

CAMILA FRANCIELI DA SILVA MALONE

Diversidade fenotípica, molecular e avaliação do potencial biotecnológico do complexo *Phormidium* (Cyanobacteria) em ambientes aquáticos e terrestres da Mata Atlântica e Pantanal, Brasil

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

São Paulo 2014

CAMILA FRANCIELI DA SILVA MALONE

Diversidade fenotípica, molecular e avaliação do potencial biotecnológico do complexo *Phormidium* (Cyanobacteria) em ambientes aquáticos e terrestres da Mata Atlântica e Pantanal, Brasil

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

Orientadora: Dra. Célia Leite Sant'Anna

Co-orientadora: Dra. Marli de Fátima Fiore

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

Malone, Camila Francieli da Silva

M257d Diversidade fenotípica, molecular e avaliação do potencial biotecnológico do complexo *Phormidium* (Cyanobacteria) em ambientes aquáticos e terrestres da Mata Atlântica e Pantanal, Brasil / Camila Francieli da Silva Malone -- São Paulo, 2014.
172 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Algas. 2. Phormidium sensu lato. 3. Taxonomia polifásica. I. Título

CDU: 582.26

*O mestre que caminha
à sombra do templo, rodeado de discípulos,
não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e ternura.
Se ele for verdadeiramente sábio,
não vos conduzirá a entrar na mansão de seu saber,
mas antes, vos conduzirá ao limiar de vossa própria mente.
(Gibran Khalil Gibran)*

*Àqueles que são o chão no qual estou firmemente arraigada
e que nutrem a minha vontade de crescer sempre
e lançar folhas, flores e frutos:
meus pais Antonio e Maria, meu irmão Carlos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que é a minha luz constante!

À minha orientadora, Dra. Célia Leite Sant'Anna, que carinhosamente chamamos de “ori”, por aceitar-me como estagiária e aluna de mestrado, e posteriormente como doutoranda. Agradeço imensamente por toda dedicação durante estes 7 anos, sempre me auxiliando e me guiando, por compartilhar de sua imensa sabedoria, pelo exemplo profissional, e sobretudo pela pessoa maravilhosa que tanto admiro. Enfim, pela preocupação, compreensão, amizade e grande carinho. Muito obrigada por me ensinar nos momentos mais difíceis dessa jornada que, “*embora não possamos controlar a direção dos ventos, é certo que podemos alterar a posição das velas*”, e isto só depende de nós.

À minha co-orientadora Dra. Marli de Fátima Fiore, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA/USP), pelos ensinamentos deste imenso “universo” que a filogenia de cianobactérias representa. Além disso, pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Arnaldo Yoso Sakamoto, professor adjunto da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Campus de Três Lagoas e coordenador do projeto “Lagoas e salinas do Pantanal”, pelo inestimável auxílio durante as expedições ao Pantanal da Nhecolândia, confiança, amizade e “olhar clínico” sobre a peculiar biodiversidade das lagoas pantaneiras. Muito obrigada por incentivar os meus primeiros nesta jornada científica!!

À Dra. Annick Wilmotte, *Centre for Protein Engineering, Laboratory of Bacterial Physiology and Genetics*, Universidade de Liège, Bélgica, por aceitar-me prontamente como sua estudante durante o estágio de Pesquisa no Exterior e por “abrir todas as portas” nesta excelente instituição do qual faz parte. Agradeço imensamente pelos ensinamentos e por toda compreensão e ajuda em relação ao idioma e às temperaturas negativas. *Merci!!*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelas concessões das bolsas de estudos no Brasil (Processo nº 2010/51666-0) e, no exterior por meio do programa “Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior” (Processo nº 2012/18528-9).

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente, pela oportunidade de aprimoramento científico e apoio constante.

À Universidade de Liège e ao programa de intercâmbio *Erasmus* pela oportunidade e apoio constante durante os quatro meses de estágio.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campus de Três Lagoas, pelo apoio institucional para realização das expedições de coleta ao Pantanal.

Ao Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, pela oportunidade de integrar o conselho de curso como representante discente da área de Plantas Avasculares em Fungos e Análises Ambientais. Por demonstrar “o lado” da Pós-graduação que os alunos geralmente desconhecem: dificuldades e avanços.

Em especial, ao meu amor Adalberto Júnior, por todo o carinho, atenção e companheirismo nas etapas mais difíceis desta caminhada. Por ser o meu porto seguro, a minha calma e a minha alegria. Você chegou de mansinho e continua me conquistando a cada dia. Muito obrigada pelo seu exemplo de determinação, bravura e por me mostrar que o sol sempre surgirá após uma tempestade.

Ao Dr. Haywood *Dail Laughinghouse* IV, da Universidade de Liège (Bélgica) e *Smith College, Center for Genetics, Genomics & Evolution* (Estados Unidos), pelos valiosíssimos ensinamentos no que se refere a filogenia de Cyanobacteria e contribuição nos artigos científicos desenvolvidos. Agradeço pela acolhida e por fazer meus dias na Bélgica muito mais felizes e “doces”, juntamente com seu companheiro Richard Michael Fischer. “*Amigos verdadeiros, que sempre estarão guardados do lado esquerdo do peito*”.

À Dra. Janaína Rigonato, por sempre estar disposta a me ajudar e repassar todo o seu imenso conhecimento sobre a filogenia de Cyanobacteria. Pela amizade e por toda a compreensão.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ficologia Dra. Andréa Tucci, Dra. Luciana Retz de Carvalho, Dra. Nair Sumie Yokoya, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães, Dra. Mutue Toyota Fujii e Dra. Daniela Milstein, pelo convívio harmonioso e disponibilidade em ajudar, valorizando o trabalho em equipe.

À Dra. Andrea Tucci, nossa querida “Andreita”, e Dra. Luciana Retz por toda a atenção e pelos valiosos conhecimentos científicos compartilhados. Além disso, muito obrigada pelos maravilhosos momentos de descontração, “ótimas risadas”, receitas culinárias de “dar água” na boca e até as tendências de moda. Agradeço a Deus por vocês fazerem parte do meu dia-a-dia.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Manuel Gomes da Silva (“Manu”), Neide Pozo Rios de Souza (“Neidinha”), Neuzete Martins Oliveira (“New”), Elizete Mítico Mitsugui (“Elis”) e Valdirene Santos, pela prontidão em seus serviços, amizade e convívio harmonioso.

Aos queridos amigos, companheiros de jornada, do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, que tanto me ajudaram ao longo do caminho, ora incentivando, ora tendo paciência nos momentos de tensão e de tantas outras formas: Watson Arantes Gama Junior, Kleber Renan de

Souza Santo, Fernanda Rios Jacinavicius, Edna Rosini, Camila Rosal, Valdirene Santos, Denise Amazonas, João Saviolo, Ana Livia Negrão, Levi Pompermayer Machado, Jonatas Martinez, Angélica Garcia, Natali Bento, Jonathan Bento, Julia Zardi, Julyana Farias, Mayra Jamas, Cecilia Hissami, Daniela Milstein, Guilherme Scotta.

Especialmente ao Watson Arantes Gama Junior, por ser um amigo sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis, por todo o carinho e pela enorme compreensão. Agradeço imensamente a você por sempre me escutar e abrir os meus olhos quando eles não queriam mais enxergar. *Meu irmão de coração!*

À Fernanda Rios e Edna Rossini, que caminharam junto comigo durante estes vários anos, pelo exemplo de dedicação, amizade e humanidade. Meninas, obrigada por estarem sempre ao meu lado.

À minha querida amiga, companheira de todas as horas, Gisele Carolina Marquardt. Amiga, muito obrigada por sempre estar ao meu lado e me dar “colo” quando eu mais precisei. Eu sei que sempre estaremos juntas de coração, mesmo que o tempo e a distância nos separem!!

Ao Kleber, pela grande amizade desde a universidade e por ser um exemplo de humanidade, além de todo apoio e os inúmeros “Show de bola”. Agradeço por todas as conversas valiosas que tivemos ao longo destes vários anos. Parabéns e saudações pantaneiras!

Aos queridos amigos de jornada ao Pantanal, Arnaldo Sakamoto, Kleber Renan de Souza Santos, Mauro Soares, Hermiliano Decco, Cesar Cardoso, Glauber Stefan, Frederico Gradella, Suzane Lima, Heloissa Sokolowski, Kátia Costa, pela imensa ajuda durante as coletas e pelos momentos de descontração após um dia exaustivo de trabalho. Além disso, pelos valiosos ensinamentos e discussões científicas sobre a planície pantaneira, lugar que sempre nos encantou por sua biodiversidade.

Aos queridos amigos do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, por estarem sempre presentes: Simone Wengrat, Barbara Pellegrini, Luciana Barbosa, Gisele Carolina Marquardt, Stefania Biolo, Lucineide Santana, Simone Oliveira, Gabriele Medeiros e Jennifer Pereira.

À Marcia Regina Angelo (“Marcinha”) e a Shirley, funcionárias da secretaria deste programa de Pós-graduação, pela constante simpatia, gentileza e agilidade no atendimento, sempre prestativas e dedicadas.

À Dinorá, pela grande amizade e por ser uma pessoa maravilhosa, sempre disposta a ajudar. Obrigada pelas risadas, pelos conselhos e dedicação durante todos estes anos.

Aos amigos que sempre estiveram presentes ao longo desta caminhada, Leonardo Guimarães, Jadson Oliveira, Fernanda Karsted, Carolina Brandão, Luciana Benatti, Cyntia Lebrão.

Aos queridos amigos que conviveram comigo bem de “pertinho”, compartilhando a nossa casa temporária, coincidentemente situada no “Condomínio Parque Botânico”: Kleber Renan, Watson Arantes, Simone Wengrat e Gabrielle Araújo, que sempre estiveram dispostos a ajudar nos momentos mais difíceis. Agradeço por todos os momentos de descontração, pelas risadas e pela compreensão.

Registro minhas sinceras desculpas aos nomes que não tenha mencionado e agradeço àqueles que estão nas entrelinhas. Afinal, agradecer é o mínimo que podemos fazer por aqueles que nos ajudam mesmo sem saber, querer ou poder.

Muitíssimo Obrigada!!

RESUMO

Em regiões tropicais e subtropicais a rica diferenciação de habitat e a consequente diversidade ecológica permitem alta diversificação morfológica das cianobactérias. No entanto, apenas 5 a 10 % da real diversidade nestas regiões são conhecidos e, portanto, numerosos morfotipos e genótipos devem ainda ser descobertos. Além da ampla diversidade destes organismos, há décadas as cianobactérias são reconhecidas também por produzir grande variedade de compostos biologicamente ativos com potencial uso biotecnológico, no entanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo a caracterização da biodiversidade do complexo *Phormidium* em distintos habitats aquáticos e terrestres dos biomas Mata Atlântica e Pantanal. Além disso, visou a prospecção de compostos biologicamente ativos em linhagens selecionadas. Assim, análises morfológicas foram conduzidas de modo definir as características diagnósticas que permitissem a detalhada caracterização dos táxons. A análise a partir do gene 16S RNAr permitiu definir dez clados filogenéticos distintos, corroborando a heterogeneidade do complexo *Phormidium*. Dentre estes grupos, apenas três linhagens foram caracterizadas como *Phormidium sensu stricto*, juntamente com *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759, que é um representante do grupo taxonômico ao qual a espécie-tipo do gênero (*Phormidium lucidum*) está inserida. Dez linhagens analisadas foram identificadas como pertencentes a gêneros já descritos em literatura: *Microcoleus*, *Wilmottia* e *Desertifilum*. Entretanto, 43% do material analisado foram considerados como novos táxons para a ciência, e cerca de seis novos gêneros e treze espécies poderão ser descritos futuramente. Neste cenário, o novo gênero *Trichocapitatum* foi descrito neste estudo, sendo distinguido as espécies *T. Komarekianum* e *T. lacustre*. Além disso, as linhagens isoladas a partir de amostras coletadas no Pantanal e na Mata Atlântica apresentaram-se morfológicamente distintas, o que foi corroborado a partir da análise filogenética do gene 16S RNAr. Assim, foi possível constatar neste estudo que a especificidade de habitats de ambas as regiões de estudo refletiu diretamente na diversidade biológica. As relações interespecíficas foram definidas a partir dos marcadores *rbcLX* e *rpoC1*, além da análise da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr. Entretanto, o número reduzido de sequências referentes a estes marcadores nos bancos públicos impossibilitou muitas vezes a comparação entre táxons filogeneticamente relacionados. Neste aspecto, o presente estudo contribuirá significativamente com o avanço da ciência, uma vez que foram geradas cerca de 90 sequências do complexo *Phormidium* referentes a estes marcadores. A partir dos

genes *nifH* e *nifD*, foi possível caracterizar 16 linhagens potencialmente diazotróficas, bem como corroborar os grupos filogenéticos definidos a partir do gene 16S RNAr. Com base nos testes bioautográficos verificou-se a presença de substâncias com atividade anticolinesterásica, fúngica e antioxidante, bem como da cianotoxina BMAA. Em suma, o presente trabalho demonstrou a ampla diversidade de prováveis espécies novas para a ciência nos ambientes tropicais e subtropicais, o papel ecológico destes organismos como potenciais fixadores de nitrogênio, bem como o uso de diferentes marcadores moleculares para auxiliar na definição de espécies no complexo *Phormidium*.

Palavras-chaves: *Phormidium sensu lato*, caracterização morfológica, múltiplos-loci gênicos, compostos bioativos, linhagens diazotróficas.

ABSTRACT

In tropical and subtropical regions, the richness of different habitats and consequent ecological diversity allow for high morphological variety of cyanobacteria. However, only 5 to 10% of the real diversity of these regions is known and, therefore, numerous morphotypes and genotypes are yet to be discovered. In addition to the ample diversity of these organisms, cyanobacteria have also been recognized, for decades, as producers of a wide variety of biologically active compounds, potentially suitable for biotechnological applications. However, few studies, especially in tropical and subtropical regions, have been carried out. Accordingly, the present study aimed to characterize the population biodiversity of the *Phormidium* complex in distinct aquatic and terrestrial habitats of the Atlantic rainforest and Pantanal biomes. In addition, it also prospected biologically active compounds in selected lineages. Thus, morphological analyses were carried out to define diagnostic features for detailed characterization of the taxa. The analysis based on gene 16S RNAr allowed the definition of ten distinct phylogenetic clades, corroborating the *Phormidium* complex heterogeneity. In these groups, only three lineages were characterized as *Phormidium sensu stricto*, together with *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759, which is a representative of the taxonomic group in which the species-type of the genus (*Phormidium lucidum*) is inserted. Ten analyzed lineages belong to taxa already described in the literature, such as *Microcoleus*, *Wilmottia* and *Desertifilum*. However, the other analyzed lineages (43%) could be considered as new entities for science, and about six new genera and thirteen species can be described eventually. In this scenario, the new genus *Trichocapitatum* was described in this study and three distinct species, *T. komarekianum* and *T. lacustre*, were characterized. Furthermore, the strains isolated from Pantanal and Mata Atlantica was morphologically distinct, which was supported by the 16S rRNA phylogenetic analysis. Thus, in this study we determined that habitats specificity from both study areas reflected directly the biological diversity. Interspecific relations were defined based on *rbcLX* and *rpoC1* markers and the secondary structure analysis of the 16S-23S RNAr intergenic spacer. However, the small number of sequences related to these markers in public database often impossible to compare phylogenetically related taxa. In this context, this study will contribute significantly to the advancement of science, since about 90 sequences of *Phormidium* complex regarding these markers were generated. Based on genes *nifH* and *nifD*, it was possible to characterize 16 potentially diazotrophic lineages as well as corroborating the phylogenetic groups defined based on gene 16S RNAr. Bioautographic tests revealed the

presence of anticholinesterasic, fungic and antioxidant substances, as well as cyanotoxins BMAA. The present study showed the wide variety of new species for science in tropical and subtropical environments, the ecologic role of these organisms as potential nitrogen fixators and the use different molecular markers to help to define species of *Phormidium* complex.

Key words: *Phormidium sensu lato*, morphological characterization, multi-locus genes, bioactive compounds, diazotrophic lineages.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Diversidade de Cianobactérias	1
1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cianobactérias.....	3
1.3. O gênero <i>Phormidium</i> Kützing <i>ex</i> Gomont	4
1.4. Diversidade do complexo <i>Phormidium</i> na Mata Atlântica e Pantanal Brasileiro.....	6
1.4.1. Mata Atlântica	6
1.4.2. Pantanal	7
1.5. Compostos Bioativos	8
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Área de Estudo	10
3.1.1. Mata Atlântica	10
3.1.2. Pantanal brasileiro	12
3.2. Amostragem e Métodos de Coleta.....	16
3.3. Triagem das Amostras	17
3.4. Isolamento e Cultivo	17
3.5. Estudo Taxonômico	20
3.6. Análise Molecular	21
3.6.1. Preparação da amostra para extração de DNA genômico	21
3.6.2. Extração de DNA genômico.....	22
3.6.3. Amplificação gênica.....	22
3.6.4. Clonagem dos fragmentos gênicos	25
3.6.5. Extração do DNA plasmidial.....	26
3.6.6. Sequenciamento.....	26
3.6.7. Processamento e análise filogenética das sequências.....	28
3.7. Estrutura Secundária do Espaçador Intergênico 16S-23S RNAr.....	28
3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
3.9. Estudos Químicos	29
3.9.1. Multiplicação de biomassa	29
3.9.2. Extração de compostos e secagem dos extratos	30
3.9.3. Prospecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica	30
3.9.4. Prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante	30

3.9.5. Prospecção de inibidores de acetilcolinesterase	31
3.9.6. Prospecção da cianotoxina β -metilaminoalanina (BMAA).....	31
4. Resultados e Discussão	32
4.1. Linhagens Analisadas	32
4.2. <i>Microcoleus sensu stricto</i> (Clado A)	37
4.3. <i>Phormidium formosum</i> (Clado B).....	55
4.4. <i>Phormidium sensu stricto</i> (Clado C).....	60
4.5. <i>Trichocapitatum</i> (Clado D).....	70
4.6. <i>Wilmottia</i> (Clado E)	95
4.7. “ <i>Microcoleus steenstrupii</i> ” (Clado F).....	100
4.8. <i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> (Clado G)	106
4.9. <i>Phormidium terebriforme</i> I (Clado H).....	110
4.10. <i>Desertifilum</i> (Clado I)	115
4.11. <i>Phormidium terebriforme</i> II (Clado J).....	120
4.12. Demais linhagens	126
4.13. Caracterização dos genes <i>nifD</i> e <i>nifH</i>	132
4.14. Estudos Químicos	135
5. Considerações Finais	140
6. Referências Bibliográficas	143
7. Anexo 1	157
8. Anexo 2	162

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diversidade de Cianobactérias

As cianobactérias formam um grupo basal no histórico evolutivo, sendo encontradas em registros fósseis com cerca de 3,5 bilhões de anos (Graham & Wilcox 2000, Schopf 1996). Provavelmente, estes organismos foram os primeiros produtores de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (Schopf & Water 1982). Estudos filogenéticos proporcionaram uma “retrospectiva histórica” deste grupo, complementar aos registros fósseis, confirmando sua origem, bem como sua importância evolutiva (Golubic & Seong-Joo 1999).

A partir da análise filogenética do gene RNAr 16S de um amplo espectro de organismos, determinou-se a existência de três domínios fundamentais: Archaea, Bacteria e Eukarya (Woese *et al.* 1990). Neste contexto, foi estabelecido que o processo de fotossíntese aeróbica originou-se monofileticamente no domínio Bacteria, dentro do grupo filogenético de Cyanobacteria (Wilmotte & Golubic 1991). Dessa maneira, as cianobactérias desempenharam um papel determinante na evolução da atmosfera oxidante do planeta (Dismukes 2001). Desde então, a evolução das cianobactérias seguiu dois diferentes caminhos que resultaram na presente diversidade destes organismos e na diversificação de outros sistemas eucarióticos fototróficos por meio da endossimbiose (Golubic & Seong-Joo 1999).

A diversificação a longo prazo das cianobactérias e o rápido desenvolvimento de novos morfótipos e ecótipos são explicados pelo processo contínuo da evolução destes organismos (Komárek 2006). Este processo, denominado “evolução estática” (Castenholz 2001), está baseado na transferência horizontal de ácidos nucleicos (DNA) entre linhagens de cianobactérias e dentro de populações (Barker *et al.* 1999, Rudi *et al.* 2000). Neste contexto, este processo envolve uma série de padrões metabólicos e estruturais combinados à flexibilidade do genoma de se aclimatar às condições ambientais. A consequência desta evolução é a complexa diversidade deste grupo, com numerosos genomas e morfotipos ecologicamente restritos (Komárek 2006).

Segundo Rejmankova *et al.* (2004), estudos em habitats naturais abordando dados moleculares e fenotípicos indicam que a diversidade genotípica em cianobactérias é provavelmente maior do que reconhecido exclusivamente em análises morfológicas. Entretanto, a caracterização morfológica ainda fornece informações bastante úteis para a avaliação da variabilidade destes organismos.

Em regiões tropicais e, particularmente em ambientes extremos, ocorrem numerosas populações difíceis de serem identificadas utilizando-se apenas a caracterização morfológica

(Komárek & Komárková-Legnerová 2002) e apenas 5 a 10 % da real diversidade foi reconhecida (Dicastrì & Younès 1994, Komárek 2006). A alta diferenciação de habitats e a consequente diversidade ecológica nestes ambientes podem explicar a alta diversificação morfológica e especiação. Assim, a especificidade de cianobactérias nestas áreas dá suporte à rejeição do paradigma de distribuição “cosmopolita” da maioria das espécies (Rejmankova *et al.* 2004).

Deste modo, a caracterização da diversidade de cianobactérias, principalmente em ecossistemas tropicais/subtropicais e em ambientes extremos, representa o incremento contínuo de novos táxons. Além disso, o desenvolvimento de estudos comparativos em diferentes habitats (ou em habitats similares de regiões diferentes) torna-se importante a fim de compreender a diversidade de cianobactérias na sua totalidade (Komárek 2006).

