,8571	92,8673	92,3729	92,3729	98,4932	98,4149	98,3562	95,5479	94,3912	94,6648		
15 <i>Anabaena spiroides</i> 1tu39s17	93,2240	93,7195	93,5101	93,2820	93,2953	92,7362	92,7362	97,4692	97,6600	97,6744	95,3567	95,0068	95,2804	97,9480	
16 <i>Nostoc sp.</i> 1tu14s8	92,3473	92,2168	92,2168	92,0502	91,7614	91,5028	91,5028	93,4516	93,1366	93,2469	93,5924	93,8692	93,6649	93,6562	93,2607

5.3. Reconstrução filogenética

As figuras 1 e 2 apresentam as relações filogenéticas, estabelecidas pelos métodos de *Neighbor Joining* e máxima parcimônia, respectivamente, entre as dez linhagens estudadas e seqüências representativas da família Nostocaceae depositadas no *GenBank*. Estão apresentados somente os agrupamentos com valores de reamostragem superiores a 50%. Ramificações com valores de reamostragem inferiores a 50% foram desconsideradas.

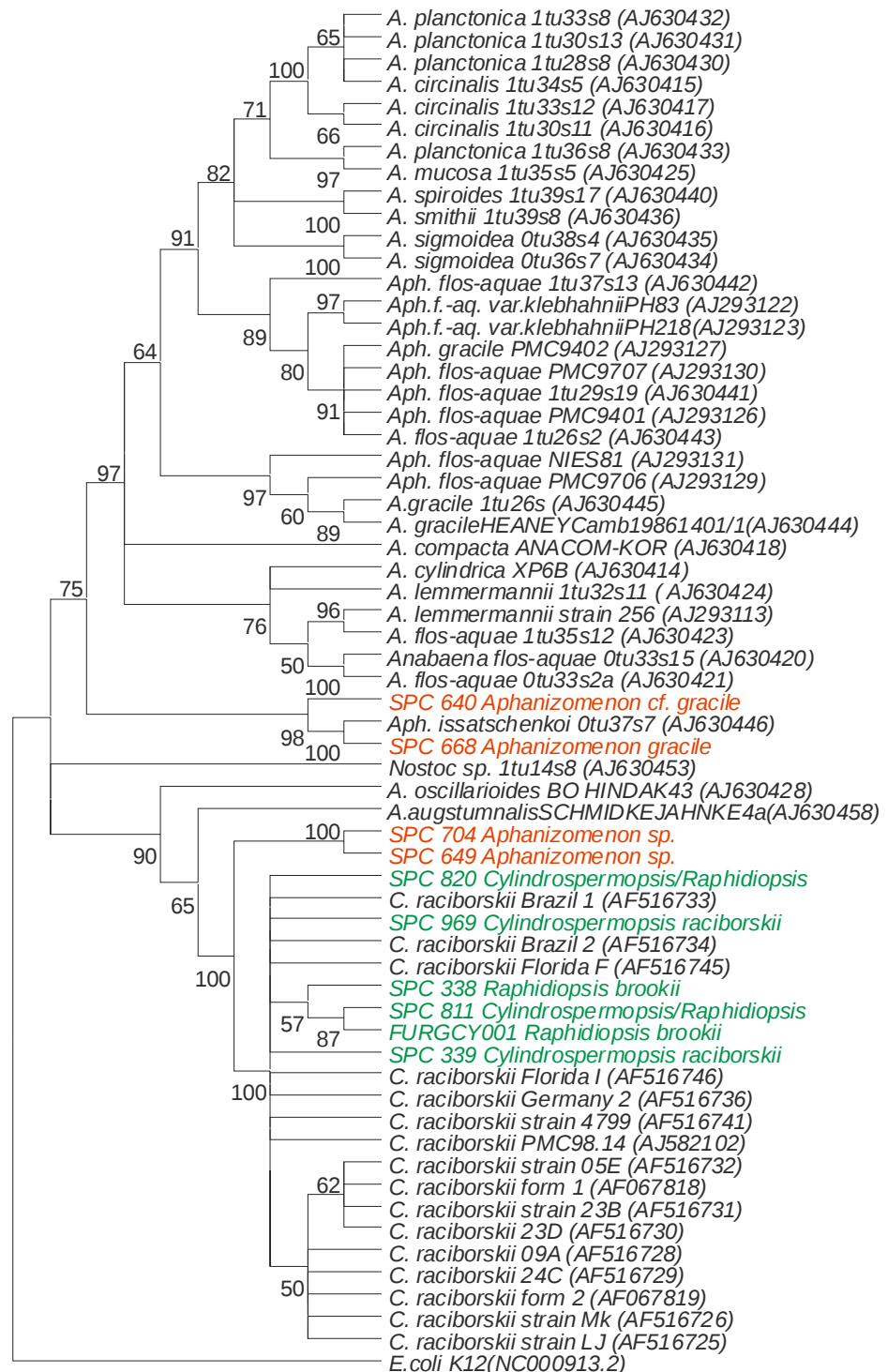


Figura 1.: Relações filogenéticas entre as linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas e linhagens representativas de Nostocaceae depositadas no GenBank, (segundo método de *Neighbor Joining*, com valores de reamostragem indicados próximo aos nós). Linhagens estudadas do grupo *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* em verde, linhagens estudadas de *Aphanizomenon* em vermelho. A. = *Anabaena*, Aph. = *Aphanizomenon*.

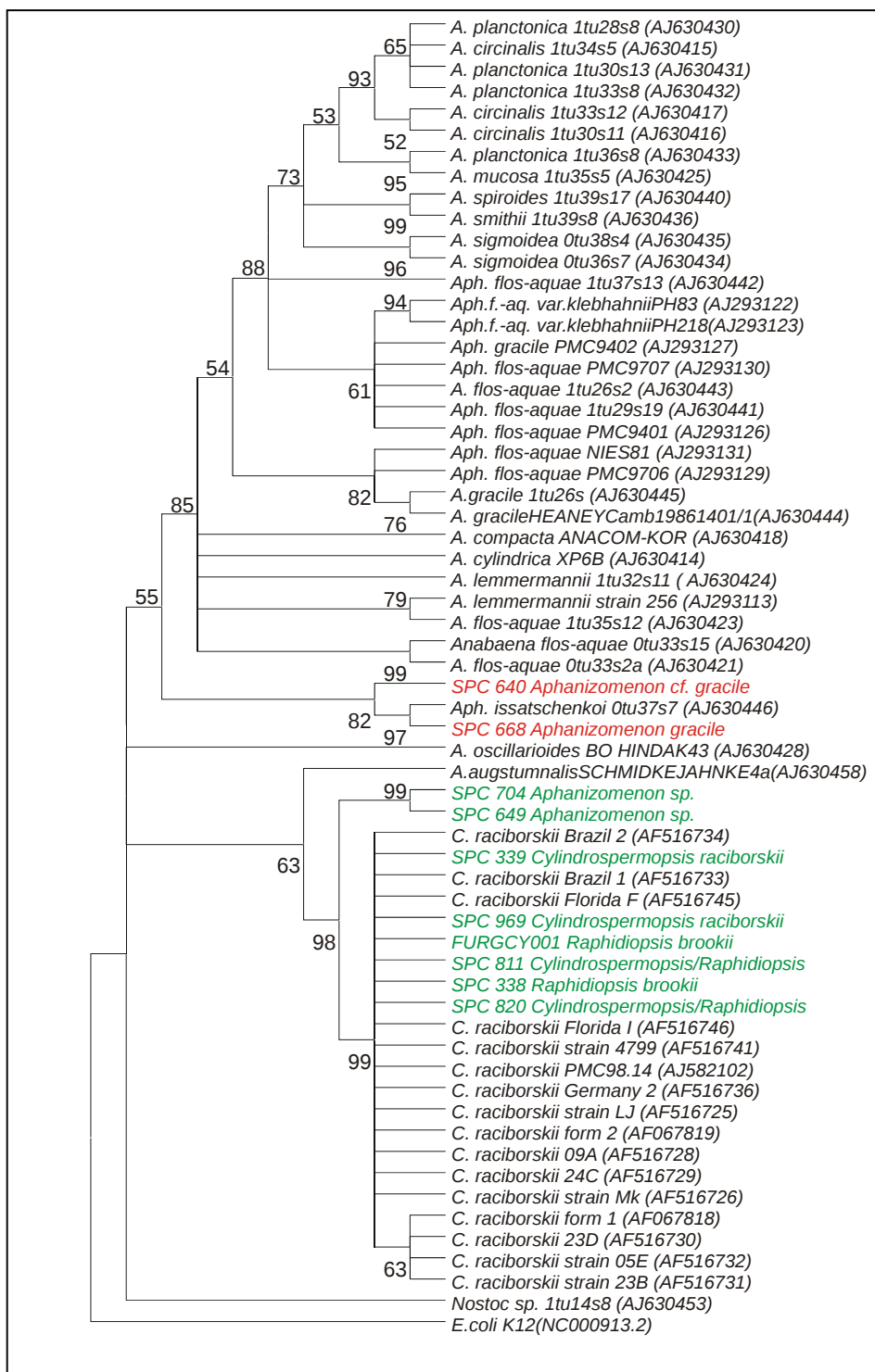


Figura 2.: Relações filogenéticas entre as linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas e linhagens representativas de Nostocaceae depositadas no GenBank (segundo método de máxima parcimônia, com valores de reamostragem indicados próximo aos nós). Linhagens estudadas do grupo *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* em verde, linhagens estudadas de *Aphanizomenon* em vermelho. A. = *Anabaena*, Aph. = *Aphanizomenon*

6. Discus

sã

o

As

linhagens

SPC640,

SPC668,

SPC969 e

SPC339 tiveram sua identificação genérica confirmada pelas seqüências de 16S RNAr: as duas primeiras com mais de 95% de identidade com espécies de *Aphanizomenon* (tabela 6) e 97,59% de identidade entre si (tabela 5), as outras duas com identidade superior a 98% com

linhagens de *C. raciborskii* depositadas no *Genbank* (tabela 6) e entre si (tabela 5). As árvores filogenéticas corroboram o parentesco próximo de SPC640 e SPC668 com outras espécies de *Aphanizomenon*, com as quais estão agrupadas em um clado separado daquele que reúne os representantes de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (figuras 1 e 2).