Neste contexto, é imprescindível a abordagem simultânea de dados moleculares, morfológicos, ultraestruturais, fisiológicos e ecológicos (“taxonomia polifásica”) nos estudos que caracterizem a biodiversidade (Rejmankova *et al.* 2004, Komárek 2006). Em relação aos estudos moleculares, o gene RNAr 16S tem sido amplamente utilizado para a caracterização genérica em cianobactérias, por se tratar de um marcador altamente informativo e conservado (Fox *et al.* 1992). Entretanto, para a determinação de níveis interespecíficos torna-se necessário o sequenciamento de outros marcadores moleculares, tais como *rpoC1* e *rbcL* (Sciuto *et al.* 2011). Além disso, diversos estudos têm utilizado o espaçador intergênico 16S-23S RNAr para determinação infragenérica (Johansen *et al.* 2011, Siegesmund 2008, Martins 2014).

De modo geral, muitos dos agrupamentos resultantes da análise filogenética, sobretudo do gene 16S RNAr, revelaram-se congruentes com os gêneros estabelecidos pelos aspectos morfológicos (Komárek & Kástóvsky 2003, Komárek 2005, Honda 2009). Atualmente, diversos gêneros definidos pela taxonomia clássica (aspectos morfológicos), têm se demonstrado filogeneticamente heterogêneos e estão sendo divididos em novas entidades genéricas, tais como *Phormidium* Kützing ex Gomont, *Aphanothece* Nägeli, *Chroococcus* Nägeli, *Oscillatoria* Vaucher ex Gomont, *Lyngbya* Agardh ex Gomont, *Anabaena* Bory ex Bornet et Flahault, *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, dentre outros (Komárek 2006).

Desta maneira, é essencial a ampliação do conhecimento morfológico e molecular, sobretudo de gêneros heterogêneos, uma vez que muitas destas entidades têm sido desmembradas em várias outras, nos estudos atuais. Além disso, a caracterização de cianobactérias em regiões tropicais/subtropicais, como o Brasil, torna-se extremamente importante uma vez que estes organismos apresentam alta taxa de especiação nestes ambientes e percentuais muito baixos de conhecimento da sua diversidade.

1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cianobactérias

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das fontes de entrada de formas assimiláveis de nitrogênio em ambientes naturais, por meio da redução do dinitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_3) (Zehr *et al.* 2003). Neste contexto, as comunidades microbiológicas são componentes essenciais nos ecossistemas, desempenhando papel fundamental na transformação bioquímica dos elementos (Madigan, Martinko & Parker 2000).

Dentre os microorganismos, as cianobactérias são os únicos capazes de realizar os dois principais processos para a manutenção da vida na Terra: a fotossíntese oxigênica e a fixação biológica do nitrogênio. Deste modo, estes organismos atuam como produtores de matéria orgânica e fonte de nitrogênio nos ecossistemas, sendo responsáveis por grande quantidade da FBN na Biosfera (Wolk *et al.* 1994, Berman-Frank *et al.* 2001). Em florestas tropicais, os microorganismos diazotróficos têm papel fundamental no aporte desse elemento, uma vez que muitos ecossistemas, tal como a Mata Atlântica, são pobres em nitrogênio disponível (Cusack, Silver & McDowell 2009, Roggy *et al.* 1999).

A reação química da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada pelo complexo enzimático nitrogenase, codificado pelos agrupamentos dos genes *nifDKH* (Zehr *et al.* 2000, 2001). Além disso, há outros sistemas alternativos para esta reação (vanádio nitrogenase), porém estes são raros entre as cianobactérias (Boison *et al.* 2006). Uma vez que o complexo nitrogenase é inativo na presença de oxigênio, as cianobactérias desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas para manter um ambiente anóxico para a realização da FBN (Berman-Frank, Lundgren & Falkowski 2003).

Em relação às cianobactérias da ordem Nostocales, apresentam células especializadas denominadas heterócitos, os quais propiciam um ambiente anóxico. Estas células limitam a difusão de oxigênio para o ambiente intracelular. Em cianobactérias homocitadas, a fixação de nitrogênio pode ser realizada em células vegetativas denominadas diazófitos. Por outro lado, há espécies que alcançam a condição anaeróbica através da separação espacial ou temporal entre a fotossíntese e a FBN ou, por meio de conformações estruturais tais como a disposição dos filamentos (Berman-Frank, Lundgren & Falkowski 2003, Fiore & Honda 2008).

De acordo com Latysheva *et al.* (2012), nitrogenase em cianobactérias foi transferida verticalmente a partir de um organismo ancestral, com poucos eventos significativos de transferência lateral. Este fato corrobora a coerência entre a filogenia do gene *nifH* e 16S RNAr, e o suporte filogenético conferido pelo *nifD* a estas análises (Roeselers *et al.* 2007, Zehr *et al.* 2003). Deste modo, a caracterização de potenciais linhagens diazotróficas de cianobactérias tem fundamental importância na ecologia destes organismos, bem como para sua classificação.

1.3. O gênero *Phormidium* Kützing ex Gomont

Tradicionalmente, o gênero *Phormidium* Kützing ex Gomont foi classificado na família Phormidiaceae, Ordem Oscillatoriales, por apresentar filamentos homocitados, ou seja, sem células diferenciadas como heterócitos e acinetos, tricomas maiores que 3 µm de diâmetro e células mais ou menos isodiamétricas (Anagnostidis & Komárek 1988, Komárek & Anagnostidis 2005). Recentemente, a partir da classificação elaborada por Hoffmann *et al.* (2005), esta ordem foi incluída na subclasse Oscillatoriophyceae, por apresentar tilácoides dispostos radialmente nas células.

O gênero *Phormidium* (Cyanobacteria) apresenta ampla distribuição geográfica e comumente é encontrado nos mais variados tipos de ambientes, incluindo aqueles designados como extremos. Geralmente são encontrados formando massas em diferentes ambientes terrestres e aquáticos lênticos ou lóticos (Komárek & Anagnostidis 2005, McGregor 2007). Deste modo, compreende-se que *Phormidium* represente taxonomicamente um dos gêneros mais complexos dentro da classe Cyanobacteria (Komárek & Anagnostidis 2005).

Até o momento, mais de 200 morfoespécies correspondem à descrição taxonômica de *Phormidium* e, apesar disso, representam somente parte da variação de todo o gênero (Komárek & Anagnostidis 2005). Este fato pode ser corroborado principalmente quando considerada a biodiversidade em ambientes tropicais, uma vez que estas regiões apresentam enorme complexidade de habitats que podem determinar alta diversificação morfológica e, conseqüentemente, o aumento da riqueza de espécies (Rejmankova *et al.* 2004). Deste modo, em vista da complexidade taxonômica do grupo, Komárek & Anagnostidis (2005) propuseram a separação das morfoespécies em oito grupos morfológicos, com base principalmente na morfologia dos segmentos terminais dos tricomas e células apicais

Recentemente, diversos estudos têm confirmado a heterogeneidade de *Phormidium* (Marquardt & Palinska 2007, Palińska & Marquardt 2008, Komárek *et al.* 2009, Komárek 2010, Strunecký *et al.* 2010, Strunecký *et al.* 2011, Chatchawan *et al.* 2012, Martins 2014), distinguindo novos gêneros (p. ex. *Phormidesmis* Komárek *et al.*, *Wilmottia* Strunecký *et al.*, *Oxynema* Chatchawan *et al.*) por meio de abordagem polifásica. Além disso, os grupos morfológicos reconhecidos por Komárek & Anagnostidis (2005) têm se mostrado congruentes com as inferências filogenéticas a partir do gene 16S rRNA.

Marquardt & Palinska (2007) destacam diversos trabalhos (Turner 1997, Ishida *et al.* 2001, Lee & Bae 2001, Litvaitis 2002, Ceschi-Berrini *et al.* 2004) que demonstram o agrupamento filogenético de linhagens previamente atribuídas como *Phormidium* com espécies de *Leptolyngbya* e *Oscillatoria*. A alta diversidade genética deste gênero também foi demonstrada por Barker *et al.* (2001) e Teneva *et al.* (2005).

Neste contexto, Komárek *et al.* (2009) propuseram o gênero *Phormidesmis* com base em análises moleculares, morfológicas e ultraestruturais de diferentes linhagens identificadas morfológicamente com a espécie tropical *Phormidium molle* Gomont. Este material representava um clado distante de *Phormidium* e foi classificado como um gênero distinto na família Pseudanabaenaceae. Além disso, de acordo estes autores, há outras espécies de *Phormidium* morfológicamente correspondente ao gênero *Phormidesmis* (*Phormidium priestleyi* Fritsch, *Phormidium bohneri* Schimidle, *P. gracile* (Meneghini *ex* Gomont) Anagnostidis, *P. hamelii* (Frémy) Anagnostidis *et* Komárek, *P. jenkelianum* Schmidt, *P. macedonicum* Cado, *P. monile* Setchell *et* Gardner e *P. steymarkii* Drouet), que devem ser confirmadas por análises morfológicas e moleculares.

O gênero *Wilmottia* foi proposto por Strunecký *et al.* (2011) a partir da análise filogenética de linhagens isoladas de diferentes localidades da Antártica. Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, diversas linhagens morfológicamente similares à espécie *Phormidium murrayi* constituíram um clado distinto (98-100% de identidade) muito bem separado do gênero *Phormidium*. Apesar da espécie tipo do gênero, *W. murrayi*, ser considerada endêmica, os autores mencionam que linhagens similares a *Ph. murrayi* isoladas de outras localidades, como Brasil e Nova Zelândia, provavelmente pertencem a este gênero, apesar de serem ecologicamente distintas.

Chatchawan *et al.* (2012) descreveram *Oxynema* a partir de uma população isolada de ambiente hipersalino, cuja espécie tipo foi designada como *O. thainaum*. Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, *O. thainaum* representa um clado isolado com linhagens de *Phormidium lloydianum* e *Ph. acuminatum* incluídas no “grupo I” de *Phormidium* (*sensu* Komárek & Anagnostidis 2005). Assim, o respectivo clado foi proposto como *Oxynema*, apesar de outras espécies com morfologia semelhante necessitarem de revisão para confirmar se pertencem ou não ao este novo gênero (Chatchawan *et al.* 2012).

Recentemente, Strunecky *et al.* (2013) propuseram a transferência de 14 espécies de *Phormidium autumnale sensu lato* para *Microcoleus*. De acordo com estes autores, apenas espécies tradicionais do complexo *Phormidium autumnale*, que continham aspectos morfológicos bem caracterizados (tricomas cilíndricos, curvos no ápice, brevemente ou gradualmente atenuado, células subquadráticas a isodiamétricas, célula apical capitada e com caliptra) e estritamente relacionados à *Microcoleus vaginatus*, foram incluídas neste gênero.

Portanto, o estudo do complexo *Phormidium* torna-se relevante uma vez que diversos estudos têm demonstrado a sua ampla heterogeneidade morfológica e molecular, bem como a variedade de morfótipos que podem ser transferidos para outras entidades genéricas.

1.4. Diversidade do complexo *Phormidium* na Mata Atlântica e Pantanal Brasileiro

1.4.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos do planeta em diversidade biológica, sendo considerado um dos vinte e cinco *hotspots* de biodiversidade devido ao elevado grau de endemismo e alto grau de ameaça (Myers *et al.* 2000). Entretanto, esta biodiversidade é extremamente mal conhecida, sobretudo quando considerados os microorganismos, tais como cianobactérias. Esta constatação é válida para a Mata Atlântica como um todo e o Estado de São Paulo não é exceção. De acordo com Sant'Anna *et al.* (2011), menos de 20% das espécies de cianobactérias conhecidas foram catalogadas para o Estado de São Paulo, sendo este número ainda menor quando considerado apenas a área abrangida pela Mata Atlântica.

Em ambientes aquáticos de água doce, provavelmente os únicos trabalhos de cunho taxonômico que catalogaram o gênero *Phormidium* para a Mata Atlântica no Estado de São Paulo foram desenvolvidos por Branco & Necchi (1996) e Branco *et al.* (1999). Nestes estudos, sete espécies foram registradas em sistemas lóticos: *P. aerugineo-caeruleum* (Gomont) Anagnostidis et Komárek, *P. irriguum* Anagnostidis et Komárek, *P. puteale* (Gomont) Anagnostidis et Komárek, *P. retzii* (Agardh) Gomont, *P. fluviatilis* Langerheim, *P. schroederi* (Borge) Anagnostidis et Komarek e *P. willei* (Gardner) Anagnostidis et Komárek.

No que se refere aos ambientes terrestres, Branco *et al.* (2009) e Murunová & Kastovský (2007) documentaram também sete táxons pertencentes a este gênero: *P. corium* Gomont, *P. granulatum* (Gardner) Anagnostidis, *Phormidium* cf. *pachydermaticum* Frémy, *Phormidium* cf. *animale*, *Phormidium* cf. *gracile*, *Phormidium* cf. *laetevirens* e *Phormidium* sp., porém a maioria não teve sua posição taxonômica confirmada.

Vale ressaltar que todos os estudos citados até o momento analisaram a diversidade de *Phormidium* somente com base nos critérios morfológicos. Entretanto, os recentes estudos desenvolvidos têm caracterizado também a diversidade genética deste grupo de organismos. Neste contexto, Martins (2014) descreveu quatro morfoespécies pertencentes ao complexo *Phormidium* (*P. cf. formosum*, *P. inundatum*, *P. retzii* e *Phormidium* sp1), que de acordo com a autora correspondem a novos táxons para a ciência. Além disso, Pamplona *et al.* (2014) catalogaram uma nova espécie correspondente ao gênero *Oxynema*, recentemente descrito a partir de *Phormidium*. Ressalta-se que esta população foi identificada pela primeira vez por Genuário (2010).

A partir deste cenário, ressalta-se que os trabalhos desenvolvidos nesta região ainda são escassos, em vista da grande diversidade apresentada pelo gênero *Phormidium*. Deste modo, torna-se extremamente importante dar continuidade aos trabalhos florísticos no Bioma Mata Atlântica, a fim de ampliar o conhecimento da diversidade de cianobactérias tropicais.

1.4.2. Pantanal

O Pantanal, localizado na porção central da América do Sul, é uma planície de inundação periódica reconhecida nacional e internacionalmente como uma das áreas úmidas de maior importância do globo (Alho & Gonçalves 2005). Apresenta diversos tipos de corpos de água configurando-se num mosaico de ecossistemas aquáticos com exuberante biodiversidade (Alho *et al.* 1987, Alho & Gonçalves 2005).

Apesar da alta diversidade de ecossistemas, Olson *et al.* (1998) concluíram que o Pantanal é uma região de “grande significância global, vulnerável e com altíssima prioridade para a conservação em escala regional”. Apesar disso, os dados disponíveis sobre sua diversidade biológica são escassos e fragmentados (Silva *et al.* 2001, Silva 2002), principalmente quando considerados os microorganismos, sobretudo Cyanobacteria.

O primeiro trabalho taxonômico sobre Cyanobacteria foi desenvolvido por Drouet em 1938, no qual o autor registrou seis espécies para o Pantanal Norte (Mato Grosso). Dos táxons identificados apenas *Oscillatoria formosa* Gomont atualmente é considerada como *Phormidium*, e corresponde à espécie *P. formosum* (Gomont) Anagnostidis *et* Komárek. Convém ressaltar que este trabalho continha apenas descrições sumárias das espécies e vagas citações sobre a procedência do material analisado.

Após uma lacuna de 70 anos, o primeiro trabalho florístico foi desenvolvido por Santos & Sant’Anna (2010), que contribuiu significativamente para o conhecimento da biodiversidade de Cyanobacteria no Pantanal, especificamente na sub-região da Nhecolândia (Mato Grosso do Sul). Neste trabalho, os autores catalogaram 21 táxons, sendo apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Phormidium*: *P. tergestinum* (Gomont) Anagnostidis *et* Komárek e *Phormidium* sp.

Malone (2010) descreveu 22 espécies de Cyanobacteria em lagoas salinas, também situadas no Pantanal da Nhecolândia. De acordo com a autora, as lagoas estudadas são consideradas ambientes extremos devido a altos valores de pH (<9) e apresentam flora muito particular. Dentre as espécies identificadas, *Phormidium* foi o gênero com maior número de táxons (6): *P. cf. pseudo-okenii* Turicchia *et al.*, *P. cf. chalybeum* (Mertens ex Gomont) Anagnostidis *et* Komárek, *P. formosum* (Bory ex Gomont) Anagnostidis *et* Komárek, *Phormidium* sp. 1, *Phormidium* sp. 2, *Phormidium* sp. 3. Segundo Malone (2010), não foi possível definir melhor a posição taxonômica destes táxons uma vez que se mostraram

claramente diferentes das morfoespécies já descritas em literatura. Além disso, a bibliografia relacionada aos trópicos ainda é mínima, principalmente em relação aos ambientes extremos como as lagoas salinas.

Recentemente, Andreote *et al.* (2014) avaliaram a microflora de lagoas alcalinas do Pantanal e caracterizaram duas populações correspondentes ao complexo *Phormidium*. De acordo com estes autores, a baixa identidade genica destas linhagens com espécies típicas do gênero *Phormidium* indica que estes táxons devem ser considerados como novos táxons para a ciência.

Em relação aos ambientes terrestres nenhum estudo foi desenvolvido no Pantanal. Dessa maneira, torna-se extremamente importante ampliar o conhecimento sobre a diversidade de Cyanobacteria nestas áreas que já estão sofrendo intensas atividades antrópicas e nada ou muito pouco se conhece sobre sua biodiversidade.

1.5. Compostos Bioativos

Há décadas as cianobactérias são reconhecidas por produzir ampla variedade de toxinas e/ou compostos biologicamente ativos tais como substâncias antibacterianas, antitumorais, antifúngicas, antioxidantes e anticolinesterásicas (Murakami *et al.* 1988, Harrigan & Goetz 2002, Gademann & Portmann 2008).

Entretanto, a maioria dos estudos relacionados à análise destas substâncias biologicamente ativas tem se restringido a alguns gêneros planctônicos e formadores de florações como *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e *Aphanizomenon* (Lakshmana Rao *et al.* 2002). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que espécies pertencentes ao gênero *Phormidium* são capazes de produzir diferentes compostos bioativos (Tokuda *et al.* 1996, Reshef *et al.* 1997, Papendorf *et al.* 1998, Garbacki *et al.* 2000).

Segundo Tokuda *et al.* (1996), compostos isolados de diferentes linhagens de *Phormidium* apresentam atividades antitumorais e anti-inflamatórias. Nagasathya & Thajuddin (2008) demonstraram que *Phormidium tenue* isolado de ambientes hipersalinos apresentou atividade antioxidante e, de acordo com Reshef *et al.* (1997), esta espécie também pode inibir a atividade da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Outras espécies também podem apresentar compostos bioativos, como *Phormidium ectocarpi*, que possui propriedades antiplasmodiais (Papendorf *et al.* 1998).

Assim, o gênero *Phormidium* pode ser considerado uma excelente fonte de diferentes substâncias bioativas (Teneva *et al.* 2005). No entanto, em regiões tropicais/sutropicais poucos estudos têm sido desenvolvidos. No Brasil, especificamente, não há dados sobre a análise destes compostos em *Phormidium*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade do complexo *Phormidium* em ambientes aquáticos e terrestres dos biomas Mata Atlântica e Pantanal.

Objetivos específicos:

1. Descrever a diversidade genotípica e morfológica do complexo *Phormidium*.
2. Caracterizar as linhagens estudadas com base em aspectos morfológicos, ambientais e moleculares;
3. Testar os genes *rpoC1* e *rbcLX*, além do espaçador intergênico 16S-23S RNAr como marcadores moleculares para definição das relações interespecíficas;
4. Detectar metabólitos secundários com possíveis atividades anticolinesterásica, antifúngica e antioxidante, além da cianotoxina β -metilaminoalanina (BMAA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

3.1.1. Mata Atlântica

Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica é um dos maiores ecossistemas em expansão territorial, cobrindo originalmente 13,04% do território nacional. Contudo, atualmente restam apenas 14,5% de remanescentes florestais e áreas naturais, como campos, várzeas, refúgios, cordões de restinga e dunas (SOS Mata Atlântica & INPE 2013). De acordo com Oliveira-Filho & Fontes (2000), este bioma está entre as florestas mais ameaçadas do mundo, pois grande parte de sua área coincide com as regiões mais populosas do Brasil. Nas décadas de 50 e 60, cidades como Rio de Janeiro e São Paulo já apresentavam altas taxas de crescimento gerando perdas e a fragmentação do bioma (Ghazoul & Sheil 2010).

No Estado de São Paulo, área do presente estudo, a Mata Atlântica que cobria originalmente 69% do estado, atualmente possui apenas 13,9% de áreas florestais (SOS Mata Atlântica & INPE 2013). Apesar da drástica redução da vegetação, o Estado de São Paulo apresenta uma das maiores porções remanescente deste bioma ao longo do litoral, preservada como parques estaduais e estações ecológicas (Leitão Filho 1994, SOS Mata Atlântica & INPE 2013). O Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), localizado neste estado, é a maior área de proteção integral do litoral brasileiro e a maior área protegida de Mata Atlântica. Além disso, é o único corredor biológico íntegro conectando os remanescentes florestais do sul do estado do Rio de Janeiro ao Vale do Ribeira e Paraná, possibilitando a manutenção dos fluxos gênicos e a preservação de espécies (Hirota 2003). Qualquer que seja o grupo taxonômico considerado, a estimativa do número de espécies na Mata Atlântica está entre as maiores do planeta (Myers *et al.* 2000).

Deste modo, no presente estudo foram selecionadas áreas de coleta (Figura 1) localizadas em regiões de maior concentração de fragmentos conservados da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, como descritos a seguir:

Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia (23°24' S e 45°11' W)

O Núcleo Santa Virgínia, localizado em região tropical, ocupa áreas de quatro municípios do Vale do Paraíba do Sul, como São Luis do Paraitinga, Cunha, Ubatuba e Natividade da Serra. Além disso, o Núcleo está localizado no alto da Serra do Mar, com altitudes que variam de 870 a 1.600 m. A área é coberta por floresta primária (Floresta

Ombrófila Densa), entremeada por manchas de Floresta Atlântica em regeneração. O clima é subtropical úmido com pluviosidade média anual de 2.500 mm (Padgurschi *et al.* 2011). O total mensal de chuvas é em média maior que 100 mm na estação chuvosa (outubro a março) e inferior a 30 mm na estação seca (abril a setembro). A média anual de temperatura mantém-se em torno de 20,8 °C (Hartmann *et al.* 2009).

Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI) (24°18' a 24°37' S e 47°00' a 47°31' W)

A Estação Ecológica Juréia-Itatins, localizada na região subtropical, situa-se no Vale do Ribeira, sul do Estado de São Paulo, entre os municípios de Iguape, Miracatu, Itariri e Peruíbe. A Juréia está inserida no Complexo Estuarino-Lagunar de Iguape-Paranaguá, que é considerado um dos três principais conjuntos de ecossistemas do mundo em termos de produtividade primária e uma das últimas regiões não poluídas do Atlântico Sul. É uma das maiores áreas protegidas do Bioma Mata Atlântica do Estado de São Paulo e caracteriza-se por abrigar vasta vegetação representada pela Floresta Ombrófila Densa Submontana e Montana. A EEJI é uma das últimas áreas do estado que apresentam praias arenosas, costões rochosos, manguezais, matas de restinga e florestas de baixada, de encosta e de altitude. O clima da região é subtropical úmido, sem estação seca definida, com pluviosidade anual média de 2277,0 mm sendo a temperatura média anual variando entre 17,8-25,2 °C (Fundação Florestal - <http://www.fflorestal.sp.gov.br>).

Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) (25°03" a 25°18" S e 47°53" a 48°05" W)

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso, localizado em região subtropical, está inserido no Complexo Estuarino-Lagunar de Iguape-Paranaguá, no litoral extremo Sul do Estado de São Paulo. O Parque abriga uma das maiores áreas contínuas de floresta primária preservada do estado. É um ecossistema complexo, formados por costões rochosos, praias, braços de mar, estuários, lagoas, manguezais, rios e restinga que cobre a maior parte da planície litorânea da Ilha. Além disso, apresenta montanhas com extensas faixas florestais, cujas maiores altitudes ultrapassam 800 metros (Fundação Florestal - <http://www.fflorestal.sp.gov.br>). O clima da região é do tipo equatorial, megatérmico, superúmido sem estação seca definida e com excesso de chuvas no verão. As temperaturas médias anuais variam entre 20 a 22 °C com amplitudes relativamente baixas e a precipitação média anual mantém-se em torno de 2000 mm (Secretaria do Meio Ambiente 1998).

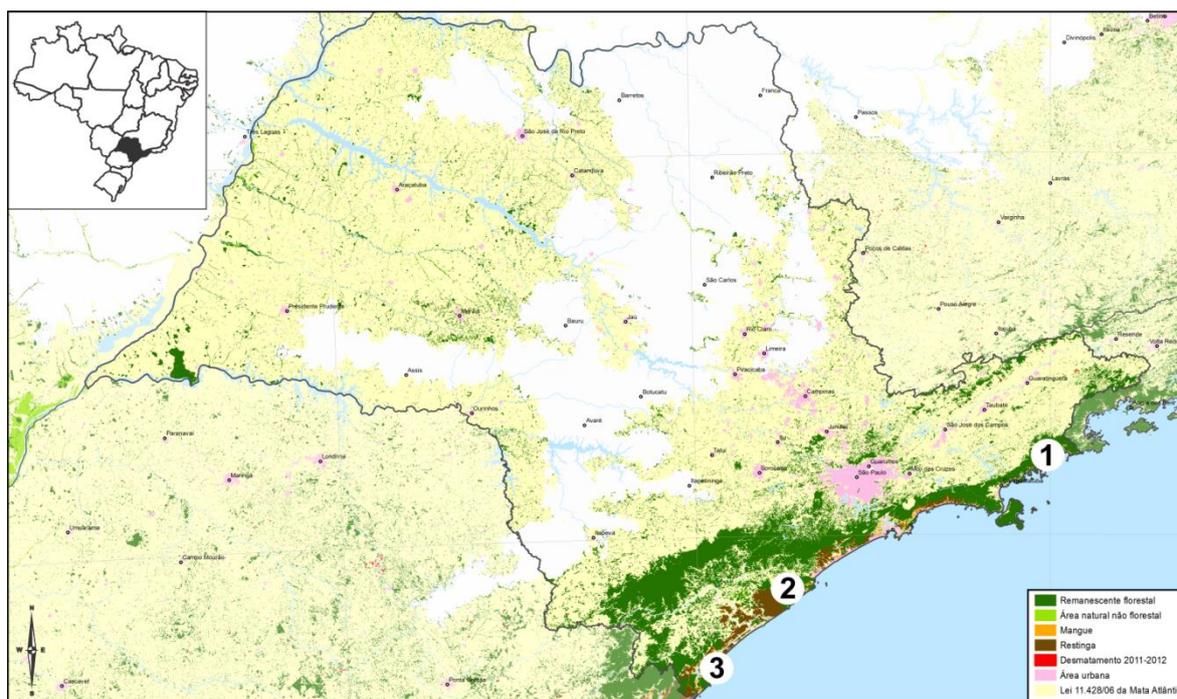


Figura 1. Localização das áreas de coleta referentes ao Bioma Mata Atlântica, Estado de São Paulo. **1.** Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia. **2.** Estação Ecológica Juréia-Itatins. **3.** Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Adaptado de SOS Mata Atlântica & INPE (2013).

3.1.2. Pantanal Brasileiro

Em território brasileiro, o Pantanal ocupa cerca de 140.000 km² entre os estados de Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%) (Silva & Abdon 1998). Inserido na Bacia do Alto Paraguai (BAP), o Pantanal funciona como um corredor de transição entre as bacias Amazônica e Prata. Constitui um ambiente complexo, com influências de diferentes biomas, como a Amazônia, Cerrado, Chaco, Mata Atlântica e o Bosque Seco Chiquitano, que conduzem às diferenças pedológicas, climáticas, no fluxo hídrico e nos períodos de chuvas e inundações. Tais diferenças influenciam a formação de distintas paisagens que, por sua vez, constituem as sub-regiões do Pantanal (Silva & Abdon 1998, Alho & Gonçalves 2005, Junk & Cunha 2005). Dentre as sub-regiões, duas áreas foram selecionadas para este estudo (Figura 2), como descrito a seguir:

Sub-região do Pantanal da Nhecolândia (18°59'S e 56°39'W)

A sub-região do Pantanal da Nhecolândia, localizada no município de Corumbá (MS), destaca-se como uma região muito particular e complexa, com densa rede hidrográfica. Com área estimada em 26.921 km², a Nhecolândia ocupa 19,5% da área total do Pantanal (em

território brasileiro), representando uma das maiores sub-regiões deste bioma (Silva & Abdon 1998).

O clima na região é do tipo AWA: tropical de altitude, megatérmico (a temperatura média do mês mais frio é superior a 18 °C), com inverno seco e chuvas no verão; ocorrem duas estações bem contrastantes, os meses de novembro a março, caracterizados como época chuvosa, e abril a outubro, como período de seca; temperatura média anual de 25,5°C e precipitação média anual 1.182,7 mm (Soriano 1999).

A principal peculiaridade desta sub-região é a presença de milhares de lagoas rasas (profundidade não excede 2 m) predominantemente circulares, com extensão de 50 m a 2-3 km no sentido mais longo, as quais podem ser diferenciadas de acordo com suas características limnológicas: baías, salitradas e salinas (Allem & Valls 1987, Calheiros & Oliveira 1999). Fernandes (2007) estimou a presença de 9.324 lagoas, 84% destas consideradas baías (7.832) e 16% consideradas salinas (1.492).

As salinas são lagoas alcalinas de água salobra, ricas em íons sódio e potássio, circundadas por praias de areia branca (sem vegetação), livres de macrófitas e peixes. Essas lagoas permanecem isoladas de outros sistemas, uma vez que são protegidas por regiões mais elevadas e recobertas com floresta denominadas “cordilheiras”. As condições limnológicas das salinas são consideradas extremas devido ao pH altamente alcalino (9-11) e elevada condutividade ($>2.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Brum & Sousa 1985, Mourão *et al.* 1988, Por 1995).

Por outro lado, as baías apresentam águas ligeiramente ácidas (pH 5-7,4), pobres em eletrólitos (condutividade $<1.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), densas concentrações de macrófitas, presença de peixes e conectam-se com outras lagoas durante o período de cheia (Mourão *et al.* 1988, Sakamoto *et al.* 1999). As lagoas salitradas apresentam características intermediárias entre as baías e salinas. Estas lagoas, assim como as baías, conectam-se com outras lagoas nos períodos de cheia. Além disso, apresentam macrófitas no seu interior e pH geralmente baixo (5-7). No período de seca, as lagoas salitradas apresentam pH elevado (até 9), o que as aproximam das características das salinas (Santos & Sant’Anna 2010).

A vista aérea desta sub-região mostra fisionomia bastante típica, caracterizada pelas inúmeras lagoas, campos limpos, bosques, cerrados, cerradão (“cordilheiras”) e savanas (Allem & Valls 1987, Embrapa 1997).

Sub-região do Pantanal de Miranda (19°34,5'04 "S e 57°02'17"W)

A sub-região do Pantanal de Miranda abrange áreas nos municípios de Aquidauana, Bodoquena e Miranda, e está entre uma das menores áreas do Pantanal Brasileiro, ocupando cerca 3,0% deste complexo. Limita-se ao norte, pelo Pantanal do Abobral, ao sul, pelas

Florestas Chaquenhas do município de Porto Murtinho, a leste, pelo Pantanal de Aquidauana e a oeste, pela Serra da Bodoquena e o Pantanal de Nabileque (Silva & Abdon 1998).

A sub-região se caracteriza por vegetação do Bioma Cerrado, com formações de cerradão, Mata Semi-decídua, Mata de Galeria, campo inundado, campo seco, brejo (Da Silva *et al.* 2000). Em termos fitofisionômicos, o Cerrado nesta região assemelha-se a vegetação Chaquenha, com sobreposição de espécies dos territórios paraguaio e brasileiro. Além disso, possui amplas áreas com predominância de uma flora típica, como o “paratudo” (*Tabebuia aurea*) e palmeiras carandás (*Copernicia alba*) (Allem & Valls 1987).

Deste modo, a sub-região de Miranda, assim como toda a área do Pantanal brasileiro, apresenta imensa diferenciação de habitats e conseqüente diversidade ecológica, permitindo a manutenção de rica biodiversidade florística e faunística (Junk *et al.* 2006). Além disso, esta região consiste num celeiro de biodiversidade inexplorado, quando considerando micro-organismos, uma vez que os estudos realizados, como mencionado anteriormente, são poucos frente à complexidade do bioma.

Ressalta-se que nesta região as coletas foram realizadas principalmente na área da Unidade de Estudos do Pantanal (19°34’S e 57°01’W) pertencente à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Esta base de estudo foi construída às margens do Rio Miranda e contempla toda diversidade de fitofisionômica apresentada por esta sub-região. Além disso, possui alta variabilidade de sistemas aquáticos como rios, lagoas, campos inundados, brejos, o que permitiu desempenhar as coletas com êxito.

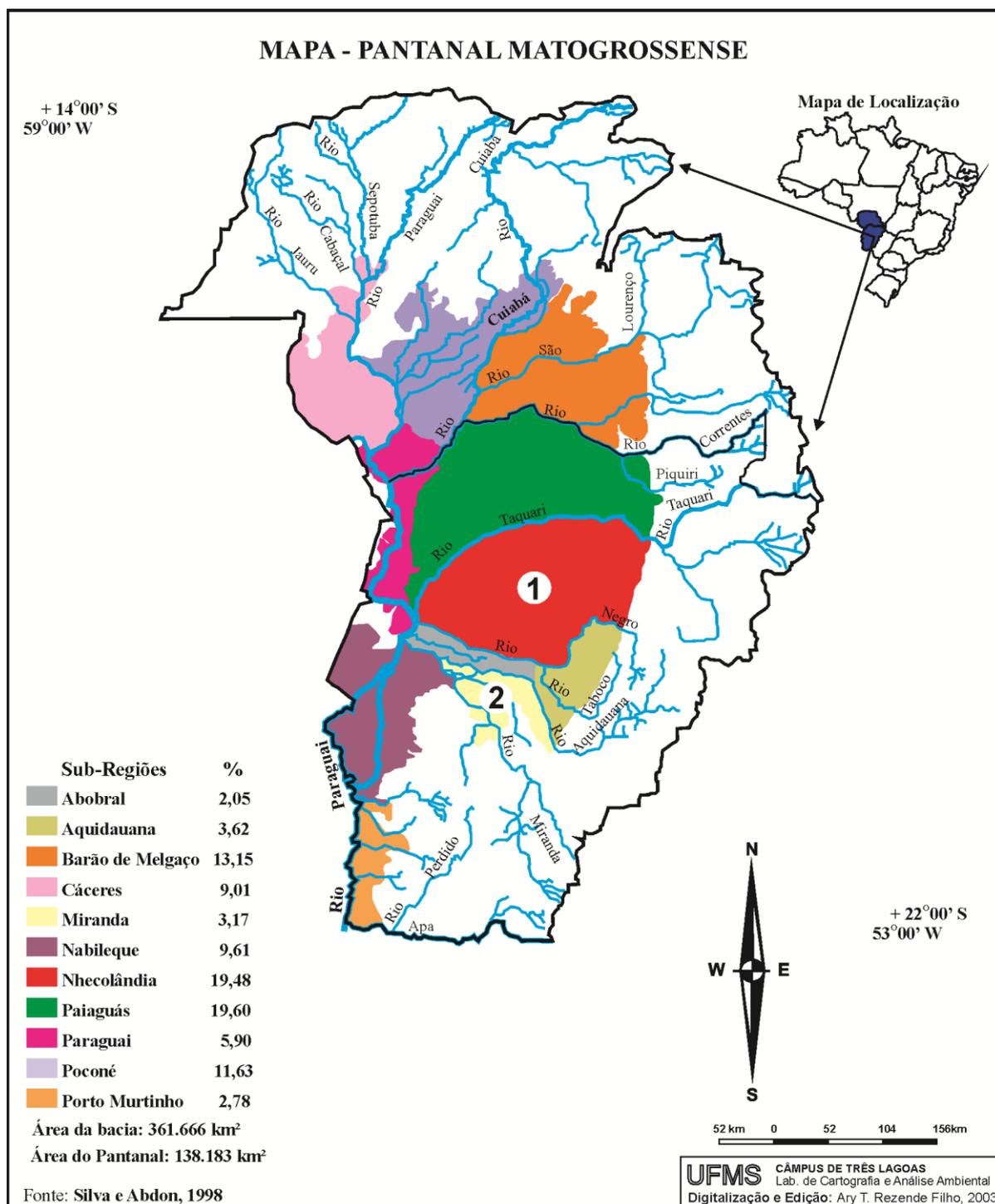


Figura 2. Localização das áreas de coleta referentes ao Pantanal Brasileiro, Estado de Mato Grosso Sul. **1.** Sub-região do Pantanal da Nhecolândia. **2.** Sub-região do Pantanal do Miranda. Mapa ilustrado conforme Silva & Abdon (1998), adaptado por Rezende-Filho (2003).

3.2. Amostragem e Métodos de Coleta

As expedições de coleta foram realizadas entre os anos de 2010 e 2012 em ambos os biomas estudados. No Pantanal brasileiro, as coletas foram realizadas tanto na cheia (maio de 2012) quanto na seca (outubro 2010), que são períodos bem contrastantes nesta região. Em ambas as expedições, tanto as áreas do Pantanal da Nhecolândia como do Miranda foram amostradas. Amostras coletadas anteriormente (2007- 2009) nestas regiões também foram incluídas neste estudo.

Em relação à Mata Atlântica, as coletas foram realizadas nos meses de fevereiro (Núcleo Santa Virgínia) e junho de 2010 (Ilha do Cardoso) e agosto de 2011 (Estação Juréia-Itatins). A expedição ao Núcleo Santa Virgínia foi realizada na estação chuvosa (outubro a março), pois neste período as condições ambientais são mais favoráveis ao desenvolvimento das comunidades terrestres, principalmente quando considerado o gênero estudado. No que se refere às outras regiões, as coletas foram determinadas em períodos aleatórios, uma vez que ambas as áreas apresentam clima sub-úmido a extremamente úmido, sem estação seca definida.

Em ambos os biomas e com a finalidade de amostrar a maior variabilidade possível de habitats em cada localidade, as coletas foram realizadas em ambientes aquáticos (plâncton, perifíton, bentos e substratos submersos) e terrestres (rochas, troncos, solos e substratos artificiais como concreto, encanamentos e telhados).

Em ambientes aquáticos, as amostras planctônicas foram coletadas utilizando-se rede de plâncton com abertura de malha de 10 e 20 μm . Em relação às amostras perifíticas, porções de macrófitas foram coletadas e mantidas em frascos com um pequeno volume da água do local. O material bentônico foi coletado diretamente com frasco ou espátula (quando ocorreu a formação de massas macroscópicas) ou através da raspagem de substratos (rochas, troncos, folhas) submersos.

Em relação aos ambientes terrestres, a coleta foi realizada em solos superficiais, cascas de árvores, rochas e em substratos artificiais como concreto, parede, postes, encanamentos, cordas e telhados. Quando necessário, utilizou-se água destilada para facilitar a raspagem do material. A fim de registrar as características ambientais, fotografias do substrato foram feitas para cada amostra, além de anotações referentes à localização, aspectos de umidade e incidência luminosa (avaliação visual). As coordenadas foram tomadas com aparelho GPS Garmin, modelo eTrex Vista HCx.

Em campo, parte de todas as amostras coletadas (aquáticas e terrestres) foi preservada em formol 4% na proporção de 1:1 e o restante foi mantido vivo para triagem, isolamento dos organismos e análise morfológica. Especificamente para o material terrestre, as amostras também foram preservadas a seco (coloca-se o material sobre papel e deixa-se secar naturalmente).

3.3. Triagem das Amostras

Em laboratório, tanto as amostras aquáticas (sem adição de formol) quanto as terrestres (conservadas a seco) foram previamente visualizadas ao microscópio óptico com o objetivo de separar apenas aquelas que continham populações de interesse do presente estudo. Para visualização das amostras terrestres foi necessário retirar pequenas porções do material para prévia hidratação com água estéril (cerca de 20 horas) em placa de Petri. Após a triagem do material, a próxima etapa desenvolvida foi o isolamento dos organismos a partir das amostras selecionadas.

3.4. Isolamento e Cultivo

Os procedimentos de isolamento e cultivo do material foram realizados no Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marinho” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo.

A priori, os meios de cultivos utilizados foram ASM-1 (Gorham *et al.* 1964 modificado por Zagatto & Aragão 1992) e BG-11 (Rippka 1979), que são comumente empregados para o cultivo de cianobactérias. Posteriormente, as linhagens foram mantidas no meio BG11, que permitiu o melhor desenvolvimento de todos os organismos estudados.

Ambos os meios de cultivos foram preparados a partir dos nutrientes detalhados nas Tabelas 1 e 2, conforme descrito por Jacinavicius *et al.* (2012). Quando necessário, o pH padrão (7,4) do meio de cultura foi alterado com o objetivo de tornar as condições de cultivo semelhantes às encontradas na natureza, possibilitando deste modo o melhor desenvolvimento dos organismos.

Os meios de cultura (BG-11 ou ASM-1) foram utilizados em diferentes condições de acordo com cada etapa de isolamento ou manutenção das linhagens: meio sólido ou líquido esterilizado, com ou sem cicloheximida (antibiótico que não permite o desenvolvimento de organismos eucariontes). No caso, a adição deste antibiótico foi necessária somente quando inoculado material da natureza.

Tabela 1. Nutrientes do meio de cultura ASM-1 (Gorham et al. 1964), com modificações (Zagatto & Aragão 1992).

Nutrientes – Soluções Estoque	Quantidade (g/L)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	8,5000
Fosfato ácido dipotássio (K ₂ HPO ₄)	8,7000
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2,4500
Cloreto magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	2,0500
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1,4500
Hidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	8,7000
Fosfato disódium de hidrogênio dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	17,8000
Cloreto de manganês tetrahidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	13,9000
Cloreto de ferro hexahidratado (FeCl ₂ .6H ₂ O)	10,8000
Cloreto de zinco (ZnCl ₂)	3,3500
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,1900
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	28,4000
Cloreto de cobre dihidratado (CuCl ₂ .2H ₂ O)	0,0140
EDTA tritriplex	18,6000

Tabela 2. Nutrientes do meio de cultura BG-11, conforme Rippka (1979).

Nutrientes – Soluções Estoque	Quantidade (g/L)
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,1000
Citrato férrico amoniacal (C ₆ H ₈ O ₇ xFe ³⁺ yNH ₃)	0,6000
Solução metais traços *	(*)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	150,0000
Fosfato ácido dipotássio trihidratado (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O)	4,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	7,5000
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	3,6000
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	2,0000
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	0,6000

* H₃BO₃ [28,6000], MnCl₂.4H₂O [1,8100], ZnSO₄.7H₂O [0,2220], Na₂MoO₄ [0,3900], CuSO₄.5H₂O [0,0790], Co(NO₃O)₂.6H₂O [0,0494].

O isolamento das linhagens foi realizado a partir dos métodos de plaqueamento e “pescaria”. Uma alíquota de todas as amostras aquáticas foi mantida separadamente em meio

de cultivo a fim de se garantir a viabilidade da mesma até que o organismo de interesse fosse isolado. Este procedimento não foi realizado a partir das amostras terrestres, uma vez que o material se mantém viável por um longo período quando preservado a seco.

O método de plaqueamento consistiu em inocular gotas ou partes da amostra da natureza em uma placa de Petri com meio sólido (com cicloheximida). Após o desenvolvimento dos organismos, as placas foram examinadas, retirando-se pequenas frações de diferentes “pontos” para a observação do material ao microscópio óptico. As frações que continham grande quantidade dos organismos de interesse foram retiradas das placas e inoculadas novamente em meio de cultivo sólido. Após o crescimento de biomassa visível, fez-se novamente a análise de algumas frações ao microscópio para verificar se o material estava uniespecífico. Este procedimento foi repetido de 3 a 4 vezes, porém quando não obtínhamos sucesso no isolamento, utilizava-se o método de pescaria.

Deste modo, os procedimentos para o isolamento das linhagens pelo método de pescaria foram realizados a partir de amostras provenientes das placas ou diretamente do material da natureza. Este método consistiu em separar e inocular apenas um organismo de cada morfoespécie por tubo de ensaio (Figura 3). Em uma lâmina flambada foi colocado uma gota da amostra, composta por diferentes morfoespécies, e várias gotas de meio de cultivo esterilizado. Ao microscópio óptico (ocular de 10 e 20 x), com o auxílio de uma micropipeta, organismos de interesse foram transferidos da amostra para gotas do meio de cultivo limpo. Este processo foi realizado sucessivamente, até que se obtivesse apenas um organismo na gota de meio limpo. Após este procedimento, o espécime isolado foi transferido para um tubo de ensaio com pequena quantidade de meio (5 mL). Para cada morfoespécie foram feitas cinco réplicas, pois nem sempre o organismo se desenvolve ou obtém-se sucesso no isolamento.