Em nível específico, as linhagens SPC969 e SPC339 tiveram sua identificação morfológica como *C. raciborskii* confirmada, uma vez que apresentaram identidade superior a 97,5% com linhagens da espécie depositadas no *Genbank*.

A linhagem SPC640, contudo, identificada pela morfologia da célula apical como pertencente à espécie *A. gracile*, e a linhagem SPC668, identificada morfológicamente como *A. cf. gracile*, não tiveram sua identidade específica confirmada, pois ambas apresentaram identidade inferior a 97,5% com linhagens de *A. gracile* depositadas no *Genbank* e identidade superior a 97,5% com *A. issatschenkoi* (tabela 6). Esta é uma espécie de morfologia característica, tendo sido reclassificada por Rajaniemi *et al.* (2005) como *Cuspidothrix issatschenkoi*, com base na atenuação terminal do tricoma e na célula apical alongada e acuminada. Entretanto, tais características não foram estáveis no material estudado, tendo sido observadas com maior frequência as células apicais cilíndricas e de formato tipicamente capitado de *A. gracile*. Assim sendo, em nível específico os resultados de RNAr 16S das linhagens SPC640 e SPC668 divergem dos resultados morfológicos, o que pode, contudo, estar relacionado ao baixo poder de resolução do RNAr 16S em nível infragenérico.

Com relação à linhagem SPC704, identificada inicialmente como *Aphanizomenon* sp., as seqüências do RNAr 16S posicionaram-na em um clado-irmão ao clado que reúne as linhagens de *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* (figuras 1 e 2). Morfológicamente, a linhagem apresentou características híbridas entre *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*, dependendo das condições do meio de cultura. Em condições nutricionais favoráveis (meio ASM1 não

modificado), apresentou distribuição subsimétrica dos heterocitos ao longo do tricoma, característica típica de *Aphanizomenon*. Em meio de cultura com baixa disponibilidade de nitrogênio (meio ASM1 modificado), SPC704 desenvolveu heterocitos primariamente terminais, dotados de um poro, característicos do gênero *Cylindrospermopsis* (capítulo 1). A linhagem apresentou identidade genética superior a 95% (tabela 6) com linhagens de *C. raciborskii*, confirmando os dados morfológicos em condições de redução de nitrogênio. A ampla plasticidade fenotípica da linhagem está refletida em termos moleculares por sua posição intermediária nas árvores filogenéticas, entre o clado de *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* e o ramo no qual está posicionada a espécie *Anabaena augustumna* (figuras 1 e 2).

A linhagem SPC649 apresentou-se igualmente em posição intermediária nas árvores filogenéticas, no mesmo clado da linhagem SPC704 (figuras 1 e 2). Ambas as linhagens mostraram-se morfológicamente muito semelhantes em condições de cultura normais (capítulo 1). Em meio de cultura com redução da disponibilidade de nitrogênio, contudo, a linhagem SPC649 desenvolveu características de *Anabaena*: células vegetativas e apicais esféricas e distribuição metamérica dos heterocitos (igualmente esféricos) ao longo do tricoma.

Com relação às linhagens SPC811 e SPC820, de identificação taxonômica incerta, os resultados moleculares posicionaram-nas próximas às linhagens de *Cylindrospermopsis* (figuras 1 e 2). A alta identidade de suas seqüências de RNAr 16S com a de *Cylindrospermopsis raciborskii* (tabelas 5 e 6) sugere que elas pertencem a esse gênero e, possivelmente, à mesma espécie. Entretanto, a utilização de outra(s) seqüência(s) gênica(s) faz-se necessária para confirmar esses resultados.

Concernente às linhagens SPC338 e FURG001, ambas de morfologia típica de *Raphidiopsis*, as seqüências de RNAr 16S apontam para a fragilidade do gênero. A alta

identidade do gene RNAr 16S com *Cylindrospermopsis raciborskii*, superior a 98% em todos os casos (tabelas 5 e 6), não justifica a separação dos dois gêneros, que deveriam, portanto, ser considerados sinônimos. Neste caso e segundo o princípio da prioridade prescrito pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Mac Neill *et al.* 2006), prevaleceria o nome mais antigo, *Raphidiopsis*, que abarcaria tanto os representantes com heterocitos, como aqueles que perderam a capacidade de diferenciação de células especializadas para a fixação de nitrogênio. Todavia, o nome *Cylindrospermopsis* é muito mais conhecido, em virtude da importância ecológica e sanitária do gênero em sistemas aquáticos de todo o mundo. Por este motivo e a fim de minimizar a desestabilização da nomenclatura resultante de novas combinações, sua conservação e rejeição do nome *Raphidiopsis* deverá ser proposta ao Comitê do Código Internacional de Nomenclatura Botânica mediante publicação na revista Taxon.

Por fim, com relação a *Anabaena*, o presente estudo corrobora resultados anteriores segundo os quais *Aphanizomenon* e *Anabaena* são gêneros polifiléticos intermisturados. Como não possuem um ancestral exclusivo, não compartilhado com representantes do outro gênero, a necessidade de revisão de ambos os gêneros e reagrupamento das espécies e linhagens proposta anteriormente com base no estudo de seqüências de *rbcLX* (Rubisco) e *ITS1* (espaço intergênico transcrito 16S-23S) (Gugger 2002) foi confirmada.

7. Conclusões

Concluimos, no presente estudo que:

1. As seqüências do gene codificador para a subunidade menor do RNA ribossômico (RNAr 16S) mostraram-se adequadas para o estudo das linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, uma vez que, de modo geral, foram congruentes com marcadores morfológicos na circunscrição genérica. Em nível específico, contudo, o gene nem sempre reflete as observações morfológicas, dado já ressaltado anteriormente por vários autores.
2. Para o gênero-forma *Aphanizomenon*, as seqüências de RNAr 16S confirmam sua grande heterogeneidade, uma vez que reúne tanto linhagens com características morfológicas de *Anabaena*, como linhagens morfológica e geneticamente mais próximas de *Cylindrospermopsis*.
3. A separação dos gêneros-forma *Raphidiopsis* e *Cylindrospermopsis* não é legítima do ponto de vista do gene RNAr 16S e ambos os gêneros devem ser considerados sinônimos. A conservação do nome *Cylindrospermopsis* parece mais adequada, conforme exposto na discussão. Todavia, uma vez que as seqüências de RNAr 16S do presente estudo são as primeiras seqüências longas do gene para *Raphidiopsis*, sugere-se a ampliação do número de seqüências desse gene, bem como de outras seqüências gênicas do gênero, a fim de conferir maior robustez aos resultados aqui obtidos.
4. Heterocitos não constituem caráter de importância diacrítica na diferenciação dos gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*. Embora produzam uma diferença morfológica conspícua, seus genes devem constituir somente porção ínfima do genoma, não justificando a separação dos dois gêneros.

8. Referências Bibliográficas

- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M.F.** 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Jornal of Bacteriology* 186: 2629-2635.
- Altschul, S. F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. &**

- Lipman, D.L.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Barker, G. L. A., Konopka, A., Handley, B. A. & Hayes, P. K.** 2000b. Genetic variation in *Aphanizomenon* (cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. *Journal of Phycology* 36: 947-950
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & Swings, J.** 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 147-167.
- Fiore, M. F., Moon, D. H., Tsai, S. M., Lee, H. & Trevors, J. T.** 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 39:159–69.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. & Jurtshuk, P.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* (42): 166-170.
- Garrrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J. & Tindall, B.J.** 2007. The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. TOBA Release 7.7, March 2007. Michigan State University Board of Trustees. [<http://www.taxonomicoutline.org/>]
- Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Couté, A., Humbert, J.-F. & Sivonen, K.** 2002. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 52, 1867–1880.
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. & Humbert, J.F.** 2005. Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* strains isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 1097-1100.
- 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.
- Iteman, I., Rippka, R., Marsac, I.T. & Herdman, M.** 2002. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* 148:481.
- Kechris, K., Lin, J., Bickel, P. & Glazer, A.** 2006. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9584-9589.

- Komárek, J. & Kaštovský, J.** 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines in cyanobacteria. *Algological Studies* 109 (Cyanobacterial Research 4): 305-326.
- Komárková, J.** 1998. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In *Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia*. M.T.P. Azevedo, D.P. Santos, L.S.C. Pinto, M. Menezes, M.T. Fujii, N.S. Yokoya, P.A.C. Senna & S.M.P.B. Guimarães (eds.). Sociedade Ficológica da America Latina e Caribe, São Paulo. v.1, p.327-340.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** 2005a. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(7):2567-2572.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** 2005b. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology*:6258-6264.
- Ludwig, W. & Klenk, H.-P.** 2001. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. D.R. Boone & R. W. Castenholz (eds). 2nd ed. New York, USA, Springer-Verlag, pp. 49-65.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, N., Weizenberger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K.H.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, v.19, p.554-568.
- Lyra, C., Suomalainen, S. & Gugger, M.** 2001. Molecular characterization of planktic Cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:513-526.
- Mylvaganam, S. & Dennis, P.P.** 1992. Sequence heterogeneity between the 2 genes encoding 16S ribosomal RNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula. marismortui*. *Genetics* 130: 399-410.
- Neilan, B.A., Dyble, J. & Paerl, H.W.** 2003. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA-IGS* nucleotide sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2567-2571.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Törökne, A., Burnes, B.P.** 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* . *Molecular Ecology* 12:113-140.
- Oren, A.** 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the

- Bacteriological Code. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1895–1902.
- Pereira, P., Li, R., Carmichael, W. W., Dias, E. & Franca, S.** 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. European Journal of Phycology 39: 681-688.
- Rajaniemi, P., Komárek, J., Willame, R., Hrouzek, P., Kastovská, K., Hoffmann, L. & Sivonen, K.** 2005. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. Algological Studies 117:371–91.
- Rosselló-Mora, R.** 2005. Updating prokaryotic taxonomy. Journal of Bacteriology 187(18):6255-6257.
- Saker, M.L., Neilan B.A. & Griffiths. D.J.** 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. Journal of Phycology 35(3):599-606.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44:846–9.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** 2007. MEGA4.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.
- Wang, Y. & Zhang, Z. S.** 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. Microbiology 146: 2845-2854.
- Wang, Q. G., Garrity, M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R.** 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Appl Environ Microbiol. 73(16):5261-7.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R. & Ruff-Roberts, A.L.** 1992. Ribosomal analysis of microorganisms as they occur in nature. Advanced Microbial Ecology 12:219-286.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, L. & Moore, L. H.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 37:463–4.

Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Komárek, J., Hoffmann, L. & Wilmotte, A. 2005. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology* 42:1312–1332.

Wilmotte, A. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, *In* D. A. Bryant (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 1–25.

Anexo 1

Seqüências de RNAr 16S das linhagens de *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* estudadas.

SPC 339 *Cylindrospermopsis raciborskii* – 1412 pb

10 20 30 40 50 60 70 80

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATGCTTAGGCATCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
90 100 110 120 130 140 150 160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTGAGAATCTGGCTCCAGGTCGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGATTTAT
170 180 190 200 210 220 230 240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGGTGTAAGGGACCACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGA
250 260 270 280 290 300 310 320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGG
330 340 350 360 370 380 390 400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGT
410 420 430 440 450 460 470 480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA
490 500 510 520 530 540 550 560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAAGTCAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACTACAGAAGTCTAGAGTGCAGTGGGGCAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC
650 660 670 680 690 700 710 720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG
730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC
810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGC
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAG
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
 1370 1380 1390 1400 1410
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
 CCCCACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

SPC 811 - *Cylindrospermopsis*– 1412 pb

10 20 30 40 50 60 70 80
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GATGAGCGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGATGCTTAGGCATCTAGTGCGGACGCGGTGAGTAACGC
 90 100 110 120 130 140 150 160
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GTGAGAATCTGGCTCCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGATTTAT
 170 180 190 200 210 220 230 240
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGGTGTAAGGGACCACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGA
 250 260 270 280 290 300 310 320
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGG
 330 340 350 360 370 380 390 400
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAGGAAGAAAGT
 410 420 430 440 450 460 470 480

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA
490 500 510 520 530 540 550 560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACTACAGAACTAGAGTGCAGGTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC
650 660 670 680 690 700 710 720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG
730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC
810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGGGCGC
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAG
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
1370 1380 1390 1400 1410

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
CCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

SPC 704 – *Aphanizomenon* sp. – 1413pb

10	20	30	40	50	60	70	80
....							
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATGCTTAGGCATTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC							
90	100	110	120	130	140	150	160
....							
GTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGGAAGGTGAAAGATTTAT							
170	180	190	200	210	220	230	240
....							
TGCCTGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGAGGGGTAAAAGCCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGA							
250	260	270	280	290	300	310	320
....							
GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGG							
330	340	350	360	370	380	390	400
....							
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGT							
410	420	430	440	450	460	470	480
....							
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA							
490	500	510	520	530	540	550	560
....							
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAATCACGCTCAACGTGATCAAAGCAGTGGA							
570	580	590	600	610	620	630	640
....							
AACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCGAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC							
650	660	670	680	690	700	710	720
....							
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG							
730	740	750	760	770	780	790	800
....							
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC							
810	820	830	840	850	860	870	880

```

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
      890      900      910      920      930      940      950      960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGCGCCTTAGGGAGCGC
      970      980      990     1000     1010     1020     1030     1040
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
     1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTA CTGCAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAA
     1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCA
     1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350     1360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCATACTGCAGTGAATTTCGTTCCAGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATT
     1370     1380     1390     1400     1410
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
ACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGA CTGGGGTGAA