Ressalta-se que todos os procedimentos de isolamento e manipulação de meios e materiais esterilizados foram realizados no interior de câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por meio de luz UV durante 30 minutos.

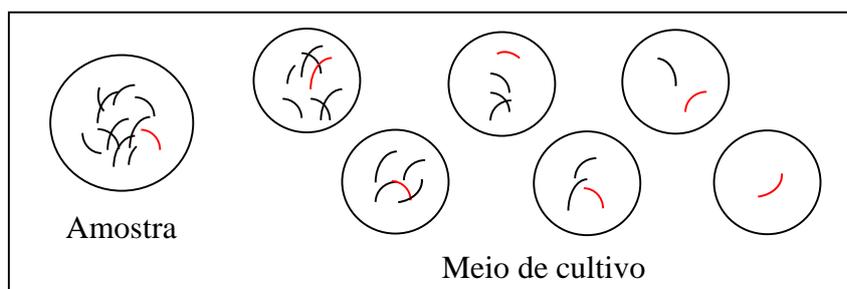


Figura 3. Procedimento realizado para o isolamento das linhagens pelo método de pescaria.

As linhagens isoladas foram incluídas na Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt) e são mantidas em condições controladas, conforme segue: temperatura 23 ± 1 °C, irradiância 40-50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo 14 – 10 h claro-escuro, sendo repicadas a cada 30 dias. Ressalta-se que as mesmas condi\u00e7\u00f5es foram utilizadas para o material em fase de isolamento.

As linhagens isoladas e as respectivas amostras da natureza foram depositadas no acervo do Herb\u00e1rio Cient\u00edfico do Estado “Maria Eneyda P. Kauffaman Fidalgo” (SP) do Instituto de Bot\u00e2nica de S\u00e3o Paulo. Todas as informa\u00e7\u00f5es destas amostras est\u00e3o detalhadas na listagem anexa (Anexo I).

3.5. Estudo Taxon\u00f4mico

As an\u00e1lises morfom\u00e9tricas do material da natureza e cultura foram realizadas ao microsc\u00f3pio \u00f3ptico binocular Axioplan-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com dispositivo de epifluoresc\u00eancia e sistema de captura digital de imagens AxioCAM MCR (Carl Zeiss), acoplados ao equipamento.

O sistema de epifluoresc\u00eancia foi utilizado para evidenciar a presen\u00e7a de ficocianina (filtro verde: excita\u00e7\u00e3o na faixa de 546 nm) e clorofila *a* (filtro azul: excita\u00e7\u00e3o no faixa de 450-490 nm), possibilitando a distin\u00e7\u00e3o entre cianobact\u00e9rias (que apresentam clorofila *a* e ficocianina) e eubact\u00e9rias (que n\u00e3o apresentam ambos os pigmentos). A epifluoresc\u00eancia tamb\u00e9m foi utilizada para confirmar o isolamento da linhagem (para a detec\u00e7\u00e3o de poss\u00edveis organismos contaminantes).

As ilustra\u00e7\u00f5es das esp\u00e9cies constaram de fotografias obtidas atrav\u00e9s de sistema de captura digital AxioVision V. 4.8.2.0 (Carl Zeiss), adaptado ao microsc\u00f3pio. Os dados m\u00e9tricos foram obtidos por meio da an\u00e1lise das fotografias pelo mesmo sistema. Para cada linhagem analisada, foram tomadas medidas dos tricomas e c\u00e9lulas vegetativas a partir de 30 indiv\u00edduos (variabilidade populacional). Os limites m\u00e9tricos m\u00e1ximo e m\u00ednimo, al\u00e9m da m\u00e9dia (entre par\u00eanteses) de cada linhagem est\u00e3o apresentados em tabelas, abaixo das descri\u00e7\u00f5es dos t\u00e1xons. Quando foi poss\u00edvel analisar o material de cultura e natureza, os dados m\u00e9tricos referentes a cada popula\u00e7\u00e3o foram descritos para fins comparativos.

Em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 an\u00e1lise morfol\u00f3gica, os principais crit\u00e9rios taxon\u00f4micos observados em todas as popula\u00e7\u00f5es analisadas foram: forma do talo (arranjo dos tricomas/filamentos), dimens\u00f5es celulares, forma da c\u00e9lula vegetativa, caracter\u00edsticas da c\u00e9lula apical, presen\u00e7a ou aus\u00eancia de caliptra ou espessamentos, constri\u00e7\u00f5es dos septos transversais, motilidade, presen\u00e7a ou aus\u00eancia de bainha mucilaginoso, necr\u00eddios, inclus\u00f5es celulares (Kom\u00e1rek & Anagnostidis 2005). Quando necess\u00e1rio, foi realizado a an\u00e1lise do ciclo de vida das linhagens a fim de

observar mudanças contrastantes em relação a todos estes critérios taxonômicos. A análise do ciclo de vida foi realizada por meio da observação diária do material durante 30 dias. Esta análise foi realizada a partir de um inóculo que continha organismos em uma mesma fase do ciclo de vida, ou seja, com características morfológicas similares.

A identificação taxonômica baseou-se em literatura especializada e, sempre que necessário, as descrições originais dos táxons também foram analisadas para que o conceito inicial fosse preservado e eventualmente comparado com demais estudos. O sistema de classificação adotado foi o de Hoffmann *et al.* (2005).

3.6. Análise Molecular

Neste estudo foi realizado o sequenciamento parcial de diferentes marcadores moleculares de 30 linhagens: gene RNAr 16S, o espaçador intergênico 16S-23S RNAr (ITS), *rpoC1* (codifica a subunidade γ da RNA polimerase), *rbcLX* (codifica a D-ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase), *nifD* (codifica o co-fator ferro-molibdênio da enzima nitrogenase) e *nifH* (codifica a subunidade Fe-proteína da enzima nitrogenase).

As análises moleculares foram desenvolvidas em diferentes centros de pesquisa. No Brasil, as análises do fragmento gênico 16S RNAr + ITS de 16 linhagens foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA/USP), sob supervisão da Dra. Marli de Fátima Fiore (co-orientadora) e Dra. Janaina Rigonato. As demais análises, tanto do fragmento 16S RNAr + ITS como dos demais loci gênicos foram realizadas no *Centre for Protein Engineering, Laboratory of Bacterial Physiology and Genetics* da Universidade de Liège, Bélgica, sob supervisão da Dra. Annick Wilmotte.

3.6.1. Preparação da amostra para extração de DNA genômico

A produção de biomassa para as análises moleculares foi realizada a partir de linhagem uniespecífica de cianobactéria. Para a extração de DNA, utilizou-se cerca de 2 mL de cultura em meio líquido. Uma vez que as linhagens estudadas não são axênicas e a maioria dos organismos apresenta bainha mucilaginosa, métodos de lavagem foram necessários para remoção de bactérias heterotróficas associadas. A presença destas bactérias aderidas ou não à bainha mucilaginosa pode interferir nas diferentes etapas da análise. Deste modo, o tratamento I ou II foi utilizado para a lavagem da biomassa de cianobactéria produzida, como segue:

➤ **Tratamento I** (Kling *et al.* 2012)

1 mL de Tampão TE (Tris 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M) foi adicionado ao material e agitado em vortex. Posteriormente, o material foi centrifugado (10.000 rpm por 10 min) e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido 3x.

➤ **Tratamento II**

500 µl de solução de lavagem (Tris-HCL 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M e NaCL 5 M) e 50 µl de SDS 2% (dodecil sulfato de sódio) foram adicionados às amostras. Posteriormente, o material foi agitado em vortex, centrifugado (13.000 rpm por 5 min) e o sobrenadante descartado. Por fim, adicionou-se mais 1 mL da solução de lavagem e o material foi agitado em vortex novamente, centrifugado (7000 rpm por 5 min) e o sobrenadante descartado.

3.6.2. Extração de DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico foram realizadas por meio do kit Ultra Clean® Microbial DNA Isolation (MO BIO, Carlsbad, CA, USA). Após a extração do DNA genômico, alíquotas (2 µL) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 0,3%, EDTA 0,5M) e GelRed™ 0,6X (Biotium, Hayward, USA) ou Brometo de Etídio (0,5 µg.mL⁻¹). A integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1 %, após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (1X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o programa *Multi Analyst* do *Fluor-S™ MultiImager* (BioRad, Hercules, CA, USA). Como padrão de tamanho e concentração de DNA foi utilizado o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ou λ DNA/*HindIII* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A concentração de DNA foi mensurada (µg/mL) por meio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), ou por comparação com o marcador *Low DNA Mass Ladder* após eletroforese. O DNA genômico foi armazenado a -20°C.

3.6.3. Amplificação gênica

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos gênicos 16S RNAr + ITS, *rpoC1*, *rbcLX*, *nifD* e *nifH* estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos 16S RNAr + ITS, *rpoC1*, *rbcLX*, *nifD* e *nifH*.

Fragmento	Primers	Sequência do Primer	Referências
16S rRNA + ITS	16S27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Neilan <i>et al.</i> 1997
	23S30R	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	Taton <i>et al.</i> 2003
<i>rpoC1</i>	CYrpoC3	CCCGCNAARGAYTGGGAATG	Glowacka <i>et al.</i> 2011
	CYrpoC4	GCTTCYTGCAATCCGYTTYTC	
<i>rbcLX</i>	CW	CGTAGCTTCCGGTGGTATCCACGT	Rudi <i>et al.</i> 1998
	DF	GGGCARYTTCCACA KNGTCCA	
<i>nifD</i>	<i>nifD</i> 552-F	TCCGKGGKGTDTCTCAGTC	Roeselers <i>et al.</i> 2007
	<i>nifD</i> 861-R	CGRCWGATRTAGTTCAT	
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> -F	CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA	Olson <i>et al.</i> 1998
	<i>nifH</i> -R	GCATACATCGCCATCATTTCACC	

Neste tópico, torna-se importante ressaltar que diferentes iniciadores foram testados para os loci gênicos *rpoC1* e *rbcLX*, uma vez que estes loci são pouco estudados para o gênero em questão. No que se refere ao gene *rpoC1*, dois diferentes pares de iniciadores degenerados foram testados, tais como: CYrpoC3/ CYrpoC4 (Glowacka *et al.* 2011) e RintF (TGGGGHGAAGNACAYTNCCTAA)/ RintR (GCAAANCGTCCNCCATCYAAYTGBA) (Rantala *et al.* 2004). Além disso, diferentes condições de PCR foram testadas, incluindo aquelas indicadas por estes autores, com o intuito de obter os parâmetros adequados para a amplificação dos fragmentos. Deste modo, optou-se utilizar os iniciadores descritos por Glowacka *et al.* (2011), uma vez que este marcador foi amplificado para todas as linhagens analisadas. A partir dos iniciadores RintF e Rint-R, obteve-se resultados positivos apenas para 50% das linhagens.

Rudi *et al.* (1998) publicaram diferentes iniciadores para amplificação da região *rbcLX*, de acordo com grupos de organismos. Segundo os autores, para a categoria denominada como “*Planktothrix*” utilizou-se os iniciadores CW (CGTAGCTTCCGGTGG TATCCACGT) e DF (GGGCARYTTCCACA KNGTCCA), enquanto que para outros grupos (“*Nostoc*” e “*Microcystis*”), a amplificação foi feita a partir de CW/CX (GGGGCAGGTAAGAAAGG

GTTTCGTA). No presente estudo, os diferentes iniciadores foram testados e optou-se pelo conjunto CW/DF devido aos melhores resultados obtidos. Este resultado já era esperado, uma vez que *Phormidium* e *Planktothrix* pertencem à mesma categoria taxonômica (Família Phormidiaceae).

Reação de PCR

A amplificação do fragmento 16S RNAr + ITS de 16 linhagens analisadas foi feita em reação contendo: 5 µL de tampão para a reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,25 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 20-50 ng de DNA, 5 µM de cada iniciador, água ultrapura (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) esterilizada, para um volume final de 25 µL. As demais amplificações, tanto do 16S RNAr + ITS como dos outros marcadores, foram feitas em reação contendo: 5 µl de tampão para a reação PCR 1 X Super Taq Plus com Mg²⁺, 5 µl de BSA (1 mg/mL), 0,25 mM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador, cerca de 50 ng of DNA, 1 U Super Taq Plus polimerase com atividade de reparação (HT Biotechnology, Cambridge, UK), água estéril (Sigma), para um volume final de 50 µl.

Condições para amplificação gênica

As condições utilizadas para amplificação dos fragmentos gênicos analisados consistiram em desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguidos de ciclos com condições específicas para cada fragmento, como detalhado na tabela 4.

A verificação dos produtos de PCR e documentação do gel foi realizada conforme descrito no item 3.6.2. Como padrão de tamanho e concentração dos fragmentos amplificados foram utilizados os marcadores *Low DNA Mass ladder* (Life Technologies) ou *pBR322 DNA/AluI* (Thermo Fisher Scientific). A concentração do produto foi mensurada (µg/mL) por meio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus.

A purificação do produto de PCR foi realizada por meio do kit GeneJet PCR Purification (Fermentas Life Science), a fim de remover iniciadores excedentes, dNTPs não incorporados, sais e enzimas, nos casos em que o sequenciamento do fragmento foi realizado diretamente do produto de PCR.

Tabela 4. Condições para amplificação gênica dos fragmentos analisados.

Parâmetros	Fragmentos amplificados				
	16S + ITS	<i>rpoC1</i>	<i>rbcLX</i>	<i>nifD</i>	<i>nifH</i>
Nº de Ciclos	24x	34x	34x	34x	34x ou 29x
Desnaturação	94°C, 45''	94°C, 45''	94°C, 45''	94°C, 45''	94°C, 45''
Anelamento	57°C, 1'	59°C, 1'	55°C, 30''	52°C, 1'	50°C, 1'
Extensão	68/72°C*, 2'	68°C, 1,5'	68°C, 2'	68°C, 1,5'	68°C, 1,5'
Extensão Final	68/72°C *, 7'	68°C, 7'	68°C, 7'	68°C, 7'	68°C, 7'

* Temperatura de extensão de 68°C quando utilizado a enzima *Super Taq Plus* polimerase.

3.6.4. Clonagem dos fragmentos gênicos

Dentre os marcadores analisados neste estudo (16S RNAr + ITS, *rpoC1*, *rbcLX*, *nifH* e *nifD*), a clonagem foi realizada apenas para o fragmento 16S RNAr + ITS de 21 linhagens. Os fragmentos gênicos de interesse foram ligados em vetor pGEM-T *Easy Vector Systems* (Promega, Madison, WI, USA), conforme instruções do fabricante. A introdução do vetor contendo o inserto nas células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes foi feita via transformação por choque térmico (Sambrook *et al.* 1989). As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (25 g/L) contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) e X-Gal (Life Technologies), ambos em concentrações finais de 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 h a 37°C e, posteriormente, cerca de cinco colônias de cor branca foram selecionadas para a reação de PCR. Esta reação é realizada a fim de confirmar se as colônias brancas selecionadas apresentam o inserto referente ao 16S RNAr de cianobactérias e não de bactérias heterotróficas. A confirmação foi realizada por meio da amplificação de fragmentos menores (aproximadamente 420 pb) do gene 16S RNAr, que correspondem a regiões conservadas deste locus em cianobactérias. Deste modo, uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 µL de reação de PCR contendo: tampão para a reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,25 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase, água ultrapura esterilizada e 5 pmol de cada iniciador: CYA359F (5'GGGGAATTTTCCGCAATGGG3'), CYA781aR (5'GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT3') e CYA781bR (5'GACTACA GGGGTATCTAATCCCTTT3') (Nübel *et al.* 1997). As condições para amplificação foram:

94°C/5 min; 35 ciclos de desnaturação à 94°C/1 min, anelamento à 63°C/1 min, extensão à 72°C/1 min; e extensão final 72°C/7 min. A verificação dos produtos de PCR e documentação do gel foi realizada conforme descrito no item 3.6.2.

3.6.5. Extração do DNA plasmidial

Primeiramente, as colônias de *E. coli* que continham o inserto de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio de cultura LB (25 g/L) contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e, incubadas por 14-16 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). Posteriormente, a extração de plasmídios foi realizada por meio do kit *Quantum Prep Plasmid Miniprep* (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante, ou pelo método de hidrólise alcalina (Birnboim & Doly 1979).

O método de hidrólise alcalina consistiu inicialmente na ressuspensão das células de *E. coli* concentradas em 100 µL de Solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, 200 µL da solução de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%) foi adicionado à mistura e as amostras permaneceram em gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min, e o sobrenadante transferido para um microtubo novo. A precipitação foi realizada com a adição de 270 µL de isopropanol e centrifugação a 15.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 250 µL de etanol 70%. Em seguida, o pélete foi seco e ressuspendido em 30 µL de água ultrapura contendo RNase (1,5 µg.mL⁻¹). As amostras foram incubadas a 37° por 30 min. O DNA plasmidial foi quantificado conforme descrito no item 2.2 e armazenado em -20 °C.

3.6.6. Sequenciamento

A preparação das amostras para o sequenciamento dos marcadores analisados foi realizada de maneiras distintas, de acordo com o centro de pesquisa no qual foi desenvolvida a análise. Em relação às análises realizadas no CENA/USP, as amostras foram enviadas para o sequenciamento após a reação de PCR com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), como descrito a seguir: para esta reação utilizou-se 200 ng de plasmídeos com fragmentos do marcador 16S RNAr + ITS, 1,5 µL de *BigDye*, tampão de reação 1X, água ultrapura para volume final de 10 µL e 5 µM de cada um dos seguintes iniciadores: M13F (5'GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'), M13R (5'GAGCGGATAACAATTCACACAGG3'), 357F (5'CCTACGGGAGGCAGCAG3'), 357R (5'CTGCTGCCTCCCGTAGG3'), 704F (5'GTAGSGGTGAAATSCGTAGA3'), 704R (5'TCTACGSATTCACCSCTAC3'), 1114F (5'GCAACGAGCGMRACCC3'), 1114R (5'GGGTYKCGCTCGTTGC3') (Lane 1991). As condições para amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 1 min; 25 ciclos de 95 °C/20 s, 50 °C/15 s, 60 °C/1 min. Após a amplificação foi

realizada a precipitação dos fragmentos conforme as instruções do kit *BigDye Terminator v3.1*. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao sequenciamento por meio do sequenciador capilar 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa *ABI PRISM® DNA Sequencing-Analysis Software* versão 3.7 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

No que se refere às análises desenvolvidas na Universidade de Liège, os plasmídios ou os produtos de PCR obtidos foram enviados ao laboratório responsável (*Genomics Facility*), juntamente com os iniciadores correspondentes de cada marcador. A reação de PCR para o sequenciamento a partir do *BigDye* foi realizada posteriormente por este departamento. Deste modo, as amostras foram preparadas conforme as seguintes instruções: os produtos de PCR ou as amostras contendo os plasmídios foram diluídos para uma determinada concentração variando de acordo com o tamanho do fragmento a ser sequenciado (Tabela 5). Após a diluição, alíquotas (10 μL / reação) foram separadas em microtubos e acrescidas do iniciador (5 μM / reação) de cada sequência a ser analisada.

No que se refere ao marcador 16S RNAr + ITS, foram utilizados os iniciadores internos 27F, 979F, 1092R, 1407F, 1492R e 23S30R. Em relação aos outros loci gênicos, os iniciadores foram os mesmos utilizados para a amplificação inicial dos fragmentos.

Tabela 5. Concentração do Produto de PCR ou plasmídeo requerido para o sequenciamento.

Produto de PCR	[] ng/ μl
100 – 200 bp	0,2 - 0,6
200 – 500 bp	0,6 - 2
500 – 1000 bp	1 - 4
1000 – 2000 bp	2 - 8
> 2000 bp	4 - 10
Plasmídeo	40 - 50

3.6.7. Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para checagem de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade ≤ 20) através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998, Ewing *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1998), em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com outras previamente depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.* 1990).

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências obtidas neste estudo e outras selecionadas nos bancos de dados públicos foram alinhadas (ClustalW) e editadas manualmente. Os métodos de inferência foram Neighbor Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), implementados a partir do pacote de programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011), e Inferência Bayesiana (IB), utilizando-se MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). O teste de modelos de análises filogenéticas foi aplicado no programa Topali 2.5 (Milne *et al.* 2008) a fim de se definir qual o melhor modelo evolutivo a ser aplicado para o conjunto de sequências analisadas. Os modelos utilizados para cada conjunto de sequências estão descritos nas legendas das árvores filogenéticas apresentadas. A porcentagem de identidade entre as sequências analisadas foi realizada pelo método “p-distance” no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

Em relação à inferência Bayesiana, os parâmetros para a construção da árvore filogenética foram fixados em duas corridas de 15.000.000 de gerações em quatro cadeias, com reamostragem a cada 1000 árvores. A qualidade das corridas foi avaliada pela convergência entre as corridas independentes usando o programa TRACER versão 1.5 (Rambaut & Drummond 2007), e os 10% iniciais da corrida foram descartados (*burn-in*). Posteriormente, a melhor topologia foi obtida através de consenso estrito.

A análise filogenética concatenada foi realizada sempre que possível a partir dos fragmentos gênicos concatenados: 16S RNAr, espaçador intergênico 16S-23S RNAr, *rpoC1* e *rbcLX*. Para todas as sequências que codificam proteínas, o índice de saturação foi verificado por meio do programa Dambe 5.3.4 (Xia & Xie 2001). Em relação aos marcadores *rpoC1* e *rbcLX*, foi verificado o frame correto de leitura por meio da ferramenta Translate do portal online ExPASy Bioinformatics Resources (Artimo *et al.* 2012).

3.7. Estrutura Secundária do Espaçador Intergênico 16S-23S RNAr

O espaçador intergênico 16S-23S RNAr foi analisado para determinação da estrutura secundária dos seguintes domínios conservados: hélice D1-D1', Box-B e V3. As estruturas foram determinadas após a identificação das sequências conservadas na base de cada hélice.

Após a identificação de cada fragmento, as estruturas foram desenvolvidas individualmente utilizando-se *Mfold Web Server* (Zuker 2003). Com exceção do parâmetro “structure draw mode” (*untangle with loop fix*), as condições padronizadas neste servidor foram utilizadas em todos os casos. As ilustrações apresentadas foram desenvolvidas a partir do programa *CorelDraw X7*. Ressalta-se que as estruturas secundárias foram determinadas, sempre que possível, a partir das sequências geradas neste estudo e aquelas retiradas do GenBank.

3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão (TEM), as células foram fixadas *overnight* com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), acrescido de 0,2 M de sacarose (Schmidt *et al.* 2009). O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% durante 4 h, desidratado em séries de gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e embebidos em resina de Spurr (Spurr 1969). Cortes finos foram corados com acetato de uranila aquoso seguido por citrato de chumbo. As amostras foram examinadas sob TEM JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) a 80 kV. Neste estudo, a análise foi realizada apenas para a linhagem CCIBt 3277 para visualização da posição dos tilacóides e aerótopos.

Ressalta-se que esta análise foi realizada no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, sob responsabilidade da Dra. Zenilda Laurita Bouzon e colaboração do pós-doutorando Eder Schmidt.

3.9. Estudos Químicos

Os estudos químicos envolveram a pesquisa química da cianotoxina β -metil-aminoalanina (BMAA) e a prospecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica de 17 linhagens. As análises foram realizadas no Laboratório de Química do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica de São Paulo, sob supervisão da Dra. Luciana Retz de Carvalho e colaboração dos alunos de iniciação científica Geanne Conserva e Jonathan Parajara Bento.

3.9.1. Multiplicação de biomassa

A produção de biomassa para os estudos químicos foi realizada a partir de 5 mL de inóculo de uma linhagem de cianobactéria uniespecífica. Este inóculo foi transferido para um erlenmeyer, cujo volume final foi de 50 mL de meio de cultivo. Após 1 a 2 semanas de crescimento, a biomassa resultante foi transferida novamente para novo cultivo de 500 mL. Após o crescimento da biomassa (cerca de 20 dias), o material foi transferido para erlenmeyer contendo 1 L de meio de cultivo e submetido à aeração constante por período de 1 a 2 semanas.

Os cultivos foram periodicamente examinados ao microscópio a fim de confirmar a inexistência de contaminação. O meio de cultura utilizado foi BG-11, uma vez que todas as linhagens analisadas foram isoladas e cultivadas neste meio. Além disso, o antibiótico cicloheximida (0,05 g/L) foi utilizado em todo o processo, a fim de evitar a contaminação por organismos eucariontes.

3.9.2. Extração de compostos e secagem dos extratos

Para cada linhagem estudada, a biomassa resultante foi congelada e posteriormente liofilizada. As células liofilizadas foram submetidas à extração (4x) com ácido acético 0,1 M (EAA) e metanol 100% (EM) por exposição a ultrassom (4 x 10 sec., 50 W). Em seguida, os extratos foram centrifugados e armazenados a -18 °C. Para a obtenção do extrato seco, as amostras extraídas em ácido acético foram liofilizadas e aquelas em metanol foram secas em *speedvac*. O extrato seco foi eluído nos mesmos solventes de extração e aplicados nas placas cromatográficas com capilar.

3.9.3. Prospecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica

A técnica de bioautografia com o fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum* Penzig foi empregada neste estudo. Amostras de EAA e EM de cada uma das linhagens foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com a fase móvel clorofórmio/metanol/água, 64:36:8, v/v/v. Após desenvolvimento da cromatografia e completa evaporação do solvente, as placas foram nebulizadas com a suspensão de esporos do fungo e incubadas em câmara úmida a 25°C, no escuro, por 48 h, segundo método de Homans & Fuchs (1970). Substâncias inibidoras formaram zonas de inibição claras contra o fundo escuro da placa cromatográfica.

3.9.4. Prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante

As placas de CCD, feitas a partir dos extratos a serem analisados, foram nebulizadas com uma solução metanólica (2mg.mL⁻¹) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), que permite detectar substâncias com atividade antioxidante. Essas substâncias apareceram como manchas amareladas sobre fundo violeta (Hostettmann *et al.* 2003). A mudança de coloração da solução de DPPH do violeta para o amarelo ocorre devido à transferência de elétrons ou átomos de hidrogênios de substâncias antioxidantes para o radical livre (Souza *et al.* 2007).

3.9.5. Prospecção de inibidores de acetilcolinesterase (Rhee *et al.* 2001)

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados segundo Marston *et al.* (2002): 200 µg.spot⁻¹ de cada amostra a ser analisada, juntamente com os controle positivo eserina (0.3 µg.spot⁻¹) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram submetidos à CCD, desenvolvida com a fase móvel clorofórmio/metanol/água, 64:36:8, v/v/v. Após o desenvolvimento, as placas foram secas, nebulizadas com solução enzimática (6.66 U/mL) e incubadas a 37 °C por 20 min. A atividade enzimática foi detectada pela nebulização de solução 0,25% de 1-naftil acetato em EtOH (5 mL) e 0,25% de solução aquosa do sal *Fast Blue B* (20 ml). Inibidores anticolinesterásicos apareceram como halo claro, sobre fundo púrpuro. Para preparar a solução enzimática, a acetilcolinesterase tipo V (Sigma Aldrich) foi dissolvida em solução tampão Tris HCl (pH 7,8) e estabilizada pela adição de albumina de soro bovino V (0,1%) (Sigma Aldrich).

3.9.6. Prospecção da cianotoxina β-metilaminoalanina (BMAA)

Para análise deste aminoácido, 10 µg de EAA liofilizado de cada linhagem analisada foi dissolvido em água deionizada e aplicado à placa cromatográfica de gel de sílica 60 F₂₅₄, juntamente com o padrão. O cromatograma foi desenvolvido em butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v) e posteriormente seco em corrente de ar. Após a secagem, o cromatograma foi derivatizado com ninidrina e aquecido a 110 °C, por 15 minutos. A solução de ninidrina foi preparada a partir dos reveladores A e B (1:1), de acordo com Merck (1971): para o revelador A, 0,3 mg de ninidrina foi dissolvida em 100 mL de n-butanol e posteriormente, acrescido 3 mL de ácido acético glacial. O revelador B consistiu em uma solução de 0,2% de ninidrina em etanol 98%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Linhagens Analisadas

Um total de 358 amostras foi coletado durante as expedições realizadas nas regiões da Mata Atlântica e do Pantanal brasileiro, como segue: 79 do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (12 aquáticas e 67 terrestres), 147 na Estação Ecológica Juréia-Itatins (8 aquáticas e 139 terrestres), 63 no Núcleo Santa Virgínia (apenas terrestres) e 69 nas sub-regiões do Pantanal (21 aquáticas e 48 terrestres). Ressalta-se que o grande número de amostras obtido deve-se ao fato das coletas terem sido direcionadas a amostragem de todos os grupos de cianobactérias (cocóides, homocitadas e heterocitadas), uma vez que diversos projetos de pesquisa estavam relacionados às expedições.

Após observação prévia de todo o material coletado, identificou-se que 32 amostras continham representantes do complexo *Phormidium* Kützing ex Gomont. A partir dessas amostras, 24 linhagens puderam ser isoladas em culturas monoespecíficas. Além disso, outras linhagens foram incluídas neste estudo a fim de complementar os resultados obtidos, como segue: duas cepas pertencentes à Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt 3162 e 3261) e quatro provenientes de outras instituições de pesquisa. Deste modo, o presente estudo envolveu a análise de 30 linhagens do complexo *Phormidium* (Tabelas 6 e 7). Ressalta-se que as amostras analisadas, pertencentes à CCIBt, foram incluídas no *Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Cyanobacteria* (BCCM/ULC), coordenado pela Dra. Annick Wilmotte, Universidade de Liège, Bélgica.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr (Figura 4), as linhagens analisadas apresentaram-se distribuídas em 10 clados distintos (Clados A-J). Neste tópico, os clados serão descritos e comentados separadamente de acordo com a ordem que aparecem na árvore filogenética. Uma vez o gene 16S RNAr é altamente conservado e permite a delimitação genérica (Fox *et al.* 1992, Boyer *et al.*, 2001, 2002), cada um dos clados analisados neste estudo podem representar gêneros distintos, dentre os quais diversos putativos novos táxons para a ciência.

A linhagem CCIBt 3469 não foi sequenciada em relação ao fragmento 16S RNAr + ITS, uma vez que a PCR sempre apresentou resultado negativo. Entretanto, os aspectos morfológicos serão apresentados e discutidos no tópico “Demais linhagens” (item 4.12). Neste tópico, também será discutida a linhagem CCIBt 3573 que se apresentou em um ramo isolado e distante dos demais clados analisados. Um artigo sobre o novo gênero *Trichocapitatum* foi enviado para publicação e está apresentado no item 4.5, de forma independente dos demais clados estudados, inclusive em relação à numeração das figuras e tabelas.

Tabela 6. Linhagens analisadas e os respectivos números de acessos às coleções de cultura.

CCIBt	BCCM/ULC	Local de Coleta	Habitat
3162	714	Represa Billings, SP	Aquático, reservatório de abastecimento
3261	715	Jardim Botânico, RS	Aquático, lagoa de água doce
3265	716	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3275	717	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3277	718	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3279	719	São Paulo, SP	Aquático, aquário de água doce
3280	720	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3281	721	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3309	722	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3322	723	Pantanal da Nhecolândia	Aquático, lagoa salina
3412	724	Santa Virgínia	Terrestre, brita
3446	725	Pantanal de Miranda	Terrestre, concreto
3447	726	Santa Virgínia	Terrestre, concreto
3448	727	Pantanal de Miranda	Terrestre, concreto
3449	728	Ilha do Cardoso	Aquático, rocha submersa
3465	729	Ilha do Cardoso	Aquático, tronco submerso e solo
3466	730	Pantanal de Miranda	Terrestre, concreto
3468	731	Pantanal de Miranda	Terrestre, concreto
3469	732	Ilha do Cardoso	Terrestre, solo seco
3523	733	São Paulo	Aquático, aquário de água doce
3524	734	Ilha do Cardoso	Terrestre, solo encharcado
3570	735	Juréia-Itatins	Terrestre, solo
3571	736	Juréia-Itatins	Aquático, rocha submersa
3572	737	Pantanal do Miranda	Aquático, baía
3573	738	Pantanal do Miranda	Terrestre, solo
3595	739	Pantanal do Miranda	Aquático, empoçado de água doce

Tabela 7. Linhagens externas à CCIBt incluídas no presente estudo e os respectivos números de acesso à coleção de cultura de origem.

Linhagens	Coleção de Cultura	Local de Coleta e Habitat
CCMA-UFSCAR 374	Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil	Pantanal da Nhecolândia (2010). Aquático, lagoa salitrada
CCALA 155*	“Culture Collection of Algae at the Laboratory of Algology”, República Checa	Espanha, Mallorca (1962). Ambiente Terrestre, sobre superfície de concreto
SAG 75.79*	“Culture Collection of Algae at Goettingen University”, Alemanha	Aquático, aquário de água doce (1966)
UTEX 1580	“Culture Collection of University of Texas at Austin”, Estados Unidos	

* Réplicas mantidas em coleções de culturas distintas.

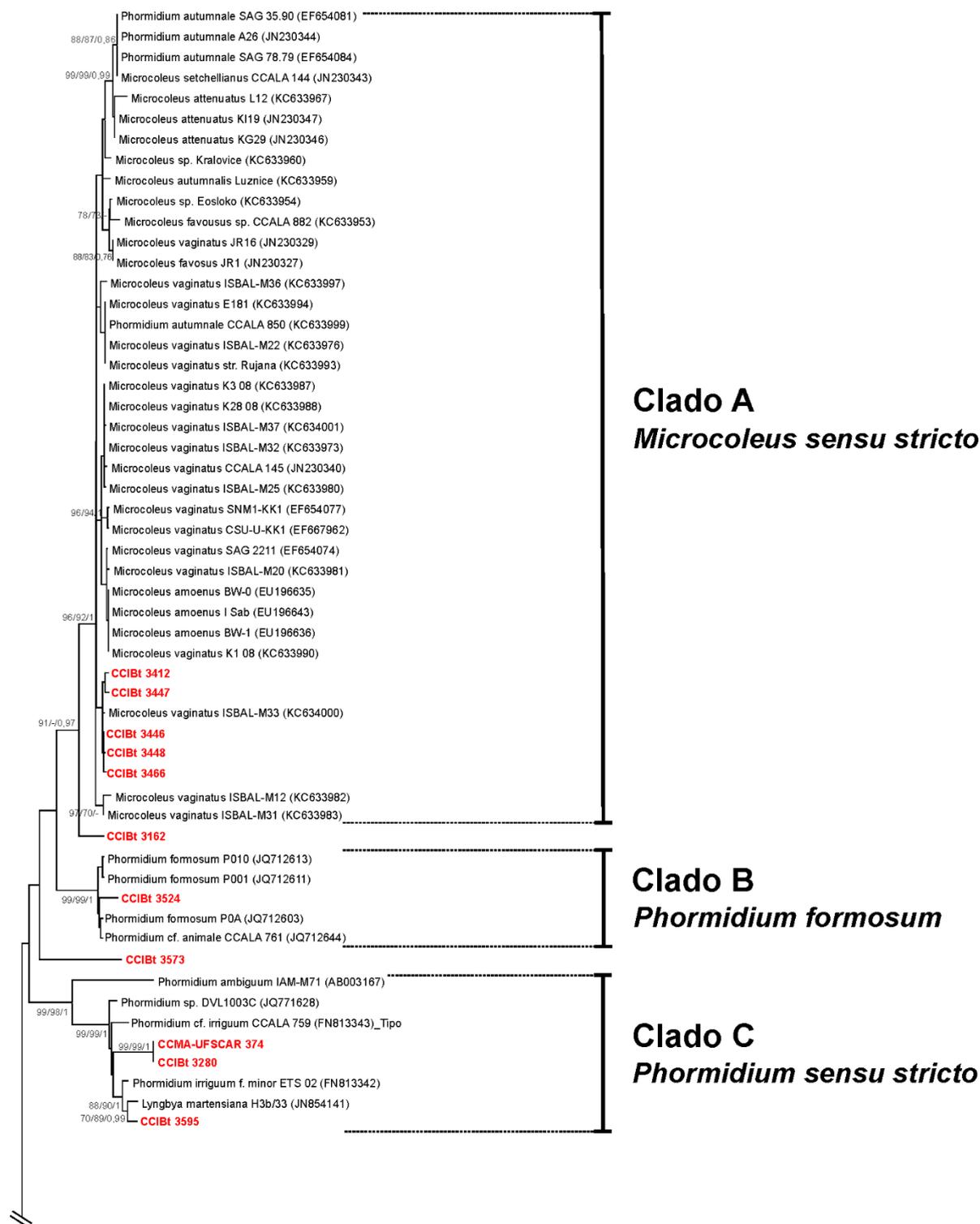
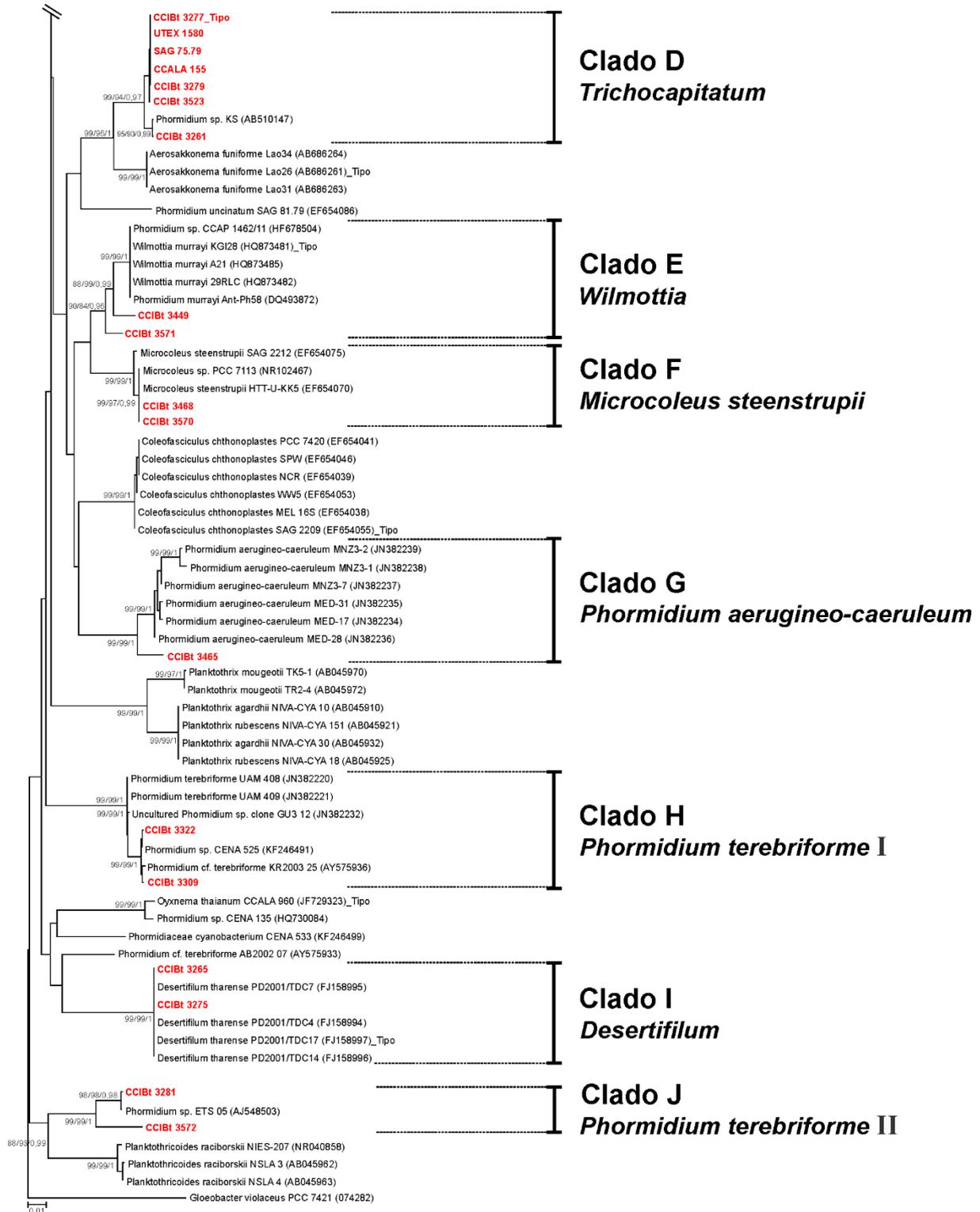


Figura 4. Análise filogenética do gene 16S RNAr (1014pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão destacadas em vermelho. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos. (-) indica reamostragem < 70% e < 0,7.

– Continuação Figura 4



4.2. *Microcoleus sensu stricto* (Clado A)

Dentre as linhagens analisadas neste estudo, algumas populações apresentaram morfologia relativamente homogênea e relacionada ao complexo *Phormidium autumnale* (atualmente pertencente a *Microcoleus*), tais como: CCIBt 3162 isolada a partir de material planctônico coletado na represa Billings, São Paulo; CCIBt 3412/3447 e CCIBt 3446/3448/3466 isoladas de ambientes terrestres da Mata Atlântica e do Pantanal brasileiro, respectivamente.

Microcoleus sp. 1

Prancha 1, Figuras 1-8 (CCIBt 3162)

Tricomas dispostos em feixes, retos, levemente atenuados e curvos na extremidade (duas últimas células), não constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa ausente. Células subquadráticas. Célula apical capitada e amplamente cônica, com caliptra cônico-arredondada ampla ou achatada. Conteúdo celular verde-azulado, homogêneo. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3162
Largura dos tricomas (μm)	
Cultura	6,1 – 7,3 (6,6)
Comprimento celular (μm)	
Cultura	2,8 – 3,3 (3,0)
Razão largura/comprimento	
Cultura	2,0 – 2,4 (2,2)

* Média entre parênteses

Material Analisado: São Paulo (SP), Represa Billings. **CCIBt 3162** (SP428.685) – Material coletado no plâncton.

Microcoleus sp. 2

Prancha 2, Figuras 1-12 (CCIBt 3412)

Prancha 3, Figuras 1-12 (CCIBt 3447)

Tricomas dispostos em feixes ou emaranhados, retos, gradualmente atenuados e curvos em direção ao ápice, não constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa ausente. Células subquadráticas

a isodiamétricas. Célula apical capitada, cilíndrico-arredondada, com caliptra cônico-arredondada, ampla ou achatada. Conteúdo celular castanho-escuro, finamente granular ou com grânulos conspícuos nos septos. Reprodução por hormogônios sigmóides formados a partir de necrídios (CCIBt 3412) ou por fragmentação do tricoma (CCIBt 3447).

Dimensões Celulares	CCIBt 3412	CCIBt 3447
Largura dos tricomas (μm)		
Cultura	5,2 - 6,6 (5,8)	6,6 - 8,7 (8,0)
Comprimento celular (μm)		
Cultura	4,1 - 6,3 (5,2)	4,6 - 6,3 (4,4)
Razão largura/comprimento		
Cultura	0,9 - 1,4 (1,1)	1,1 - 1,8 (1,5)

* Média entre parênteses

Material analisado: Parque Estadual da Serra do Mar (SP), Núcleo Santa Virgínia. **CCIBt 3412** (SP427.783) - Material terrestre encontrado sobre brita com colônias de *Nostoc* sp. **CCIBt 3447** (SP427.786) - Material coletado sobre concreto (úmido).

***Microcoleus* sp. 3**

Prancha 4, Figuras 1-12 (CCIBt 3446)

Prancha 5, Figuras 1-13 (CCIBt 3448)

Prancha 6, Figuras 1-8 (CCIBt 3466)

Filamentos dispostos em feixes ou emaranhados. Tricomas retos, brevemente atenuados e levemente curvos em direção ao ápice, não constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa hialina, firme e estreita. Células subquadráticas. Célula apical capitada, com caliptra arredondada a levemente cônico-arredondada, às vezes achatada. Conteúdo celular castanho-escuro, com grânulos nos septos. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios presentes no ápice e na região central do tricoma.