```

SPC 649 *Aphanizomenon* sp. – 1417pb

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATGCTTAGGCATTTAGTGCGCGACGGGTGAGTAACGC
      90      100     110     120     130     140     150     160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGGAAGGTGAAAGATTTAT

```

170 180 190 200 210 220 230 240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCCTGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGAGGGGTAAAAGCCCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGA
250 260 270 280 290 300 310 320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGG
330 340 350 360 370 380 390 400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGAAAGCCAGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGT
410 420 430 440 450 460 470 480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA
490 500 510 520 530 540 550 560
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGATGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAATCACGCTCAACGTGATCAAAGCAGTGGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCAAAAGGAATTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC
650 660 670 680 690 700 710 720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGCAGCTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG
730 740 750 760 770 780 790 800
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC
810 820 830 840 850 860 870 880
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
890 900 910 920 930 940 950 960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGC
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC

1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
....							
AGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAA							
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
....							
TCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCA							
1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
....							
GCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATT							
1370	1380	1390	1400	1410			
....							
ACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCC							

[illegible]

ATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGTAGTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCACGCTCAACGTGATCAAAGCAGTGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CTACACAAC TAGAGTACGGTAGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGG
650 660 670 680 690 700 710 720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGCGAAAGCGTTCTGCTAGACCTGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTA
730 740 750 760 770 780 790 800
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCG
810 820 830 840 850 860 870 880
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATT
890 900 910 920 930 940 950 960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTGCGCAATCTCGATGAAAATTGAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGA
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTATT
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAG
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATGCCCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTCCGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATC
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCATAAACCGGGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATTGCTAGTAATTGCAGGTCAGC
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCGAAGTCATTAC
1370 1380 1390 1400 1410
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|. .
CCCAACCGAAAGGGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

SPC 820- *Cylindrospermopsis* -1411 pb

	10	20	30	40	50	60	70	80
.....								
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGATGCTTAGGCATCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC								
	90	100	110	120	130	140	150	160
.....								
GTGAGAATCTGGCTCCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGATTAT								
	170	180	190	200	210	220	230	240
.....								
CGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGA								
	250	260	270	280	290	300	310	320
.....								
GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGG								
	330	340	350	360	370	380	390	400
.....								
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAAGT								
	410	420	430	440	450	460	470	480
.....								
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA								
	490	500	510	520	530	540	550	560
.....								
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAAGTCAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGA								
	570	580	590	600	610	620	630	640
.....								
AACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCAAAAGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC								
	650	660	670	680	690	700	710	720
.....								
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGAATTAGATACCCAG								
	730	740	750	760	770	780	790	800
.....								
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC								
	810	820	830	840	850	860	870	880
.....								
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA								
	890	900	910	920	930	940	950	960
.....								

TCCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGC
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTC
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTCAG
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CATACTGCAGTGATTTTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
 1370 1380 1390 1400 1410
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
 CCCC AACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

SPC 969- *Cylindrospermopsis raciborskii* - 1412 pb

10 20 30 40 50 60 70 80
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATGCTTAGGCATCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
 90 100 110 120 130 140 150 160
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GTGAGAATCTGGCTCCAGGTCGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGAGAGGTGAAAGATTTAT
 170 180 190 200 210 220 230 240
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGGTGTAAGGGACCACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGA
 250 260 270 280 290 300 310 320
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
 330 340 350 360 370 380 390 400

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGT
410 420 430 440 450 460 470 480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA
490 500 510 520 530 540 550 560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACTACAGAAGTCTAGAGTGCAGTGGGGCAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC
650 660 670 680 690 700 710 720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG
730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC
810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGC
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTCAG
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CATACTGCAGTGAATTCGTCCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
 1370 1380 1390 1400 1410
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|..
 CCCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

SPC 640 - *Aphanizomenon* – 1411 pb

10 20 30 40 50 60 70 80
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 90 100 110 120 130 140 150 160
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTG
 170 180 190 200 210 220 230 240
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
 250 260 270 280 290 300 310 320
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCG
 330 340 350 360 370 380 390 400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGA
 410 420 430 440 450 460 470 480
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATG
 490 500 510 520 530 540 550 560
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGTAGTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGA
 570 580 590 600 610 620 630 640
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CTACACAACCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACGCCGG
 650 660 670 680 690 700 710 720
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGGCGAAAGCGTTCTGCTAGACCTGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTA
 730 740 750 760 770 780 790 800

[illegible]

TTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAG
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
 1370 1380 1390 1400 1410
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
 CCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACCGGGGTGAA

FURGCY001- *Raphidiopsis brookii* -1412 pb

10 20 30 40 50 60 70 80
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCAACGAGATGCTTAGGCATCTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGC
 90 100 110 120 130 140 150 160
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GTGAGAATCTGGCTCCAGGTGCGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGATTTAT
 170 180 190 200 210 220 230 240
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGGTGTAAGGGACCACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGA
 250 260 270 280 290 300 310 320
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAATGGGGAATTTCCGCAATGGG
 330 340 350 360 370 380 390 400
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGT
 410 420 430 440 450 460 470 480
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA
 490 500 510 520 530 540 550 560

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGA
570 580 590 600 610 620 630 640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACTACAGAACTAGAGTGCAGTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACC
650 660 670 680 690 700 710 720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAG
730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCC
810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAA
890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGC
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTC
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAG
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA
1370 1380 1390 1400 1410
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|..
CCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTGAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

CAPÍTULO 3

Produção de toxinas por linhagens brasileiras de cianobactérias dos gêneros

***Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales)**

**ABSTRACT – (Toxin production by Brazilian strains of *Aphanizomenon*,
Cylindrospermopsis and *Raphidiopsis* (Cyanobacteria, Nostocales))**

The cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 and *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) are known producers of neuro and citotoxins worldwide. In Brazil, most references of their toxicity are related to toxic blooms and relatively few species or strains were tested for toxin production. Therefore, the present study aimed to verify, through mouse bioassays, the toxin production by ten Brazilian strains belonging to the three genera. The two tested *Cylindrospermopsis* strains and one of the two *Raphidiopsis* strains showed to be neurotoxic. None of the tested *Aphanizomenon* strains showed toxicity in the bioassay.

KEY WORDS - Mouse bioassay, neurotoxicity

RESUMO – (Produção de toxinas por linhagens brasileiras de cianobactérias dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales))

As cianobactérias pertencentes aos gêneros *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888 e *Raphidiopsis* Fritsch et Rich 1929 (Nostocales) são conhecidas produtoras de neuro e citotoxinas no mundo. No Brasil, grande parte das referências a cianotoxinas são relativas a florações e poucas espécies ou linhagens foram testadas quanto à produção de toxinas. Assim, o objetivo do presente estudo foi testar, através de bioensaio com camundongos, a produção de toxinas por dez linhagens brasileiras dos três gêneros. As duas linhagens de *Cylindrospermopsis* e uma das duas linhagens de *Raphidiopsis* testadas revelaram-se neurotóxicas. Das linhagens de *Aphanizomenon* testadas, nenhuma mostrou-se tóxica.

PALAVRAS-CHAVE: Bioensaio com camundongos, neurotoxicidade