Dimensões Celulares	CCIBt 3446	CCIBt 3448	CCIBt 3466
Largura dos tricomas (μm)			
Natureza	5,3 - 6,9 (6,3)	6,5 - 7,6 (7,1)	-
Cultura	6,6 - 7,7 (7,1)	5,9 - 6,9 (6,4)	5,7 - 7,3 (6,6)
Comprimento celular (μm)			
Natureza	2,9 - 3,9 (3,4)	3,3 - 4,4 (4,0)	-
Cultura	2,8 - 3,9 (3,4)	2,8 - 4,0 (3,4)	2,6 - 3,6 (3,0)
Razão largura/comprimento			
Natureza	1,5-2,1 (1,8)	1,6-2,1 (1,8)	-
Cultura	1,9-2,5 (2,1)	1,6-2,2 (1,9)	2,0 - 2,4 (2,2)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Corumbá (MS), Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **CCIBt 3446** (SP427.784, SP427.785), **CCIBt 3448** (SP427.787, SP427.788), **CCIBt 3466** (SP427.930) – Materiais formando massas sobre superfícies de concreto.

De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), espécies do gênero *Phormidium* classificadas no grupo morfológico VII (células \pm isodiamétricas, tricomas breve ou gradualmente atenuados e presença de caliptra) pertencem a um complexo único designado *Phormidium autumnale sensu lato*. Este complexo de espécies é amplamente distribuído, sendo encontrado em ambientes aquáticos e terrestres, como riachos de água doce, margens de cachoeiras, rios e lagos, nascentes, rochas úmidas, solos, paredes e concretos (Komárek Anagnostidis 2005, Strunecký *et al.* 2012). Além disso, estes organismos são capazes de sobreviver em condições adversas em longo prazo, colonizando ambientes extremos, tais como regiões árticas, desérticas, lagos salinos, alcalinos e fontes termais (Harel *et al.* 2004, Seckbach 2007, Malone *et al.* 2012).

As linhagens terrestres (CCIBt 3412, 3446, 3447, 3448 e 3466) e aquática (CCIBt 3162) analisadas neste estudo apresentaram aspectos morfológicos relacionados à *P. autumnale sensu lato*, tais como: tricomas cilíndricos, curvos no ápice, brevemente ou gradualmente atenuados, células subquadráticas a isodiamétricas, célula apical capitada e com caliptra. Entretanto, a morfologia do tricoma apresentada por *P. autumnale sensu lato* é similar à *Microcoleus vaginatus* Gomont, espécie tipo do gênero *Microcoleus* Gomont. De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), ambos os gêneros diferenciam-se em relação à organização do filamento:

Microcoleus apresenta vários tricomas por bainha, ao contrário de *Phormidium* que possui apenas um.

Deste modo, a morfologia do tricoma é o aspecto morfológico diacrítico que corrobora a classificação de *Phormidium autumnale sensu lato* e *Microcoleus vaginatus* em uma única entidade genérica, como indicado por diversos estudos filogenéticos desenvolvidos com este grupo de organismos (Boyer *et al.* 2002, Palinska & Marquardt 2008, Siegesmund *et al.* 2008, Strunecký *et al.* 2010, 2012a, b e Hašler *et al.* 2012). Além disso, uma inserção de 11 pares de bases na hélice H17 do gene 16S RNAr, atribuída como diagnóstico de *M. vaginatus*, têm sido repetidamente relatada em linhagens de *P. autumnale sensu lato* (Garcia-Pichel *et al.* 2001, Boyer *et al.* 2002, Hašler *et al.* 2012).

Neste contexto, Strunecký *et al.* (2013) propuseram a transferência de 14 espécies de *Phormidium autumnale sensu lato* para *Microcoleus*. De acordo com estes autores, apenas as espécies tradicionais do complexo *Phormidium autumnale*, que continham aspectos morfológicos bem caracterizados e estritamente relacionados à *Microcoleus vaginatus*, foram incluídas neste gênero.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, a linhagem CCIBt 3162 (ambiente aquático) apresentou-se em um ramo isolado, irmão do clado *Microcoleus sensu stricto* (Figura 5, Clado A). Apesar da alta identidade (acima de 97%) com *Microcoleus*, até o momento não foi possível classificar esta linhagem a partir dos dados moleculares obtidos. A análise de maior número de linhagens torna-se necessária a fim de definir precisamente a posição filogenética deste táxon. Ressalta-se que a inserção de 11 pares de bases na hélice H17 do gene 16S RNAr não foi observada nesta linhagem. Entretanto, essa inserção foi encontrada em 78% das linhagens do clado de *Microcoleus sensu stricto*. Deste modo, considera-se que a presença ou ausência desta inserção deve ser mais bem avaliada, a fim de determinar o seu real valor taxonômico. Além disso, acredita-se que o hábito desta linhagem não determinou sua posição filogenética, uma vez que o clado *Microcoleus sensu stricto* apresenta táxons tanto de ambientes aquáticos como terrestres. Morfologicamente, a linhagem CCIBt 3162 diferiu das populações terrestres analisadas por apresentar tricomas levemente atenuados e curvos na extremidade (apenas nas duas últimas células) (Prancha 1, figura 6) e célula apical amplamente cônica (Prancha 1, figura 4).

As linhagens terrestres analisadas (CCIBt 3412, 3446, 3447, 3448 e 3466) pertencem ao clado *Microcoleus sensu stricto* (Figura 5, Clado A), juntamente com *M. vaginatus* e *Phormidium autumnale sensu lato* (*Microcoelus autumnalis*, *M. amoenus*, *M. stehellianus*, *M. attenuatus*, *M. favosus*). Todas as linhagens incluídas neste clado apresentaram identidade acima de 98%. Além disso, a inserção de 11 pares de bases na hélice H17 do gene 16S RNAr

foi observada nas 5 linhagens estudadas. Assim como em outros gêneros propostos a partir de *Phormidium* (*Phormidesmis*, *Oxynema*, *Wilmottia*), os critérios morfológicos corroboraram os padrões evolutivos observados.

O clado *Microcoleus sensu stricto* apresentou diversos grupos internos, distinguindo os táxons analisados em um subclado isolado (Figura 5, subclado I) com a linhagem africana *M. vaginatus* ISBAL-M33. As linhagens do Pantanal (CCIBt 3446, 3447 e 3448) e da Mata Atlântica (CCIBt3412 e 3447) formaram grupos distintos, distante dos demais subclados de *Microcoleus vaginatus* e *Phormidium autumnale sensu lato* (*Microcoleus autumnalis*, *M. attenuatus*, *M. setchellianus*, *M. favosus*).

Deste modo, a análise filogenética do gene 16S RNAr indicou uma potencial diversidade em *Microcoleus sensu stricto*. Entretanto, este marcador apresenta alto grau de conservação e não permite a delimitação interespecífica (Fox *et al.* 1992, Boyer *et al.*, 2001, 2002). Assim, durante este estudo foram avaliados outros loci gênicos (*rpoC1* e *rbcLX*), além do espaçador intergênico 16S-23S rRNA a fim de definir a correta classificação taxonômica das linhagens analisadas no clado de *Microcoleus sensu stricto*. CCIBt 3162 não foi incluída neste estudo, uma vez que apresentou-se totalmente distinta das linhagens do clado A.

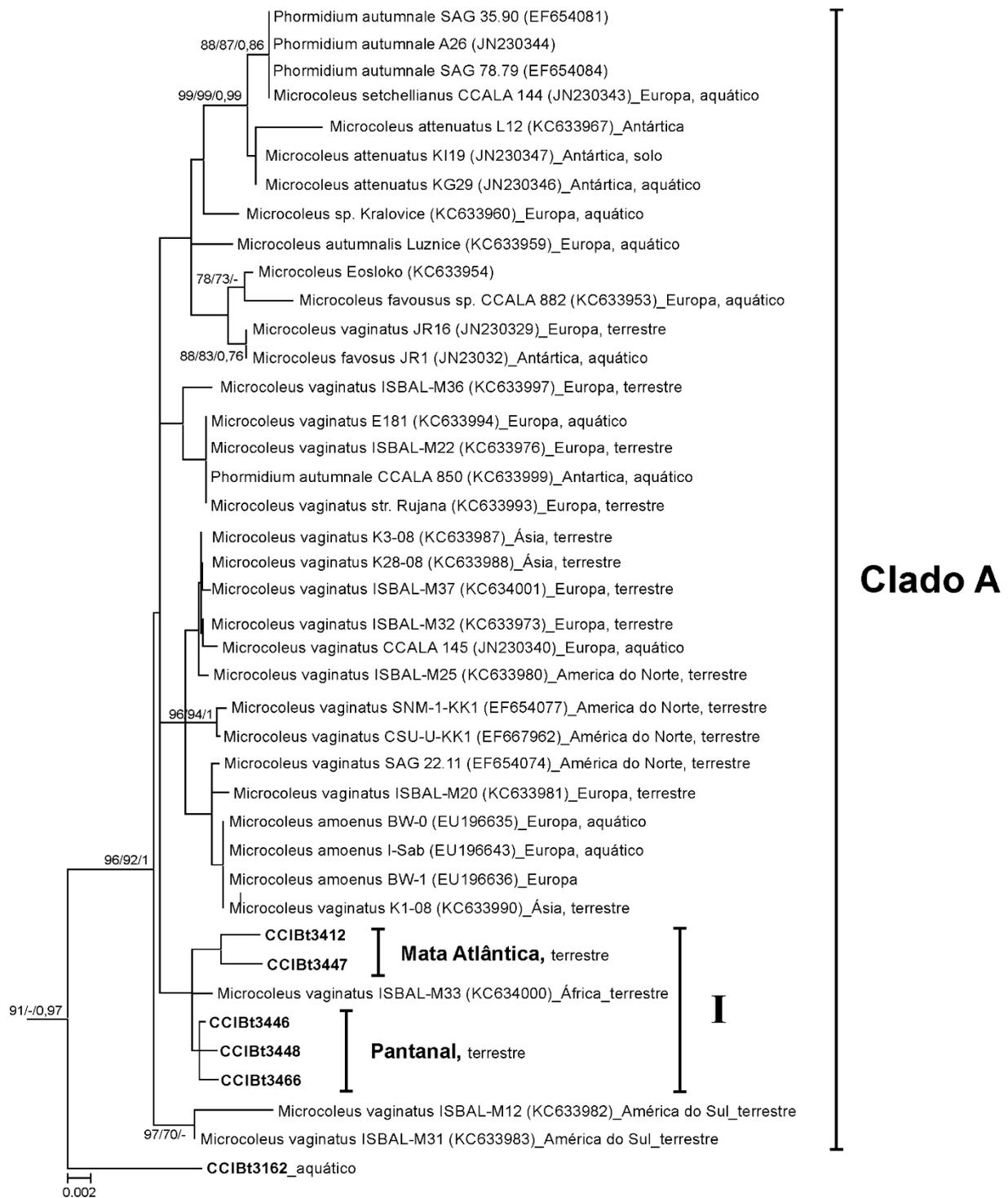


Figura 5. Detalhe do clado *Microcoleus sensu stricto* (**Clado A**) com base na análise filogenética do gene 16S RNAr (1014pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos. (-) indica reamostragem < 70% e < 0,7.

Tabela 8. Identidade (%) entre as sequências de 16S RNAr das linhagens analisadas outras retiradas do GenBank.

Cyanobacteria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. CCIBt 3412	–															
2. CCIBt 3446	99,6	–														
3. CCIBt 3447	99,6	99,8	–													
4. CCIBt 3448	99,5	99,9	99,7	–												
5. CCIBt 3466	99,5	99,9	99,7	99,8	–											
6. CCIBt 3162	97,4	97,5	97,7	97,4	97,4	–										
7. <i>Microcoleus vaginatus</i> ISBAL-M33	99,6	99,8	99,6	99,7	99,7	97,4	–									
8. <i>Microcoleus vaginatus</i> ISBAL-M12	99,0	99,0	99,0	98,9	98,9	97,5	99,0	–								
9. <i>Microcoleus vaginatus</i> ISBAL-M31	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	98,0	99,4	99,5	–							
10. <i>Microcoleus vaginatus</i> SAG 2211	99,5	99,7	99,7	99,6	99,6	97,6	99,5	99,1	99,5	–						
11. <i>Microcoleus autumnalis</i> Luznice	99,2	99,4	99,2	99,3	99,3	97,3	99,4	98,9	99,4	99,3	–					
12. <i>Microcoleus amoenus</i> BW-1	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	97,5	99,7	99,1	99,5	99,8	99,3	–				
13. <i>Microcoleus setchellianus</i> CCALA 144	98,3	98,3	98,3	98,2	98,2	97,4	98,5	98,4	98,9	98,6	99,0	98,8	–			
14. <i>Microcoleus favosus</i> CCALA 882	98,5	98,5	98,7	98,4	98,4	96,7	98,5	98,1	98,5	98,8	98,8	98,8	98,1	–		
15. <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> SAG 2209	92,8	92,8	92,9	92,7	92,9	92,8	92,9	92,8	93,2	92,9	93,0	92,6	92,6	92,2	–	
16. <i>Phormidium</i> cf. <i>irriguum</i> CCALA 759	92,8	92,9	93,0	92,9	92,9	93,0	92,8	92,9	93,3	92,9	92,9	93,0	92,7	92,0	91,3	–

Com base na análise filogenética do espaçador intergênico 16S-23S RNAr, as linhagens CCIBt 3446, 3448 e 3466, isoladas no Pantanal, formaram um clado bem definido (Figura 6, clado I). Este clado apresentou alto suporte filogenético a partir dos métodos evolutivos empregados: 99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior. Morfologicamente, estas linhagens foram consideradas como um mesmo táxon, corroborando os padrões evolutivos observados.

Por outro lado, as linhagens CCIBt 3412 e 3447, classificadas morfologicamente como uma mesma espécie, apresentaram-se em clados distintos nesta análise. A linhagem CCIBt 3412 formou um clado com *Microcoleus vaginatus* SNM1-KK1 (Figura 6, clado II), enquanto CCIBt 3447 apresentou-se em um ramo isolado, irmão do clado I.

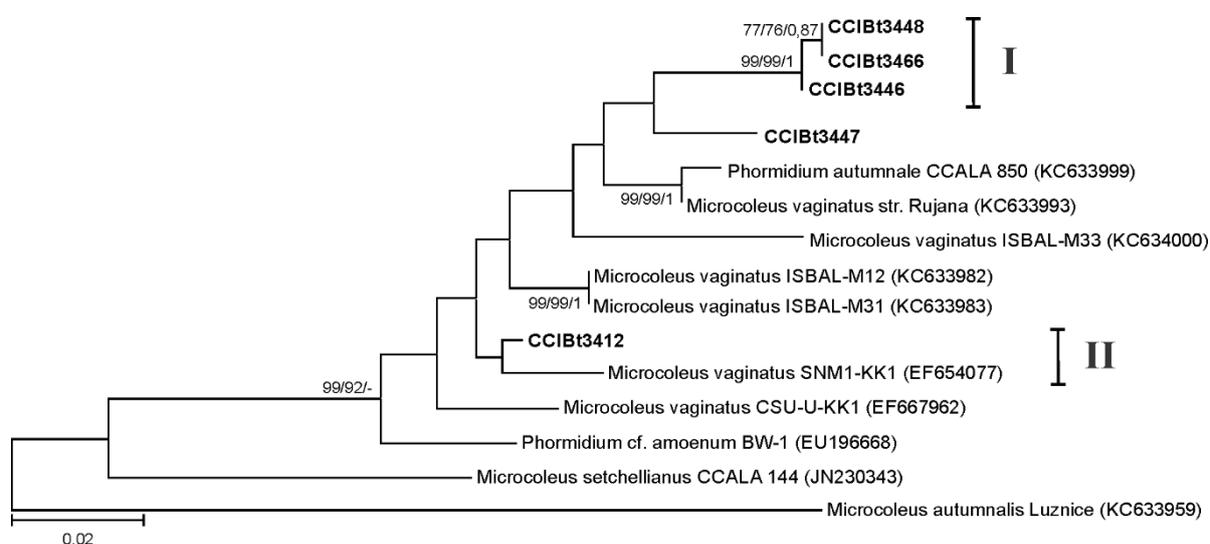


Figura 6. Análise filogenética do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (589pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G, 1000x). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos. (-) indica reamostragem < 0,7%.

Os mesmos padrões evolutivos foram observados a partir da análise filogenética de genes concatenados (16S RNAr, *rpoC1*, *rbcLX* e o ITS 16S-23S) (Figura 7) e da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (Figuras 8 e 9).

Em relação a análise de genes concatenados, a reconstrução filogenética foi realizada apenas com as linhagens estudadas, pois não há sequências de *Microcoleus* nos bancos públicos referentes a outros marcadores moleculares. As diversas linhagens de *Microcoleus* disponíveis no GenBank não apresentaram o espaçador intergênico sequenciado completamente. A maioria das sequências não possuem as regiões correspondentes ao Box B, Box A, V4 e V3, não sendo

passíveis de comparação. Porém, todas as linhagens analisadas (Figuras 8 e 9) apresentaram os dois RNA transportadores (RNA^t_{Ile} e RNA^t_{Ala}).

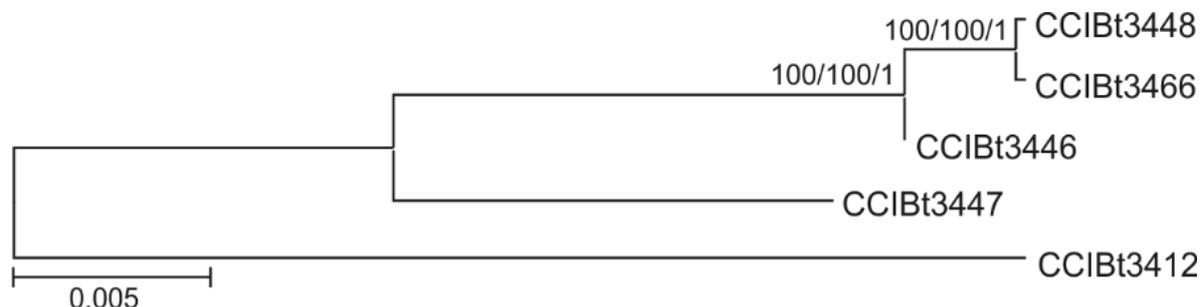


Figura 7. Análise filogenética dos fragmentos gênicos 16S RNAr + ITS, *rbcLX* e *rpoC1* concatenados pelo método de Máxima Verossimilhança (Hasegawa-Kishino-Yano, 1000x). Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Em relação às linhagens CCIBt 3446, 3448 e 3466, as estruturas secundárias da região D1D1' foram idênticas (Figura 8, a, b e c), distinguindo-as das demais linhagens analisadas e de *Microcoleus sensu stricto*. O mesmo foi observado para hélices correspondentes ao Box A (Figura 9, a-j) e V3 (Figura 9, k-r). Deste modo, com base em todos os dados apresentados, conclui-se que estas linhagens pertencem a um mesmo táxon e devem ser consideradas como uma nova espécie de *Microcoleus*.

A linhagem CCIBt 3447, apresentou estruturas secundárias das regiões D1D1', Box B e V3 distintas das demais linhagens incluídas no clado *Microcoleus sensu stricto* (Clado A, Figura 5). Estes resultados corroboraram os padrões evolutivos observados em todas as análises realizadas (16S RNAr, ITS 16S-23S e genes concatenados) indicando que esta linhagem também deve ser descrita como uma nova espécie de *Microcoleus*.

A linhagem CCIBt 3412 apresentou estrutura secundária da região D1D1' idêntica a *Microcoleus vaginatus* SNM1-KK1 (Figura 8, d e j). No que se refere ao Box B, a estrutura secundária foi semelhante à *Microcoleus amoenus* BW-1, apresentando apenas 1 nucleotídeo divergente no loop intermediário da hélice (Figura 9, e e h). Em relação ao V3, todas as estruturas passíveis de comparação apresentaram-se distintas da linhagem CCIBt 3412 (Figura 9, k-r). Morfologicamente, esta linhagem está relacionada à *M. amoenus*, diferindo apenas em relação aos aspectos ambientais.

Considerando todos os resultados obtidos, é possível concluir que a classificação taxonômica da linhagem CCIBt 3412 deverá ser confirmada após a delimitação filogenética das espécies *M. vaginatus* e *M. amoenus*. De acordo com Strunecký *et al.* (2013), *M. vaginatus* pode ser considerada como uma espécie polifilética e está estritamente relacionada à *M. amoenus*. As análises filogenéticas do gene 16S RNAr e do espaçador intergênico 16S-23S RNAr realizadas no presente estudo corroboraram os resultados descritos por estes autores. Em ambas as análises, linhagens de *Microcoleus vaginatus* apresentaram-se distribuídas em subclados distintos, confirmando seu caráter polifilético. A partir da análise filogenética do gene 16S RNAr, observou-se que linhagens descritas como *M. amoenus* formaram suclados com *M. vaginatus*. Neste contexto, ressalta-se que apenas uma linhagem de *M. amoenus* apresenta outra região gênica (ITS 16S-23S RNAr) sequenciada, não sendo possível estabelecer a relação interespecífica destes táxons e, conseqüentemente sua correta classificação taxonômica. Como citado anteriormente, o gene 16S RNAr não permite tal proposição.

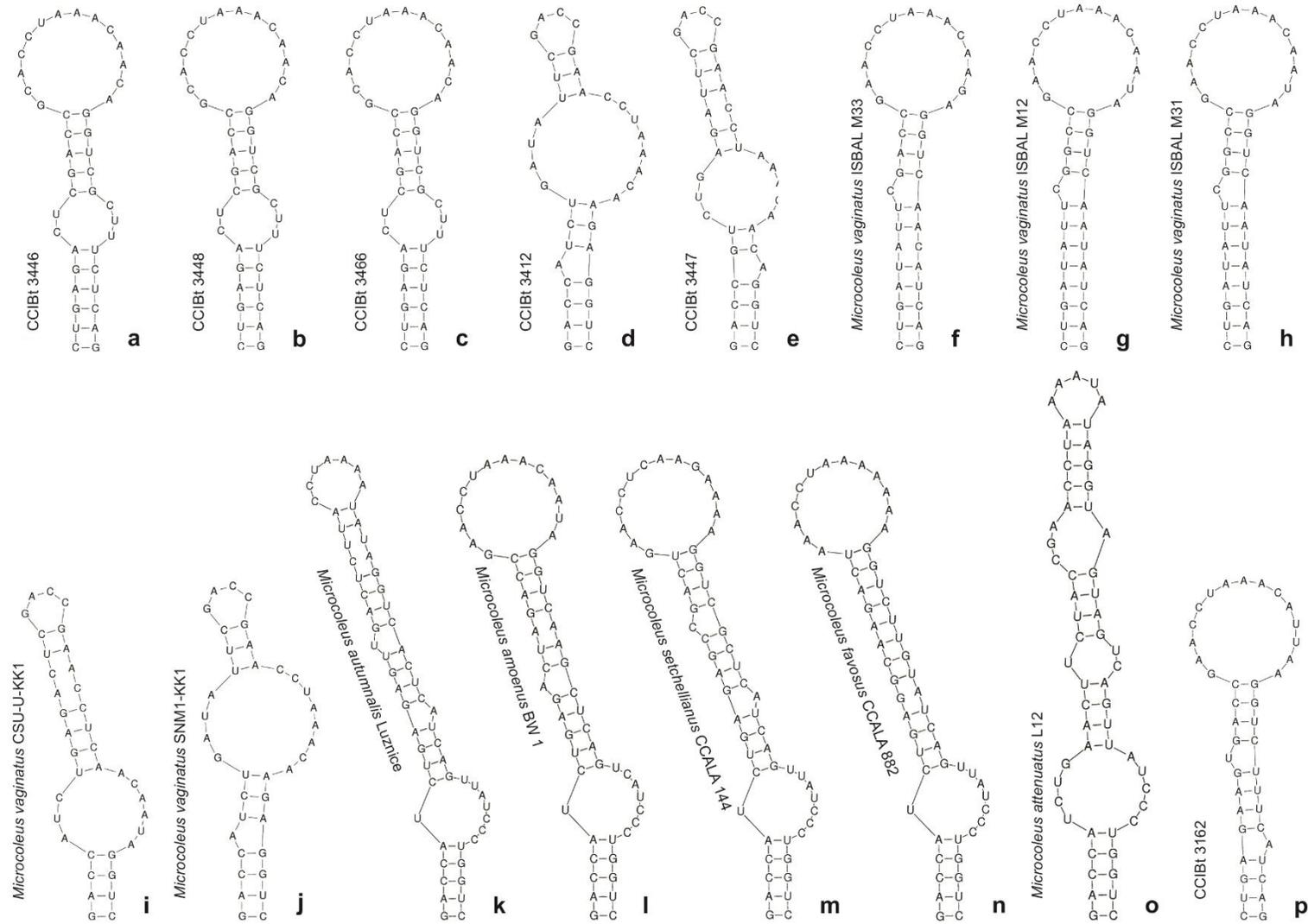


Figura 8. Estrutura secundária da região D1-D1' do espaçador intergênico 16S-23S RNAr.

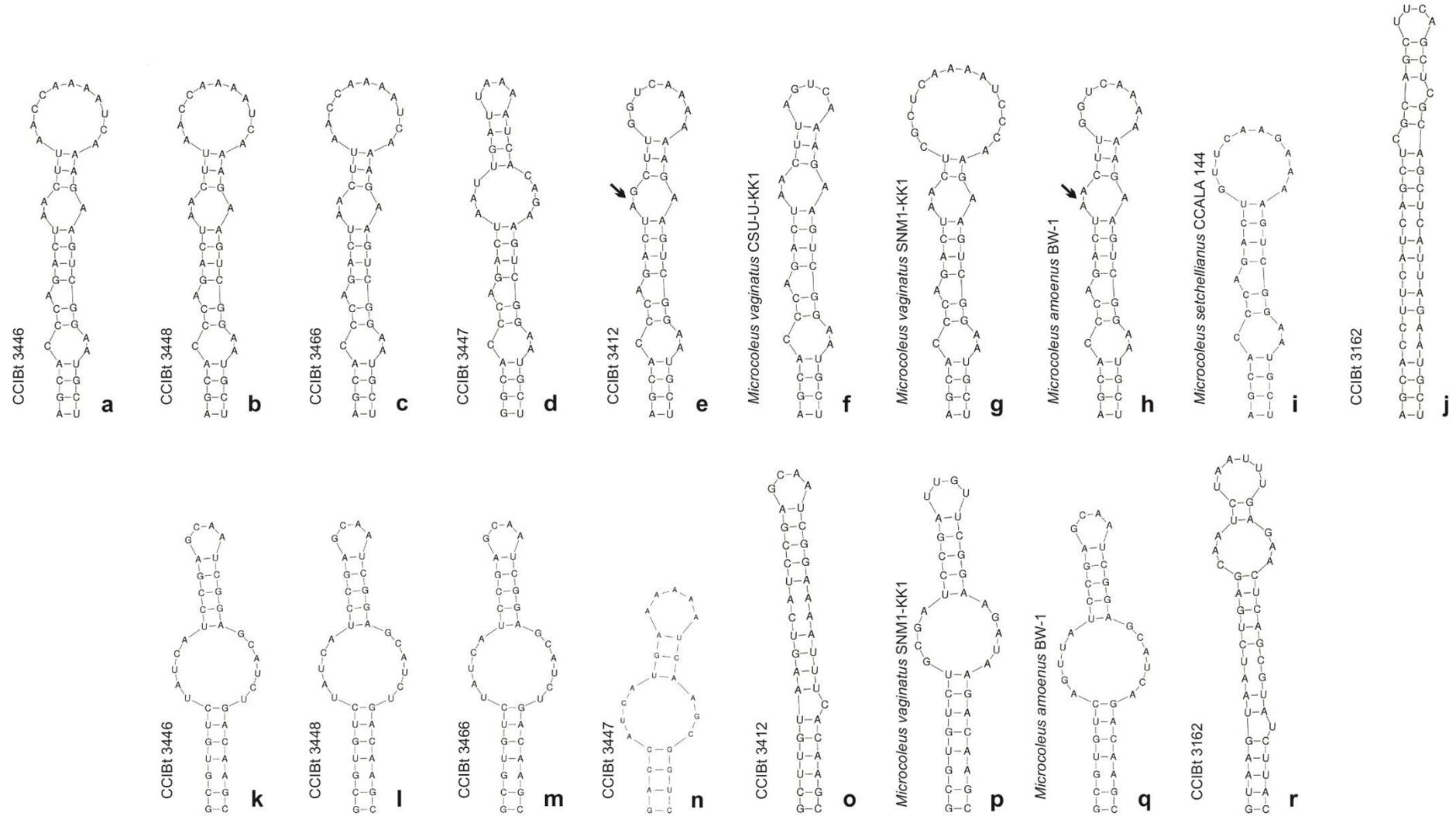
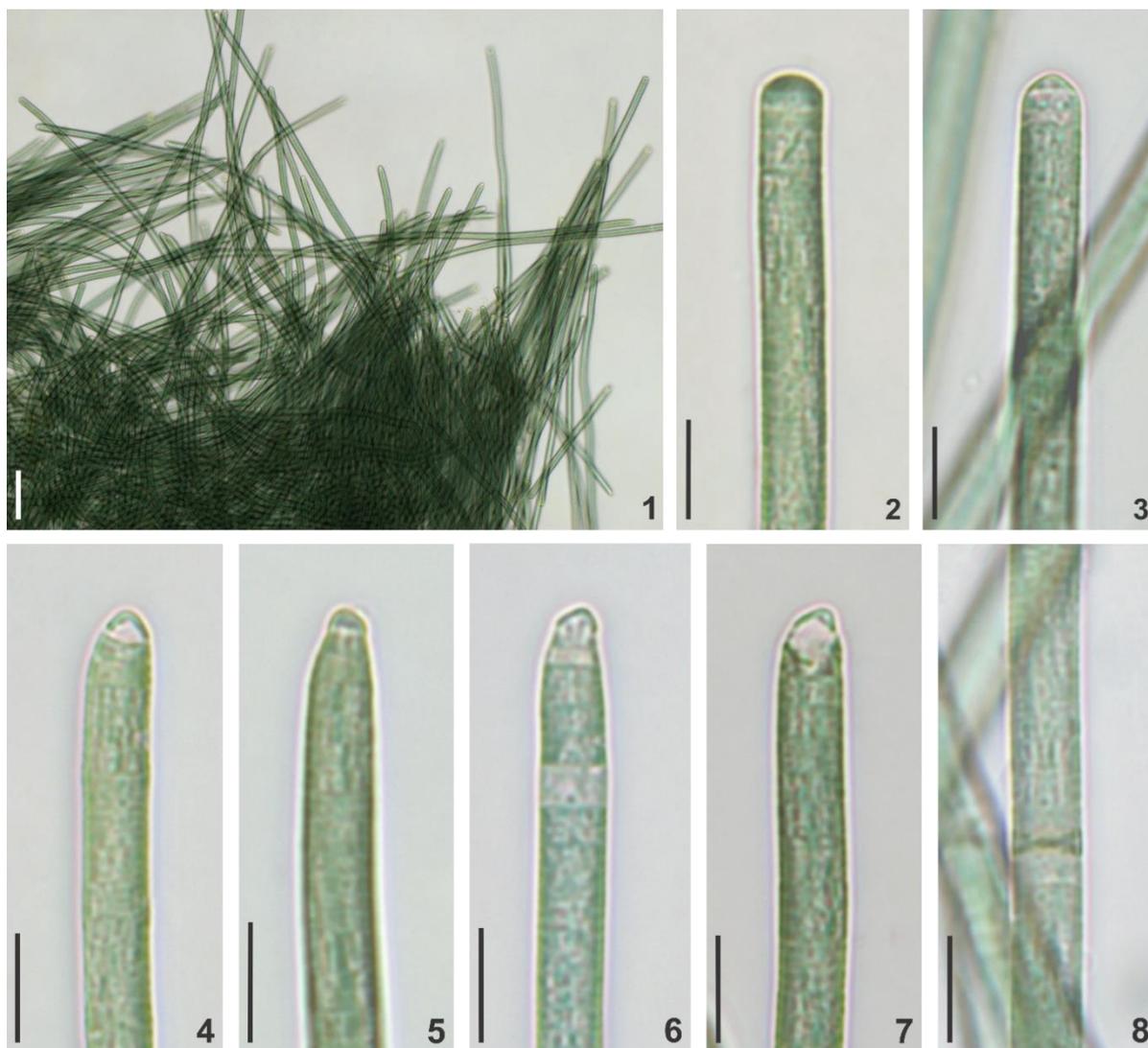
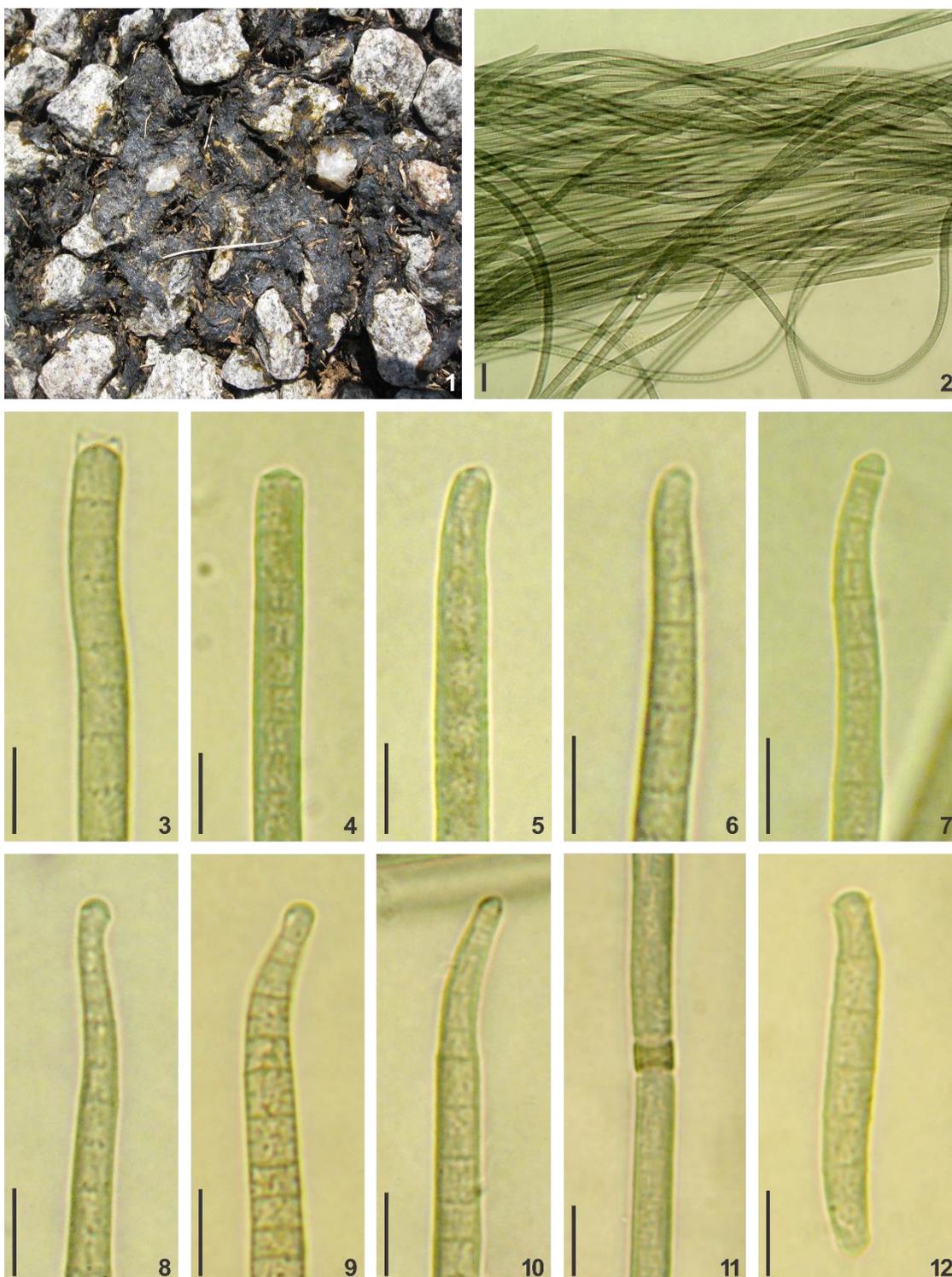


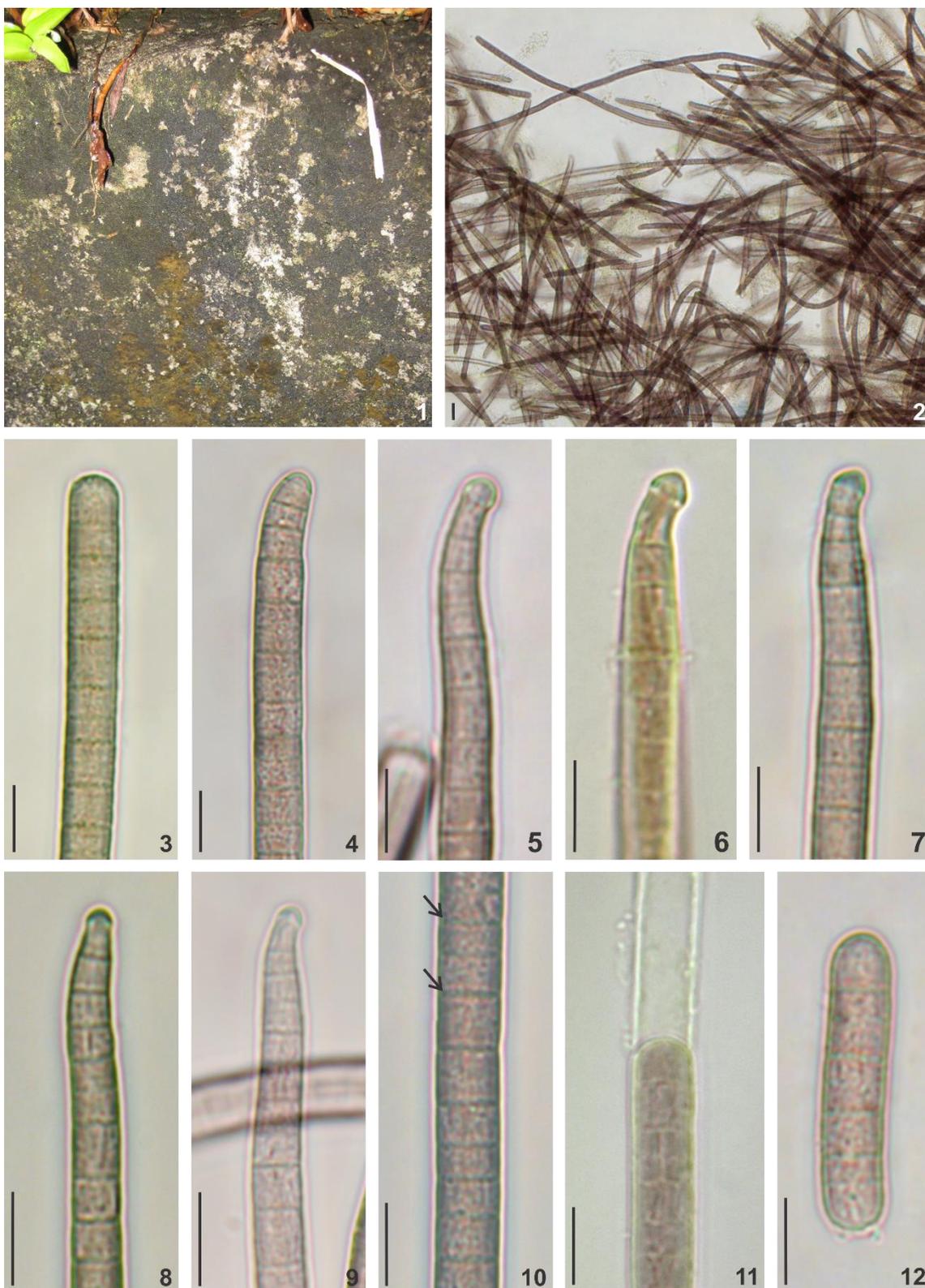
Figura 9. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S rRNA. **a-j.** Região Box B (setas indicam nucleotídeos divergentes entre as linhagens CCIBt 3412 e *Microcoelus amoenus* BW-1); **k-r.** Região V3.



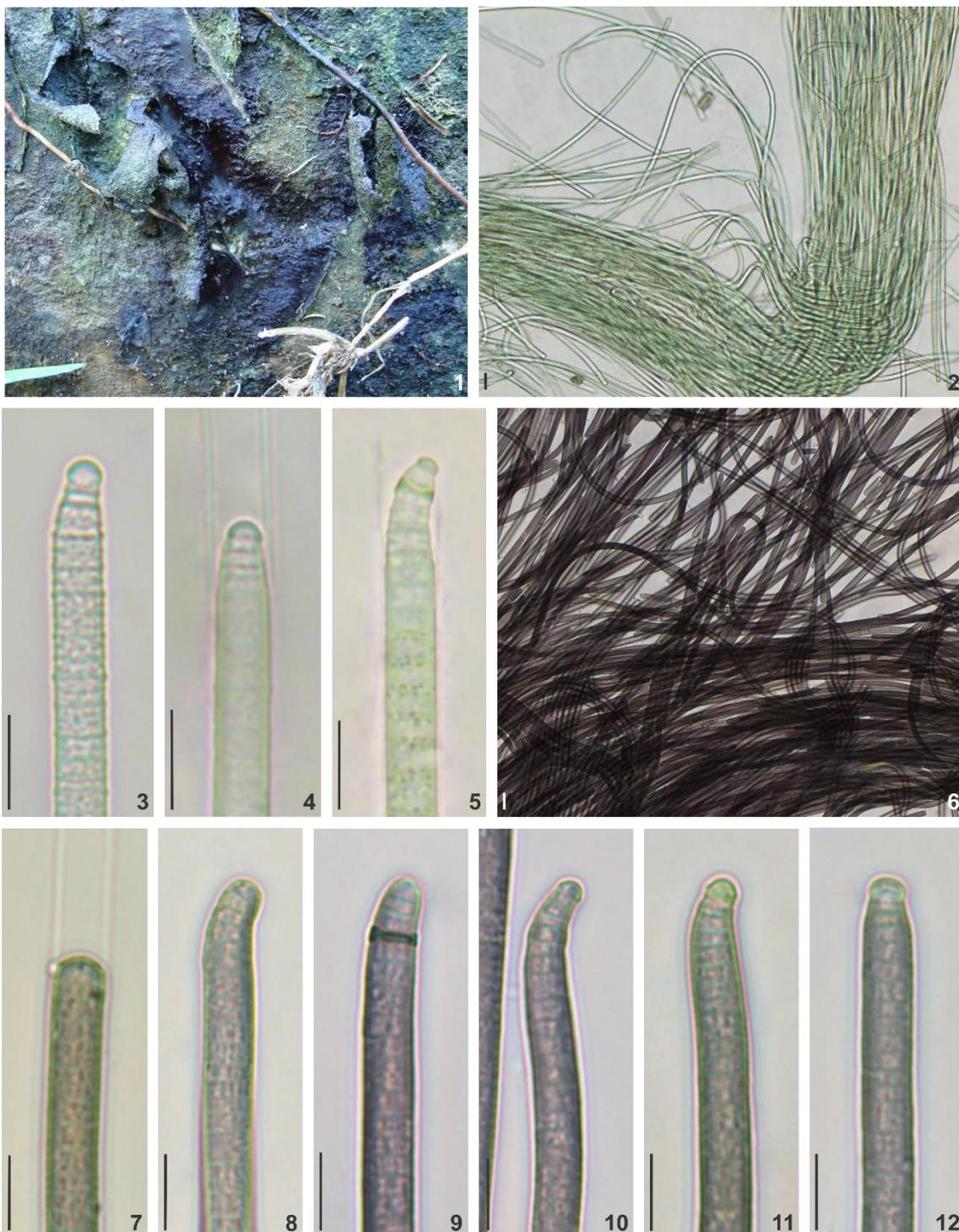
Prancha 1, Figuras 1-8. CCIBt 3162, *Microcoleus* sp. 1. (Material em Cultura): 1. Tricomas dispostos paralelamente em feixes; 2-7. Desenvolvimento da célula apical: 2. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 3. Célula apical cônica, em formação; 4. Célula apical amplamente cônica com caliptra cônico-arredondada achatada; 5. Célula apical capitada; 6. Tricoma levemente atenuado e curvo na extremidade (duas últimas células); 7. Detalhe da caliptra cônico-arredondada ampla; 8. Necrídio. Escalas 10 µm, exceto figura 1= 50 µm.