1. Introdução

1.1. Cianotoxinas

Cianotoxinas são metabólitos primários ou secundários de cianobactérias, com efeito lesivo a outros organismos (Codd et al. 2005). Como biotoxinas, são responsáveis, entre outros, pela intoxicação aguda e (sub)crônica de animais selvagens e domésticos, bem como de populações humanas (Appeldoorn *et al.* 2007). Mais de 55 espécies de cianobactérias, pertencentes a 30 gêneros, já foram identificadas como produtoras de toxinas (Cronberg *et al.* 2004). O papel dos compostos tóxicos não está inteiramente esclarecido, supondo-se funções ecológicas (alelopatia e proteção à predação) e fisiológicas (manutenção da homeostase, adaptação cromática, transporte de ferro e estocagem de determinados elementos) (Leflaive & Ten-Hage 2007).

As principais classes de toxinas produzidas por cianobactérias de ambientes límnicos e salobros são os oligopeptídeos de efeito hepatotóxico em mamíferos (microcistinas e nodularinas), os alcalóides neurotóxicos (saxitoxinas ou “*Paralytic Shellfish Poisons*” e anatoxinas) ou citotóxicos (cilindrospermopsinas) e os lipopolissacarídeos de ação irritativa sobre pele e mucosas (Appeldoorn *et al.* 2007). São ainda produzidos por representantes do grupo peptídeos bioativos menos comuns como espumiginas, microviridinas, suomilidas, todas de efeito inibitório sobre a protease de serinas, nostocoficinas de ação relaxante e anabaenopeptinas inibidoras de carboxipeptidases (Harada 2004), além de outros compostos nocivos à saúde humana e animal: betametilaminoalanina (BMAA) (Cox *et al.* 2005), aeruginoguanidinas, microcina, oscillatorina (Berlinck & Kossuga 2005), entre outros.

Inúmeros episódios de intoxicação humana e animal relacionados a florações de cianobactérias têm sido reportados desde o século XIX, sobretudo na Europa e Austrália

(Codd *et al.* 2005). No Brasil, os eventos mais graves relacionados a cianotoxinas envolvem vítimas fatais na região da Barragem de Itaparica, Bahia, em 1988 (Teixeira *et al.* 1993), e em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, em 1996 (Jochimsen *et al.* 1998, Azevedo *et al.* 2002). Ao lado da descrição de hepatocarcinomas letais promovidos por microcistinas na China (Yu 1995) e das mortes por doença neurodegenerativa relacionadas à BMAA entre os chamorros de Guam, no Oceano Pacífico, e de pacientes canadenses (Cox *et al.* 2005), as ocorrências no Brasil são os únicos relatos de morte humana associada a cianotoxinas produzidas em ambientes de água doce. Todavia, há inúmeros casos de gastroenterite, comprometimento hepático, renal e intestinal, dermatites de contato e febre ocasionados por cianotoxinas no Brasil e no mundo (Hunter 1998), além de incontáveis episódios de morte de animais selvagens e domésticos (para uma revisão, ver Codd *et al.* 2005, Falconer 2005).

Bartram *et al.* (1999), Azevedo *et al.* (1994), entre outros autores, relacionam o aumento do risco de intoxicação por cianotoxinas nas últimas décadas com o aumento da frequência e extensão de florações de cianobactérias em corpos d'água de todo mundo, decorrentes, principalmente, do agravamento da poluição orgânica dos mesmos. Segundo Azevedo (1998), cerca de 50% das florações de cianobactérias testadas em bioensaios em diferentes partes do planeta mostraram-se tóxicas.

1.2. Produção de toxinas por *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*

Os gêneros *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault 1888, *Cylindrospermopsis* Seenayya & Subba Raju 1972 e *Raphidiopsis* Fritsch & Rich 1929, pertencentes à ordem Nostocales, são conhecidos produtores de cianotoxinas (tabelas 1, 2 e 3).

Em função do extensivo consumo de *Aphanizomenon flos-aquae* como complemento

alimentar, da descrição da maioria das linhagens da espécie como não-tóxicas e da reclassificação de várias linhagens incorretamente identificadas (Li et al. 2000, Li et al. 2003, Pereira et al. 2004), Li et al. (2003) questionam a produção de toxinas por esta espécie. Contudo, várias outras espécies de *Aphanizomenon* são, comprovadamente, produtoras de compostos tóxicos em diversas partes do mundo (tabela 1).

No Brasil, os únicos registros de produção de toxina pelo gênero são os de Vieira (2002) e Vieira et al. (2005) (tabela 1), que demonstraram a produção de hepatotoxina por *Aphanizomenon* cf. *gracile* através de bioensaio em camundongos, porém não identificaram o composto em questão.

Para *Cylindrospermopsis*, a espécie *C. raciborskii* foi relatada como produtora de cilindrospermopsina e deoxicilindrospermopsina na América do Norte, Ásia e Oceania e de saxitoxinas no Brasil (tabela 2). Na Europa, a produção de cilindrospermopsina pela espécie ainda é matéria de controvérsia (Fastner et al. 2007). Embora a toxina tenha sido detectada em corpos d'água europeus concomitantemente à ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii*, a espécie não foi confirmada como sua produtora (Manti et al. 2005, Fastner et al. 2007). Entretanto, outros compostos tóxicos são relatados tanto para a Europa, como para a África (tabela 2).

Três espécies de *Raphidiopsis* foram identificadas como produtoras de cianotoxinas no mundo (tabela 3). No Brasil, *Raphidiopsis brookii* foi recentemente relatada como produtora “Paralytic Shellfish Poisons” (PSPs), sendo este o primeiro registro de produção de saxitoxinas pelo gênero (Yunes et al. 2007).

Tabela 1. Toxinas produzidas por espécies de *Aphanizomenon*.

Espécie	Toxina produzida	Origem geográfica	Referência
<i>A. flos-aquae</i>	PSP	New Hampshire, Estados Unidos ^a	Sawyer <i>et al.</i> 1968, Adelman <i>et al.</i> 1982, Mahmood & Carmichael 1986
	PSP	Portugal ^b	Pereira <i>et al.</i> 2000
	PSP	Portugal	Ferreira 2001
	PSP	—	Ikawa 1982
	PSP	China	Chen 2003, Liu <i>et al.</i> 2006a,b
<i>A. gracile</i>	Anatoxina-a	—	Rapala 1993
	Cilindrospermopsina	Alemanha	Preussel <i>et al.</i> 2006
	Mueggelone	não-mencionada	Papendorf <i>et al.</i> 1997
	PSP	Portugal	Pereira <i>et al.</i> 2004
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	Hepatotoxina	Pará, Brasil	Vieira 2002, Vieira <i>et al.</i> 2005
<i>A. issatschenkoi</i>	PSP	Portugal	Nogueira <i>et al.</i> 2004
<i>A. issatschenkoi</i> ^c	Anatoxina-a	Nova Zelândia	Selwood <i>et al.</i> 2007, Wood <i>et al.</i> 2007
<i>A. ovalisporum</i>	Cilindrospermopsina	Israel	Banker <i>et al.</i> 1997
<i>A. ovalisporum</i>	Cilindrospermopsina	Austrália	Shaw <i>et al.</i> 1999
<i>A. ovalisporum</i>	7-epicilindrospermopsina	Israel	Banker <i>et al.</i> 2000
<i>Aphanizomenon</i> sp.	Anatoxina-a	Finlândia	Sivonen <i>et al.</i> 1989
<i>Aphanizomenon</i> sp	Cilindrospermopsina	Alemanha	Fastner <i>et al.</i> 2007

a: populações da natureza e linhagem NH-5 reclassificadas como *Aphanizomenon* sp. por Li *et al.* (2000), linhagem NH -5 posteriormente identificada como *A. gracile* (Pereira *et al.* 2004, **b:** linhagem LMECYA31 reclassificada como *A. issatschenkoi* por Li *et al.* (2003), **c:** inicialmente identificada como *Raphidiopsis mediterranea* (Wood *et al.* 2007).

Tabela 2. Toxinas produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Toxina produzida	Origem geográfica	Referência
Cilindrospermopsina	Austrália	Hawkins <i>et al.</i> 1985, 1997, Ohtani <i>et al.</i> 1992, Falconer <i>et al.</i> 1998, Saker & Griffith 2000, Saker <i>et al.</i> 1999, McGregor & Fabbro 2000, Saker & Neilan 2001
	Estados Unidos	Carmichael 2002
	China (verificar)	Shen <i>et al.</i> 2002
	Tailândia	Li <i>et al.</i> 2001a
	Nova Zelândia	Wood & Stirling 2003
	Tailândia e Japão	Chonudomkul <i>et al.</i> 2004
Deoxicilindrospermopsina	Australia	Norris <i>et al.</i> 1999
	Tailândia	Li <i>et al.</i> 2001a
	Nova Zelândia	Wood & Stirling 2003
Saxitoxinas	Brasil (São Paulo)	Lagos <i>et al.</i> 1999, Pomati <i>et al.</i> 2003, 2004, Castro <i>et al.</i> 2004, Yunes <i>et al.</i> 2003
	Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul)	Yunes <i>et al.</i> 2003
	Brasil (Pernambuco)	Molica <i>et al.</i> 2002
Anatoxina	Hungria	Kiss <i>et al.</i> 2002
BMAA	Austrália	Cox <i>et al.</i> 2005
Hepatotoxina não-identificada	Hungria	Hiripi <i>et al.</i> 1998
	Alemanha	Fastner <i>et al.</i> 2003
	Portugal	Saker <i>et al.</i> 2003
	França	Bernard <i>et al.</i> 2003
	Egito	Mohamed 2007

Tabela 3. Toxinas produzidas por espécies de *Raphidiopsis*.

Espécie	Toxina produzida	Origem geográfica	Referência
<i>Raphidiopsis curvata</i>	Cilindropermopsina e deoxicilindropermopsina	China	Li <i>et al.</i> 2001b.
<i>R. mediterranea</i>	Anatoxina-a, homoanatoxina-a	Japão	Watanabe <i>et al.</i> 2003, Namikoshi <i>et al.</i> 2003, 2004
<i>R. mediterranea</i>	Neurotoxina	Egito	Mohamed 2007
<i>R. brookii</i>	PSP	Brasil (Rio Grande do Sul)	Yunes <i>et al.</i> 2007

1.3. Caracterização das principais toxinas produzidas por *Cylindropermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis*

1.3.1. Cilindropermopsina

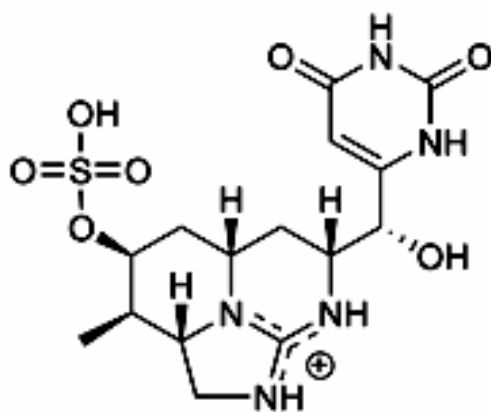


Figura 1. Fórmula estrutural da cilindropermopsina (Sivonen & Jones 1999).

A cilindropermopsina é um alcalóide tricíclico com um grupo guanidínico central e um grupo hidroximetiluracil (Figura 1). Molécula altamente hidrossolúvel, inibe a síntese protéica e possui capacidade de intercalação em moléculas de DNA, causando quebra cromossômica

em DNA replicante (Falconer 2005). Em decorrência da interferência sobre inúmeras vias metabólicas, exerce efeitos hepatotóxicos (Hawkins et al. 1985), citotóxicos (Runnegar et al. 1994), neurotóxicos (Kiss et al. 2002), mutagênicos (Humpage et al. 2000) e teratogênicos (Rogers et al. 2007), além de possuir propriedades dermoirritantes (Stewart et al. 2006). A injeção intra-peritoneal de doses próximas à DL_{50} em camundongos provoca necrose hepática, hemorragia pulmonar e dano renal (Falconer 2005). Doses elevadas da toxina levam os animais à morte por falha progressiva dos órgãos (Harada et al. 1999). Os sintomas apresentados incluem fraqueza, depressão respiratória, diarreia e piloereção (Suknik et al. 1998).

A toxina possui dois homólogos descritos: deoxicilindrospermopsina e 7-epicilindrospermopsina. Inicialmente, o primeiro foi considerado como não-tóxico em bioensaios com camundongos (Norris et al. 1999, Li et al. 2001a). Todavia, experimentos recentes *in vitro* demonstraram sua atividade inibitória da síntese protéica (Falconer 2005). O segundo possui a mesma toxicidade da cilindrospermopsina. A DL_{50} para a injeção intra-peritoneal desta em camundongos é de cerca de $2,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ para 24 horas e $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ para 5 a 6 dias (Ohtani et al. 1992). Recentemente, foram descritos três putativos genes envolvidos em sua biossíntese, sendo um codificador de policetídeo sintase (aoaA), outro de peptídeo sintetase não-ribossomal (aoaB) e o terceiro de uma amidinotransferase (Kellmann et al. 2006).

Até o presente, a cilindrospermopsina foi descrita em oito espécies de cianobactérias, pertencentes às ordens Nostocales e Oscillatoriales: *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins et al. 1985, Hawkins et al. 1997, Li et al. 2001a), *Anabaena bergii* (Schembri et al. 2001, Fergusson & Saint 2003), *A. lapponica* (Spoof et al. 2006), *Umezakia natans* (Harada et al. 1994), *Raphidiopsis curvata* (Li et al. 2001b), *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al.

1997, Shaw et al. 1999), *A. flos-aquae* (Preussel 2006) e *Lyngbya wollei* (Seifert et al. 2007). No Brasil, embora tenha sido detectada em corpos d'água do país, não foi associada ainda a nenhuma espécie de cianobactéria (Falconer 2005).

Os casos conhecidos de intoxicação humana por cilindrospermopsina remontam a 1884, com a incidência da chamada “Febre de Barcoo” na Austrália, cujos sintomas descritos, bem como seu desaparecimento após substituição da fonte de água potável, apontam para a cianotoxina, desconhecida à época, como sua causa (Hayman 1992). Além desse episódio, a literatura menciona ainda como relacionados à cilindrospermopsina o surto de gastroenterite que atingiu cerca de 150 pessoas em Palm Island, Austrália, em 1979, e, possivelmente, o trágico evento em Caruaru, Pernambuco, no qual mais de 50 pacientes de uma clínica de hemodiálise vieram a óbito em 1996. Neste último caso, porém, o envolvimento da cilindrospermopsina nas mortes não foi comprovado, permanecendo matéria de especulação (Carmichael et al. 2001, Codd et al. 2005).

1.3.2. Saxitoxinas

As saxitoxinas, conhecidas como toxinas paralisantes de moluscos (“*Paralytic Shellfish Poisons*”, PSPs), são alcalóides guanidínicos que possuem um grupo carbamato. Podem estar sulfatadas (goniautoxinas ou B-toxinas monossulfatadas ou C-toxinas bisulfatadas) ou não (saxitoxinas propriamente ditas (figura 2)). Há mais de 16 variantes estruturais descritas (Sivonen & Jones 1999).

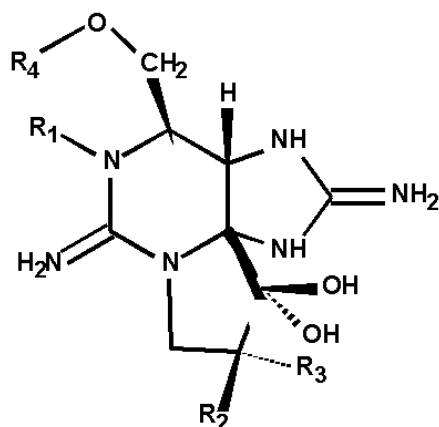


Figura 2. Fórmula estrutural geral das saxitoxinas (Sivonen & Jones 1999).

Exercem seu efeito tóxico através do bloqueio dos canais de sódio das células nervosas, inibindo a condução do estímulo nervoso em nervos e músculos. A morte ocorre primariamente por parada respiratória e asfixia.

Em seres humanos, a DL_{50} para a ingestão de saxitoxinas foi estabelecida em $5,7 \mu\text{m Kg}^{-1}$. Para a inalação de aerossóis com a toxina, a DL_{50} é de cerca de $5\text{mg min}^{-1} \text{m}^{-3}$ (Patockaa & Stredab 2002). A DI_{50} para injeção intraperitoneal em camundongos é de $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Kuiper-Goodman *et al.* 1999).

As saxitoxinas são encontradas em dinoflagelados marinhos (*Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum* e *Pyrodinium bahamensei*, entre outros), produzidos por endobactérias heterotróficas ou pelos próprios organismos (Gallacher *et al.* 1997) e em 5 espécies de cianobactérias de água doce e salobra: *Anabaena circinalis* (Humpage *et al.* 1994, Negri *et al.* 1995, 1997), *Aphanizomenon flos-aquae* (Jackim & Gentile 1968, Ikawa *et al.* 1982, Mahmood & Carmichael 1986), *Lyngbya wollei* (Carmichael *et al.* 1997, Onodera *et al.* 1997), *Planktothrix* sp. (Pomati *et al.* 2000) e, no Brasil, *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Lagos *et al.* 1997).

Não há nenhum registro de envenenamento humano pela toxina relacionado a cianobactérias, mas inúmeros eventos de intoxicação, inclusive com vítimas fatais, pelo consumo de moluscos com acúmulo de saxitoxinas produzidas por dinoflagelados marinhos (Kuiper-Goodman *et al.* 1999).

1.3.3. Anatoxina-a

A anatoxina-a e seu homólogo homoanatoxina-a, alcalóides de baixo peso molecular, são aminas secundárias (figura 3). Mimetizam o efeito da acetilcolina e impedem a condução do estímulo nervoso aos músculos (Sivonen & Jones 1999).

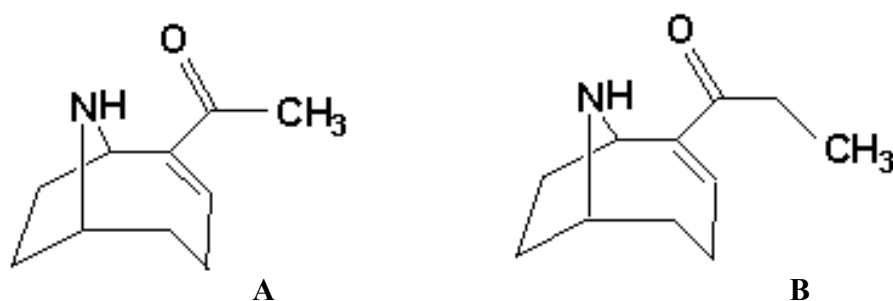


Figura 3. Fórmula estrutural da anatoxina-a (A) e homoanatoxina-a (B) (Devlin *et al.* 1977).

Através de sua ligação com os receptores neuromusculares pós-sinápticos, a anatoxina-a e a homoanatoxina-a ocasionam a despolarização local através do influxo de íons Na⁺, com conseqüente abertura dos canais voltagem-dependentes de Ca⁺⁺ e Na⁺. Não sendo degradadas pela acetilcolinesterase, provocam a despolarização irreversível da membrana das fibras

musculares e superestimulação muscular. Os sintomas manifestos são paralisia e convulsões e a morte ocorre por parada respiratória e asfixia. A DL_{50} intra-peritoneal para camundongos é de $375 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Fitzgeorge *et al.* 1994 *apud* Sivonen & Jones 1999).

Até o presente, as seguintes espécies de cianobactérias foram relatadas como produtoras de anatoxina-a e/ou homoanatoxina-a: *Anabaena flos-aquae* (Carmichael *et al.* 1975, Devlin *et al.* 1977), *A. planctonica* (Bruno *et al.* 1994), *A. circinalis* (Fergusson & Saint 2000), *Anabaena* sp. (Sivonen *et al.* 1989, Bumke-Vogt 1999, James *et al.* 1997, Park & Watanabe 1996), *Aphanizomenon issatschenkoi* (Selwood *et al.* 2007, Wood *et al.* 2007), *Aphanizomenon* sp. (Sivonen *et al.* 1989, Bumke Vogt 1999), *Cylindrospermum* sp. (Sivonen *et al.* 1989), *Microcystis* sp. (Park & Watanabe 1996), *Oscillatoria* sp. (Edwards *et al.* 1992, Aráoz *et al.* 2005), *Oscillatoria formosa* (Aráoz *et al.* 2005), *Planktothrix* sp. (Sivonen *et al.* 1989), *P. rubescens* (Viaggiu 2004), *Phormidium favosum* (Gugger *et al.* 2005), *Raphidiopsis mediterranea* (Namikoshi *et al.* 2003, 2004).

2. Objetivos

Considerando a crescente ameaça das cianotoxinas à saúde animal e humana e a escassez de informações sobre espécies de cianobactérias produtoras de toxinas no Brasil, o presente trabalho tem como objetivo verificar a produção de neuro e citotoxinas por dez linhagens brasileiras de cianobactérias da ordem Nostocales pertencentes a três gêneros potencialmente tóxicos: *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault and *Raphidiopsis* Fritsch & Rich.

3. Material & Métodos

A tabela 4 apresenta as dez linhagens estudadas. Nove pertencem à Coleção de Culturas de Algas e Cianobactérias do Instituto de Botânica da Secretaria de Estado de Meio Ambiente de São Paulo e uma é originária da Coleção de Culturas do Departamento de Ciências Morfo-Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul.

A produção de toxinas foi avaliada através de bioensaio em camundongos, segundo Cunniff (1995).

Tabela 4. Linhagens de *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas.

Táxon putativo^a	Linhagem	Origem Geográfica	Ano de isolamento
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 649	Lagoa Manguaba, Maceió, AL (9°40'S 35°48' W)	
<i>Aphanizomenon</i> sp.	SPC 704	Maceió, AL	
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	SPC 640	Lago Bolonha, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Aphanizomenon gracile</i>	SPC 668	Reservatório Água Preta, Belém, PA (1°27'S 48°30'W)	1999
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 811	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2000
<i>Cylindrospermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	SPC 820	Lago das Garças, São Paulo, SP (23°39'S 46°37'W)	2001
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 339 ^b	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	SPC 969	Represa do Broa, São Carlos, SP (22°12'S 47°52'W)	2004
<i>Raphidiopsis brookii</i>	SPC 338 ^c	Represa Billings, São Paulo, SP (23°48'S 46°34'W)	1996
<i>Raphidiopsis brookii</i> .	FURG CY 001	Lago dos Biguás, Rio Grande, RS (32°04' S 52°10' W)	2004

^a Identificações segundo capítulo 1 da presente tese. ^b denominada de *Braz2* por Dyble *et al.* 2002 e Neilan *et al.* 2003; *brazil 2* por Wilson *et al.* 2000; e como T3 por Lagos *et al.* 1999, Pomati *et al.* 2004, Jungblut & Neilan 2006 e Kellmann *et al.* 2006. ^c classificada como *Cylindrospermopsis raciborskii* por Lagos *et al.* 1999 e Castro *et al.* 2004 e denominada de T2 pelos primeiros autores e de C10 por Castro *et al.* 2004.

3.1. Crescimento e extração

A biomassa para extração das substâncias polares foi obtida no Laboratório de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. As culturas uniespecíficas não-axênicas foram crescidas em 2 L. de meio ASM1 (Gorham *et al.* 1964), temperatura de $25,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância de $40 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes e fotoper\u00edodo de 14 hs.

Ap\u00f3s crescimento das culturas, procedeu-se a sua liofiliza\u00e7\u00e3o, pesagem e extra\u00e7\u00e3o das subst\u00e2ncias polares. O material liofilizado foi extra\u00eddo quatro vezes com \u00e1cido ac\u00e9tico 5%, segundo Hawkins (1997). A fim de romper as c\u00e9lulas e liberar as toxinas em cada etapa da extra\u00e7\u00e3o, as amostras foram expostas a ultrassom por 20 minutos (ultrassonicador Cole-Parmer modelo 8549-00) e posteriormente centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm (ultracentr\u00edfuga Hermle Z230). Ao final, o \u00e1cido ac\u00e9tico foi retirado por rotoevapora\u00e7\u00e3o seguida de liofiliza\u00e7\u00e3o. Os extratos liofilizados foram mantidos a -20°C at\u00e9 sua utiliza\u00e7\u00e3o no bioensaio.

3.2. Bioensaio com camundongos

Os bioensaios foram realizados no \u00e2mbito do projeto “Estudos qu\u00edmicos e biol\u00f3gicos de cepas de cianobact\u00e9rias”, no Laborat\u00f3rio Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan de S\u00e3o Paulo, com aprova\u00e7\u00e3o da Comiss\u00e3o de Bio\u00e9tica (anexo 1).

Para cada animal-teste, inicialmente 20 mg do material liofilizado foram ressuspensos em 0,5 mL de \u00e1gua bideionizada esterilizada. Tr\u00eas camundongos machos “Swiss-Webster” com peso entre 20 e 25g foram injetados intra-peritonealmente. Para controle, 2 camundongos foram injetados com 0,5 mL da \u00e1gua bideionizada esterilizada

sem toxina. Os animais foram acompanhados por sete dias, com anotação do tempo de morte, sintomas e, no caso de suspeita de citotoxina, autópsia para observação de sinais internos como hemorragia hepática, renal, pulmonar ou estomacal. Resultados dúbios foram repetidos com aumento da dose injetada para 25 mg.

4. Resultados

As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados dos bioensaios.

As linhagens SPC640 - *Aphanizomenon gracile* e SPC668 - *Aphanizomenon* cf. *gracile* não puderam ser testadas. De crescimento excessivamente lento, as linhagens não produziram biomassa suficiente para a realização do ensaio.

Tabela 3. Resultados do bioensaio com camundongos (N=3, dose injetada: 20mg de extrato).

Linhagem	Táxon putativo	Número de animais mortos	Tempo de morte	Sintomas observados	Toxina
SPC 649	<i>Aphanizomenon</i> sp.	0	—	—	—
SPC 704	<i>Aphanizomenon</i> sp.	0	—	—	—
SPC 811	<i>Cylindropermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	0	—	—	—
SPC 820	<i>Cylindropermopsis</i> / <i>Raphidiopsis</i>	0	—	—	—
SPC 969	<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	1	3min00s	Dispnéia, convulsões	Neurotoxina
SPC 339	<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	3	2min20s 2min30s 2min25s	Dispnéia, convulsões, ‘pedalagem’	
SPC 338	<i>Raphidiopsis brookii</i>	2	2min42s 2min01s	Dispnéia, convulsões	Neurotoxina
FURG CY 001	<i>Raphidiopsis brookii</i>	0	—	Prostração, dispnéia	—

Tabela 4. Resultados do bioensaio com camundongos (N=3, dose injetada: 25mg de extrato).

Linhagem	Táxon putativo	Número de animais mortos	Tempo de morte	Sintomas observados	Toxina
SPC 969	<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	2	1min45s 1min00s	Dispnéia, convulsões	Neurotoxina
FURGCY001	<i>Raphidiopsis brookii</i>	0	—	—	—

Não se observaram quaisquer sintomas nos camundongos-controle injetados com água deionizada.

5. Discussão

As linhagens SPC338 e SPC339 (*Raphidiopsis brookii* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, respectivamente), referidas pela primeira vez como produtoras de saxitoxinas por Lagos *et al.* 1999, foram confirmadas como produtoras de neurotoxina pelo presente estudo. Não tendo sido observada salivação nos animais (sintoma característico da anatoxina a-s), a toxina responsável por sua morte ou é uma anatoxina ou pertence à classe das saxitoxinas. Os sintomas de ambas são muito semelhantes e dificilmente diferenciáveis em bioensaios com camundongos.

Embora mantidas em cultura por mais de dez anos (as linhagens foram isoladas em 1996), não perderam sua condição tóxica, expressando-a mesmo em condições favoráveis de irradiância e temperatura, abundância nutricional e aparente ausência de fatores seletivos (herbivoria, competição). Assim sendo, a hipótese da função homeostática da saxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii*, proposta por Pomati *et al.* (2004 a,b), parece bastante provável. A saxitoxina teria o papel de bloquear o influxo de íons Na^+ , contribuindo, em condições alcalinas ou salinas do meio, para a manutenção dos níveis citoplasmáticos normais de Na^+ , bem como do pH intracelular neutro (Pomati *et al.* 2004). Uma vez que as condições preferenciais de crescimento de *Cylindrospermopsis* incluem pHs do meio mais elevados, o organismo necessita de mecanismos mantenedores da homeostase intracelular.

A linhagem SPC969 (*C. raciborskii*), mostrou-se igualmente neurotóxica, porém a uma dosagem maior (25mg de extrato liofilizado). Novamente não foi observada salivação nos animais, apontando para a anatoxina ou saxitoxina como causa de morte.

As linhagens de *Cylindrospermopsis/Raphidiopsis* (SPC811 e SPC820) isoladas do Lago das Garças, São Paulo, não apresentaram toxicidade.

A linhagem FURGICY001 (*Raphidiopsis brookii*), referida por Yunes *et al.*(2007) como produtora de saxitoxina, não foi comprovada como neurotóxica pelo presente estudo. Eventualmente, tal observação pode estar relacionada ao fato da linhagem ser proveniente de latitudes mais altas e estar, portanto, adaptada a temperaturas mais baixas. Castro *et al.* (2004) relataram a redução na produção de saxitoxinas por linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii* cultivada em temperatura mais alta (25⁰C), em comparação ao cultivo em temperatura mais baixa (19⁰C). O mesmo fenômeno já havia sido observado anteriormente em linhagens de *Anabaena* e *Aphanizomenon*, cuja produção de anatoxina-a revelou-se três vezes mais alta a 20⁰ C que em 30⁰C (Rapala *et al.* 1993).

Com relação às linhagens pertencentes ao gênero *Aphanizomenon*, nenhuma apresentou toxicidade nas dosagens testadas. A espécie *A. gracile*, recentemente referida como provável produtora de cilindrospermopsina na Alemanha (Rücker *et al.* 2007) e de hepatotoxina no Brasil (Vieira *et al.*), não pôde ser confirmada como tóxica no presente estudo.

É importante ressaltar, contudo, que apenas os resultados positivos são conclusivos. A ausência de toxina, sobretudo de cilindrospermopsina, cuja função está provavelmente relacionada a alelopatia (Nogueira *et al.* 2004), pode estar relacionada com as condições de cultura ideais ao crescimento, não podendo ser excluída a possibilidade de produção da toxina em condições diversas daquela testada no presente trabalho, ou em outra fase de crescimento dos organismos.

5. Conclusões

Concluímos no presente estudo que:

1. As linhagens de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* mantidas em cultura retém sua capacidade de produção de saxitoxinas inalterada por longos períodos, apontando para a função homeostática destes compostos.
2. As duas linhagens de identificação inequívoca como *Cylindrospermopsis raciborskii* (SPC 339 e SPC969) mostraram-se tóxicas, indicando o alto potencial tóxico da espécie.
3. Das linhagens sem heterocitos (SPC338, FURGCY001, SPC811 e SPC820), apenas uma produziu saxitoxina nas condições de cultura testadas.
4. As linhagens de *Aphanizomenon* (SPC649 e SPC704), gênero para o qual só há uma referência de possível produção de toxina (não confirmada) no Brasil, não se mostraram tóxicas.

Anexo 1

Certificado da Comissão de Bioética.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

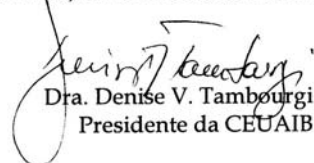
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

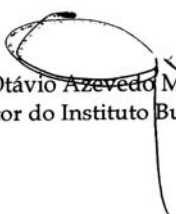
Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos químicos e biológicos de cepas de cianobactérias", protocolo nº 385/07, sob a responsabilidade de Marisa Rangel e Luciana Retz de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/04/2007.

"We certify that the Research entitled Chemical and biological studies of cyanobacteria species, protocol nº 385/07, under the responsibility of Marisa Rangel e Luciana Retz de Carvalho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/10/2007".

São Paulo, 10 de abril de 2007.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

7. Referências bibliográficas

- Adelman, W.J., Fohlmeister, J.F. & Sasner, J.J. 1982. Sodium channels blocked by aphantoxin obtained from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 20: 513-516.
- Apeldoorn, M.E., Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. & Bakker, G.J.I. 2007 Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51:1-7.
- Aráoz, R., Nghiêm, H., Rippka, R., Palibroda, N., Tandeau, N. M. & Herdman, M. 2005. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS *Microbiology* 151: 1263-1273.
- Azevedo, S. M. F. O. , Evans, W.R., Carmichael, W. W. & Namikoshi, M. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 6: 261-265.
- Azevedo, S. M. F. O. 1998. Toxinas de Cianobactérias : Causas e conseqüências para a Saúde Pública Medicina On line - Revista Virtual de Medicina 1(3) (Jul/Ago/Set de 1998). http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm. Acessado em 10/08/2007.
- Azevedo, S. M. F. O. , Carmichael, W. W. , Jochimsen, E. M. , Rinehart, K. L. , Lau, S., Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K. 2002 . Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181:441-446.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. & Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology* 33:613–616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A. & Carmeli, S. 2000. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Natural Products* 63: 387-389.
- Bartram, J., Carmichael, W. W. , Chorus, I., Jones, G. & Skulberg, O.M. 1999. Introduction. *In* toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, UK: WHO, E & FN Spon, pp. 1–13.
- Berlinck, R.G.S. & Kossuga, M.H. 2005. Natural guanidine derivatives. *Natural Product*

Reports 22:516-550.

- Bernard, C., Harvey, J., Briand, F., Biré, R., Kryš, S. & Fontaine, J. J.** 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology* 18(3):176 -186.
- Bruno, M., Barbini, D.A., Pierdominici, E., Serse, A.P. & Ieppolo, A.** 1994. Anatoxin-a and previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon* 32:369-373.
- Bumke-Vogt, C., Mailahn, W. & Chorus, I.** 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environmental Toxicology* 14(1):117-125.
- Carmichael, W.W., Biggs, D.F. & Gorham, P.R.** 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 1987:542-544.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K.** 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*. 109(7):663-668.
- Carmichael, W.W.** 2002. Detection of Cyanobacterial Toxins – The Cyanotoxins. Xth International conference on Harmful Algae St. Pete Beach, Florida, USA. *Toxicon* 45: 919–928.
- Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P. & Moczydlowski, E.** 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 63:3104-3110.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcia, C. & Vasquez, M.** 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44:483-489.
- Chen, Y., Liu, J. & Yang W.** 2003. Effect of *Aphanizomenon flos-aquae* toxins on some blood physiological parameters in mice. *Wei Sheng Yan Jiu* 32(3):195-197.
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W. & Theeragool, G.** 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48 (3): 345-355..

- Codd, G.A., Lindsey, J., Young, F.M., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S.** 2005. Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. In Harmful Cyanobacteria. Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M. (eds.) Dordrecht , The Netherlands : Springer, pp. 1-23.
- Cook, W.O., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Dahlem, A.M., Hooser, S.B., Mahmood, N.A. & Carmichael, W.W.** 1989. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*: Studies of ducks, swine, mice and a steer. Environmental Toxicology and Chemistry 8:915-922.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J, Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J., Morrison, L.F., Codd, G.A. & Bergman, B.** 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 102(14): 5074-5078.
- Cronberg, G., Carpenter, E.J. & Carmichael, W.W.** 2004. Taxonomy of harmful cyanobacteria. In Manual on harmful marine microalgae. G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.).Unesco Publishing, Paris, pp: 523-562.
- Cunniff, P.A.** 1995. Paralytic shellfish poison: biological method. In Cunniff, P.A. (ed). Official Methods of Analysis of AOAC International (16th ed), pp 22–23. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K. & Starvick, B.** 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NCR-44h. Canadian Journal of Chemistry 55: 1367-1371.
- Falconer, I.R.** 1998. Algal toxins and human health. In J.Hrubec (ed), The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 5, part C, Quality and Treatment of Drinking Water II. 53-82. Springer, Berlin.
- Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M. & Codd, G.A.** 1992. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. Toxicon. 30(10):1165-1175.
- Falconer, I.R.** 2005. Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins. Boca Raton, Florida: CRC Press. 279p.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K. & Chorus, I.** 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two german lakes and preliminary assessment of

- toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42: 313-321.
- Fastner, J., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A. & Wiedner, C.** 2007. Occurrence of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Northeast Germany. *Environmental Toxicology* 22: 26–32, 2007.
- Fergusson, K.M. & Saint, C.P.** 2000. Molecular Phylogeny of *Anabaena circinalis* and Its Identification in Environmental Samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4145-4148 .
- Fergusson, K.M. & Saint, C.P.** 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18(2): p. 120-5.
- Ferreira, F.M.B., Soler, J.M.F., Fidalgo, M.L. & Fernandez-Vila, P.** 2000. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon*. 39(6):757-761.
- Gallacher, S., Flynn, K.J., Franco, J.M., Brueggemann, E.E., Hines, H.B.** 1997. Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 239-245.
- Gorham, P.R., McLachlan, J.S., Hammer, U.T. & Kim, W.K.** 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Vereins für Theoretische und Angewandte Limnologie* 15:796-804.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C. Bernard, C.** 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919-928.
- Harada, K.I., Ohtani, K., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Watanabe, M. & Terao, K.** 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32(1): p. 73-84.
- Harada, K, Kondo, F. & Lawton, L.** 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In* toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, UK: WHO, E & FN Spon, pp. 369–405.

- Harada, K.** 2004. Production of Secondary Metabolites by Freshwater Cyanobacteria. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 52(8):889-899.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T., Jackson, A.B. & Falconer, I.R.** 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Applied and Environmental Microbiology 50: 1292-1295.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. & Falconer, I.A.** 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon 35: 314-346.
- Hayman, J.** 1992. Beyond the barcoo - probable human tropical cyanobacterial poisoning in outback Australia. Medical Journal of Australia 157:794-796.
- Hiripi, L., Nagy, L., Kalmar, T., Kovács, A. & Vörös, L.** 1998. Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. Neurotoxicology 19: 605–608.
- Humpage, A. R., Rositano, J., Bretag, A. H., Brown, R., Baker, P. D., Nicholson, B. C. & Steffensen, D. A.** 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 45:761–771.
- Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P. & Falconer, I.R.** 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. Mutation Research 472(1–2): 155–161.
- Hunter, P.R.** 1998. Cyanobacterial toxins and human health. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 84:35-40.
- Ikawa, M., Wegener, K., Foxall, T. L. & Sasner, J. J.** 1982. Comparison of the toxins of the blue-green *Aphanizomenon flos-aquae* with the *Gonyaulax* toxins. Toxicon 20:747.
- James, K.J., Sherlock, I.R. & Stack, M.A.** 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatography method. Toxicon 35(6):963-971.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., AN, J.; Cardo, D., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.C., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V., Azevedo, S.M.F.O. &**

- Jarvis, W.R.** 1998. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*. 36:373-378.
- Kellmann, R., Mills, T. & Neilan, B.A.** 2006. Functional modelling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *Journal of Molecular Evolution* 64(3):267-280.
- Kiss, T., Vehovszky, A., Hiripi, L., Kovács, A. & Vörös, L.** 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 131(2): 167–176.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O. & Oshima, Y.** 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brasil. *Toxicon*, 37(10): 1359-1373.
- Lefflaive, J. & Ten-Hage, L.** 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52:199-214.
- Li, R., Carmichael, W.W., Liu, Y. & Watanabe, M.M.** 2000. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. *Hydrobiologia* 438: 99–105.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, M., Kaya, K. & Watanabe, M.M.** 2001a. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 39: 973-980.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D. & Watanabe, M.M.** 2001b. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37:1121–1126.
- Li, R., Pereira, P. & Carmichael, W. W.** 2003. Morphological and 16S rRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA 31 as *Aphanizomenon issatschenkoi*. *Journal of Phycology* 39:814-818.
- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Shen, Y., Liu, Y. & Song, L.** 2006a. Analysis of Paralytic Shellfish Toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. *Environmental*

Toxicology 21: 289–295.

- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Shen, Y., Li, G. & Liu, Y.** 2006b. First report of aphantoxins in China—waterblooms of toxigenic *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Dianchi. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 84–92.
- Mahmood, N. A. & Carmichael, W. W.** 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24:175–186.
- Manti, G., Mattei, D., Messineo, V., Melchiorre, S., Bogialli, S., Sechi, N., Casiddu, P., Luglio, L., Di Brizio, M. & Bruno, M.** 2005. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algal News* 28:8–9.
- McGregor, G.B. & Fabbro, L.D.** 2000 Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 5: 195–205.
- McNeil, Barrie, Burdet, H. M., Demoulin, V., Hawksworth, L., Marhold, K., Nicolson, D. H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H., Turland, N. J.** 2006. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). *Regnum Vegetabile* 146. A.R.G. Gantner Verlag KG.
- Mohamed, Z. A.** 2007. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiology Ecology* 59 (3), 749–761.
- Molica, R. J. R., Onodeera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S.M., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S.M.F.O. & Lagos, N.** 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41(6):606-611.
- Murakami, M., Suzuki, S., Itou, Y., Kodani, S. & Ishida, K.** 2000. New anabaenopeptins, potent carboxypeptidase-A inhibitors from the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, *Journal of Natural Products* 63:1280-1282.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H. & Oishi, S.** 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis*

mediterranea Skuja. *Toxicon*. 2003 Oct;42(5):533-8.

- Namikoshi, M., Murakami, T., Fujiwara, T., Nagai, H., Niki, T., Harigaya, E., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J. & Tsujimura, S.** 2004. Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. *Chemical Research in Toxicology*. 17:1692-1696.
- Nogueira, I., Pereira, P., Dias, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Franca, S. & Vasconcelos, V.** 2004. Accumulation of Paralytic Shellfish Toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicon* 44:773-780.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K, Seawright, A.A. & Moore, M.R.** 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* (14)1:163-165.
- Ohtani, I., Moore, R.E. & Runnegar, M.T.C.** 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* . *Journal of American Chemical Society* 114: 7941-7942.
- Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T. & Carmichael, W.W.** 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins* 5:146-151.
- Park H.-D., & Watanabe M.F.**1996. Toxic Microcystis in eutrophic lakes. In M.F. Watanabe, K.- I. Harada, W.W. Carmichael, Fujiki H. (eds) *Toxic Microcystis*, CRC Press, Boca Raton, London, 57-77.
- Papendorf, O., Konig, G.M., Wright, A.D., Chorus, I. & Oberemm, A.** 1997. Mueggelone, a novel inhibitor of fish development from the fresh water cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Natural Products* 60:1298-1300.
- Patockaa, J. & Stredab, L.** 2002. Brief review of natural nonprotein neurotoxins, *Applied Science and Analysis Newsletters* 89: 16–23.
- Pereira P., Hideyuki, O., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N. & Oshima, Y.** 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, 38 :1689-1702.

- Pereira, P., Li, R., Carmichael, W. W., Dias, E. & Franca, S.** 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *European Journal of Phycology* 39: 681-688.
- Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C. , Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y. & Neilan, B. A.** 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 36:553-562.
- Pomati, F., Neilan, B., Suzuki, T., Manarolla, G. & Rossetti, C.** 2003. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *Journal of Phycology* 39 (3), 535–542.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P. & Neilan, B.A.** 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150:455-61.
- Preussel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I. & Fastner, J.** 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*. 47:156-162.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. & Niemelä, S.I.** 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains, a laboratory study. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2206–2212.
- Rogers, E.H., Zehr, R.D., Gage, M.I., Humpage, A.R., Falconer, I.R., Marr, M. & Chernoff, N.** 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 49:855-864.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I. & Wiedner, C.** 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon*. *In Press*. Corrected Proof, Available online 4 July 2007.
- Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Ge, J. L. & Lu, S. C.** 1994. The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201(1): 235-241.
- Saker, M.L., Neilan, B.A. & Griffiths, D.J.** 1999. Two morphological forms of

- Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *Journal of Phycology* 35:699-606.
- Saker, M.L. & Griffiths, D.J.** 2000 The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39: 349–354.
- Saker, M.L. & Neilan, B.A.** 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1839-1845.
- Saker, M., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Neilan, B., Eaglesham, G. & Pereira, P.** 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 243-250.
- Sawyer, P.J., Gentile, J.H. & Sasner, J.J.** 1968 Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L) Ralfs. *Canadian Journal of Microbiology* 14:1199-1204.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A. & Saint, C.P.** 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16:413–421.
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W. & Shaw G.** 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck, *Journal of Harmful Algae* 6:73-80.
- Selwood, A.I., Holland, P.T, Wood, S.A., Smith, K.F. & McNabb, P.S.** 2007. Production of Anatoxin-a and a Novel Biosynthetic Precursor by the Cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi*. *Environ. Sci. Technol.*, 41(2):506 -510.
- Shaw, G., Chiswell, R., Seawright, A., Moore, M.** 1996. Toxicological studies with cylindrospermopsin. In: *Cylindrospermopsis - a new toxic algal challenge for Australia*. Symposium, Agricultural and Resource Management Council of Australia and New Zealand. Brisbane.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris,**

- R.L., Eaglesham, G.K. & Moore, M.R.** 1999. Blooms of cylindrospermopsin containing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ Toxicol* 14:167–177.
- Shen, X., Lam, P.K.S., Shaw, G.R. & Wickramasinghe, W.** 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40(10):1499-1501.
- Sivonen, K. & Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. *In* toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, UK: WHO, E & FN Spon, pp. 41–112.
- Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelas, S. I., Poon, G. K. & Codd, G. A.** 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxic Assess* 4, 339-352.
- Sivonen, K. & Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. *In* toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, UK: WHO, E & FN Spon, pp. 41–112.
- Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepisto, L., Metcalf, J.S. & Meriluoto, J.** 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology* 21, 552-560.
- Stewart, I., Seawright, A. A., Schluter, P. J. & Shaw, G. R.** 2006. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *Dermatology* 6(5):1-12.
- Sukenic, A., Rosan, C., Porat, R., Teltsch, B., Banker, R. & Carmeli, S.** 1998. Toxins from cyanobacteria and their potential impact on water quality of Lake Kinneret, Israel. *Israeli Journal of Plant Sciences* 46:109-115.
- Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N, Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S. & Hage, E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, 27(3): 244-253.
- Viaggiu, E.** 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environmental Toxicology* 19(3):191-197.
- Vieira, J.M.S.** 2002. Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica do Brasil. Tese de Doutorado,

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 147pp.

- Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y., Correa, B.** 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45:901-909.
- Watanabe.M.F., Tsujimura, S., Oishi, S., Niki, T. & Namikoshi, M.** 2003. Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa. *Phycologia* 42:364-369.
- Wood, S.A. & Stirling, D.J.** 2003. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37:821–828.
- Wood, S.S., Rasmussen, J.P., Holland, P.T., Campbell, R. & Crowe, A. L. M.** 2007. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 43(2): 356-365.
- Yu, S.** 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 10:674–682.
- Yunes, J. S., Cunha, N. T., Proença, L. A. O., Barros, L. P. C. & Montserrat, J. M.** 2003. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters. *Comments On Toxicology* 9: 103-115.
- Yunes, J.S., Rocha, S. de la, Giroldo, D., Melcher, S.S., Sant'Anna, C.L., Silveiras, B., Comin, R., Bicho, M.S. & Vieira, A.A.H.** 2007. Production of saxitoxins and extracellular carbohydrates by a subtropical cyanobacteria *Raphidiopsis brookii*: first report of saxitoxin and gonyautoxin production. *Anais do Simpósio Iupac*, p. 122.