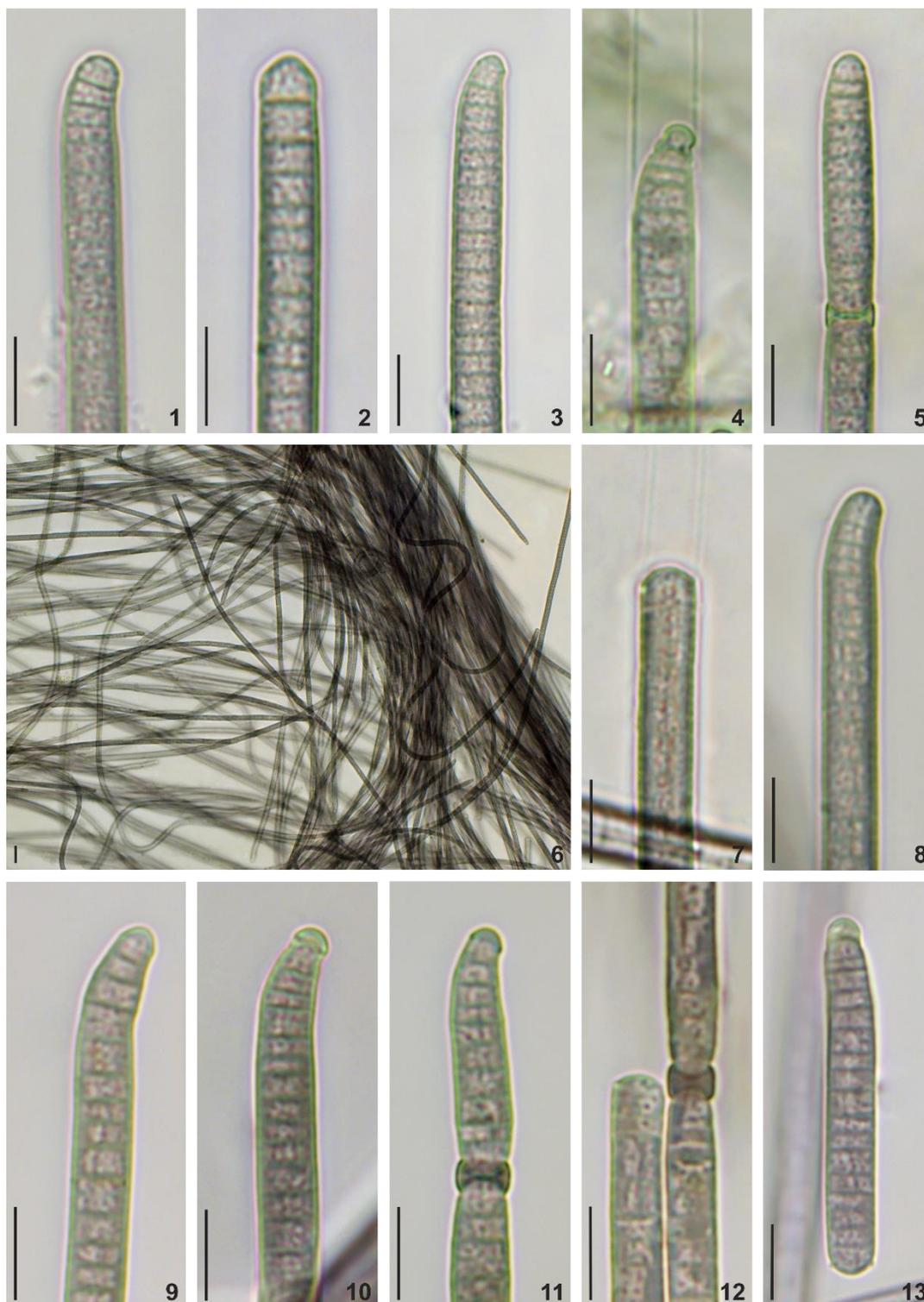
Prancha 2, Figuras 1-12. CCIBt 3412, *Microcoleus* sp. 2: 1. Material da Natureza: Colônias de *Nostoc* sp. sobre brita na qual esta espécie foi encontrada; 2-10. Material em cultura: 2. Tricomas dispostos em feixes; 3-9. Desenvolvimento da célula apical: 3. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 4. Célula apical com caliptra cônica em formação; 5-6. Início da atenuação do tricoma; 7. Célula apical com caliptra cônico-arredondada ampla; 8. Tricoma gradualmente atenuado e detalhe da caliptra cônico-arredondada achatada. 9. Célula apical cilíndrico-arredondada; 10. Tricoma abruptamente atenuado; 11. Necrídios; 12. Hormogônio sigmóide. Escalas 10 µm, exceto figura 2= 20 µm.



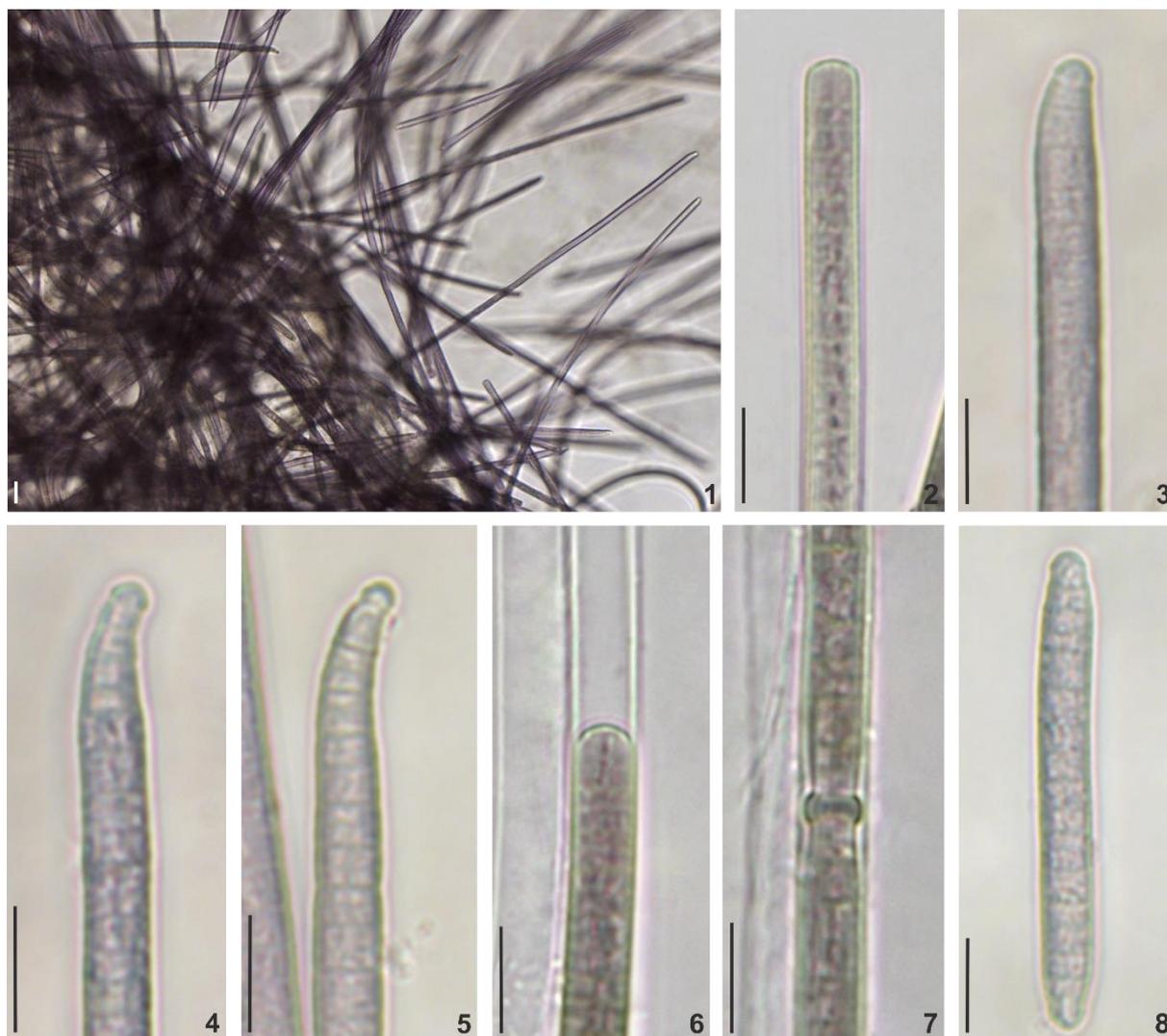
Prancha 3, Figuras 1-12. CCIBt 3447, *Microcoleus* sp. 2: 1. Material da Natureza: Massa sobre concreto no qual a população foi encontrada; 2-12. Material em cultura: 2. Tricomas emaranhados; 3-9: Desenvolvimento da célula apical: 3. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 4. Tricoma brevemente atenuado e curvo na extremidade; 5. Célula apical capitada; 6-7. Detalhe da caliptra cônico-arredondada ampla; 8-9. Detalhe da caliptra cônico-arredondada achatada; 10. Detalhe dos grânulos nos septos; 11. Bainha mucilaginosa; 12. Hormogônio. Escalas 10 μm , exceto figura 2= 20 μm .



Prancha 4, Figuras 1-12. CCIBt 3446, *Microcoleus* sp. 3: 1-5. Material da Natureza: Aspecto do material coletado sobre concreto; 2. Tricomas dispostos em feixes; 3-5. Variação morfológica da célula apical: 3. Célula apical capitada; 4. Bainha mucilaginosa e célula apical com caliptra cônico-arredondada; 5. Tricoma levemente curvo/atenuado e necrídio na porção terminal do tricoma; **6-12. Material em Cultura:** 6. Tricomas dispostos em feixes; 7-12. Desenvolvimento da célula apical: 7. Célula com ápice arredondado e bainha mucilaginosa; 8. Tricoma curvo na extremidade; 9. Necrídio na porção terminal do tricoma; 10. Tricoma curvo/atenuado na extremidade e célula apical capitada; 11. Detalhe da caliptra cônico-arredondada; 12. Detalhe da caliptra arredondada. Escalas 10 μ m, exceto figuras 2 e 6= 20 μ m.



Prancha 5, Figuras 1-13. CCIBt 3448, *Microcoleus* sp. 3: 1-5. Material da Natureza: 1-3. Desenvolvimento da célula apical: 3. Detalhe da caliptra cônico-arredondada; 4. Bainha mucilaginosa e necrídio na extremidade do tricoma; 5. Necrídio na porção terminal do tricoma; **6-13. Material em cultura: 6. Tricomas dispostos em feixes. 7-10. Desenvolvimento da célula apical: 7. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma e bainha mucilaginosa; 8-9. Tricomas levemente curvos e atenuados; 10. Célula apical com caliptra arredondada; 11. Necrídio na porção terminal do tricoma. 12. Necrídio na região central do tricoma. 13. Hormogônio. Escalas 10 μm , exceto figura 6= 20 μm .**



Prancha 6, Figuras 1-8. CCIBt 3466, *Microcoleus* sp. 3 (Material em Cultura): 1. Tricomas emaranhados; 2-5. Desenvolvimento da célula apical: 2. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 3. Tricomas levemente atenuados e curvos na extremidade; 4. Célula apical com caliptra cônico-arredondada, achatada; 5. Célula apical capitada; 6. Bainha mucilaginosa; 7. Necrídio; 8. Hormogônio. Escalas 10 μm , exceto figura 1= 20 μm .

4.3. *Phormidium formosum* (Clado B)

Dentre as populações analisadas neste estudo, a linhagem CCIBt 3524 apresentou morfologia relacionada à *Phormidium formosum* Anagnostidis & Komárek, corroborando os resultados filogenéticos obtidos.

Phormidium formosum (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 407. 1988.

Basônimo: *Oscillatoria formosa* Gomont, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Sér. 7, v. 16, p. 230. 1892.

Prancha 7, Figuras 1-10 (CCIBt 3524)

Tricomas dispostos em feixes, retos, levemente atenuados e curvos no ápice, levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa ausente. Células subquadráticas. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular castanho, com grânulos dispersos no protoplasma. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3524
Largura dos tricomas (μm)	
Natureza	5,6 – 6,8 (6,1)
Cultura	5,6 – 6,9 (6,5)
Comprimento Celular (μm)	
Natureza	2,1 – 2,5 (2,3)
Cultura	2,1 – 2,5 (2,3)
Razão largura/comprimento	
Natureza	2,3 - 3,1 (2,9)
Cultura	2,3 – 3,2 (2,7)

* Média entre parênteses

Material analisado: Cananéia (SP), Parque Estadual da Ilha do Cardoso. **CCIBt 3524** (SP427.883, SP428.678) - Material coletado sobre solo úmido.

Morfologicamente, a linhagem CCIBt 3524 assemelha-se a *Phormidium formosum*, de acordo com a descrição apresentada por Gomont (1982). Entretanto, esta espécie ocorre em ambientes aquáticos (Komárek & Anagnostidis 2005), diferindo da população analisada, que foi isolada a partir de amostra de solo encharcado.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, CCIBt 3524 formou um clado distinto junto com linhagens identificadas como *Phormidium formosum* (P0A, P001 e P010) e *Phormidium cf. animale* CCALA 761 (Figura 10, Clado B). Este clado apresentou alto suporte filogenético (99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior) e a identidade entre todas as linhagens foi acima de 98,7%. Em relação às espécies consideradas como *Phormidium sensu stricto* (Figura 4, Clado C), este clado apresentou identidade abaixo de 93%.

Por outro lado, *Phormidium formosum* apresentou-se relacionado à *Microcoleus sensu stricto* (Figura 4, Clado A). Apesar da identidade de 94,5 a 95,5 % entre *Phormidium formosum* (Clado B) e *Microcoleus sensu stricto* (Clado A), é possível considerá-los como gêneros distintos. *Microcoleus* apresenta aspectos morfológicos bem delimitados (tricomas brevemente ou gradualmente atenuados e célula apical capitada e com caliptra), ausentes em *Phormidium formosum*. O limite de identidade abaixo de 95% (gene 16S RNAr) é utilizado como critério para a separação de diferentes gêneros em Cyanobacteria (Stackebrand & Goebel 1994), entretanto, não é possível adotar estritamente este aspecto para a classificação dos organismos (Komárek 2006). De acordo com Komárek (2006), a presença de uma diferença fenotípica bem delimitada deve ser considerada decisiva nos casos em que grupos morfológicos distintos apresentam identidade filogenética em torno de 95%. Deste modo, é possível concluir que o clado *Phormidium formosum* representa um putativo gênero novo para a ciência, uma vez que apresenta morfologia distinta e alto suporte filogenético.

A partir da estrutura secundária das regiões conservadas (D1D1', Box B e V3) do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (Figura 11) foi possível avaliar as relações interespecíficas no clado *Phormidium formosum*. Ressalta-se que a linhagem *Phormidium cf. animale* CCALA 761 apresenta apenas o gene 16S RNAr sequenciado, e por este motivo não foi incluída nesta análise. A estrutura secundária correspondente à região D1D1' apresentou-se conservada para este clado (Figura 11, a-d). No que se refere às regiões Box B (Figura 11, e-h) e V3 (Figura 11, i-l), a estrutura secundária da linhagem CCIBt 3524 divergiu das demais hélices analisadas. Todas as linhagens deste clado apresentaram os dois RNA transportadores (RNA^{Ile} e RNA^{Ala}).

Martins (2014) indicou que a linhagem brasileira *Phormidium animale* 6CP apresenta alta identidade (entre 98% e 99,6%) com as sequências (*P. formosum* P0A, P001 P010, e *P. animale* CCALA 761) incluídas no clado B. Conseqüentemente, esta linhagem apresenta estreita relação filogenética com a cepa CCIBt 3524. No que se refere à estrutura secundária, ambas as populações brasileiras apresentaram a região Box B conservada, distinguindo-as de *Phormidium formosum* P0A, P001 e P010. Além disso, *P. animale* 6CP é morfológicamente similar à CCIBt 3524.

Em termos ecológicos, as linhagens retiradas do GenBank e incluídas no clado B (*P. formosum* P0A, P001 P010, e *P. animale* CCALA 761) diferem de ambas as populações brasileiras. As linhagens *P. formosum* P0A, P001 P010 foram coletadas em pesqueiros eutróficos na República Checa e *P. cf. animale* CCALA 761, em tanque de cultivo de *Elodea canadensis*. Por outro lado, a linhagem CCIBt 3524 e *P. cf. animale* 6CP foram isoladas a partir de amostras de solos úmidos, coletadas em área subtropical no Brasil (Parque Estadual da Ilha do Cardoso (SP) e Rio Grande do Sul, respectivamente).

A partir destes resultados, é possível concluir que a linhagem CCIBt 3524 pode ser considerada como um táxon distinto das demais linhagens incluídas no clado B. Entretanto, esta linhagem pode ser considerada como um táxon único com *P. cf. animale* 6CP. Vale ressaltar que a avaliação de diferentes marcados moleculares (tais como *rbcLX*, *rpoC1*) seria essencial para avaliar mais precisamente a relação interespecífica. Entretanto, há poucos dados disponíveis para comparação nos bancos públicos.

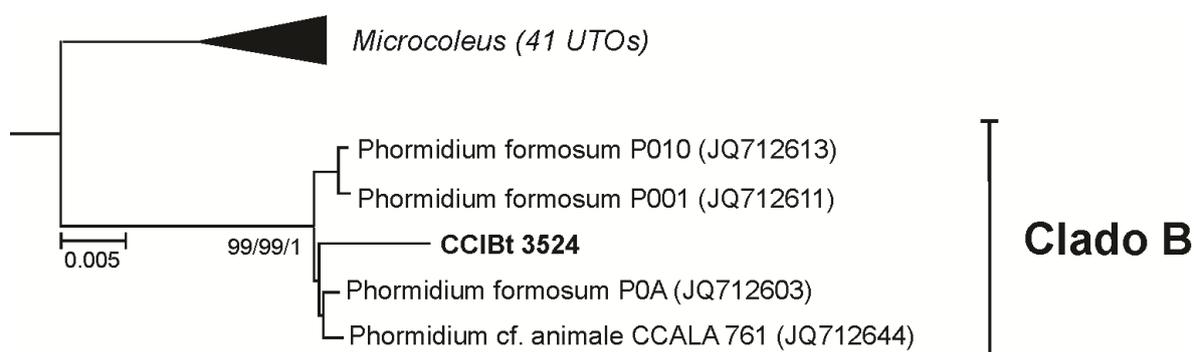


Figura 10. Detalhe do clado *Phormidium formosum* (**Clado B**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). A sequencia gerada neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

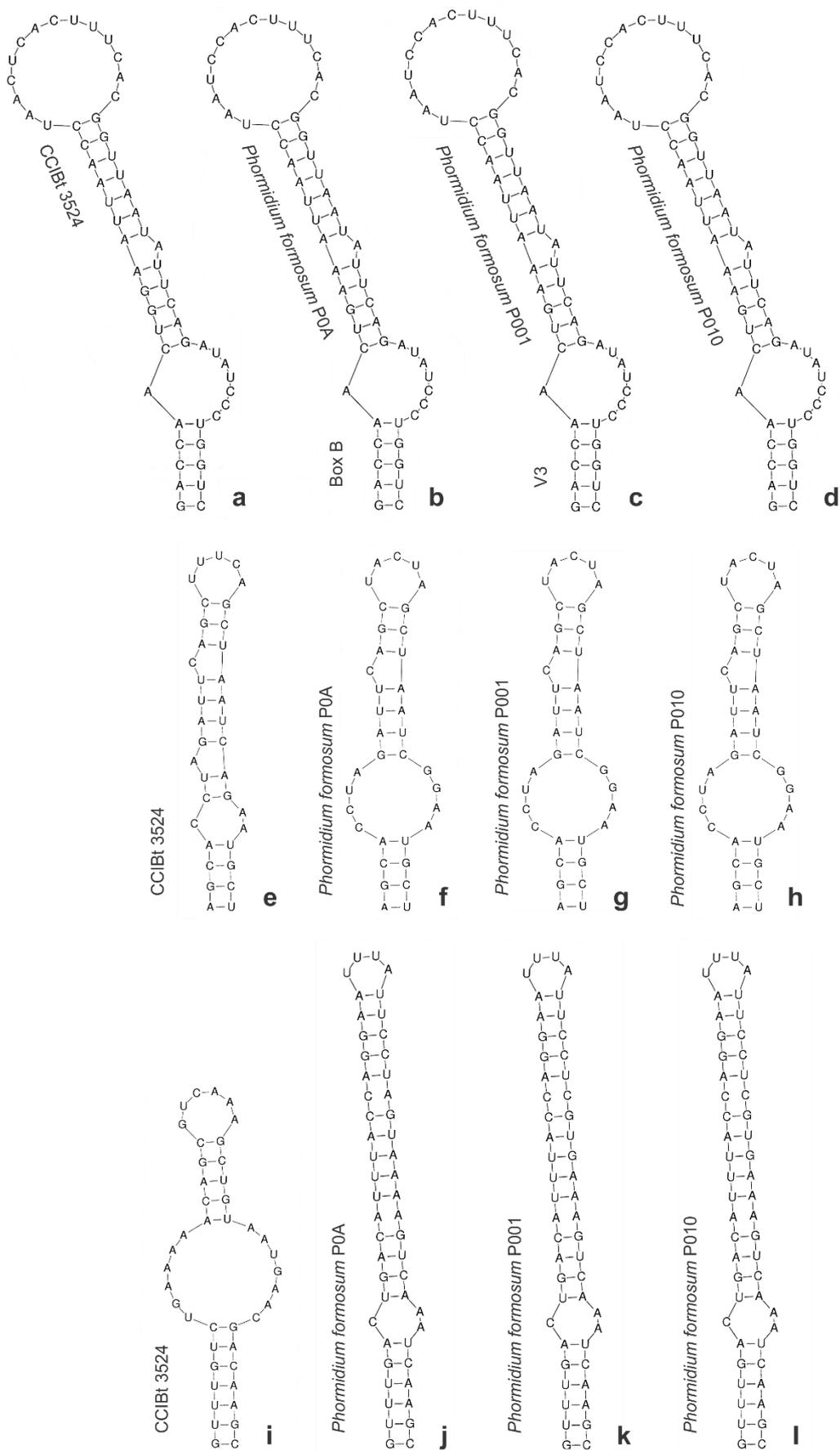
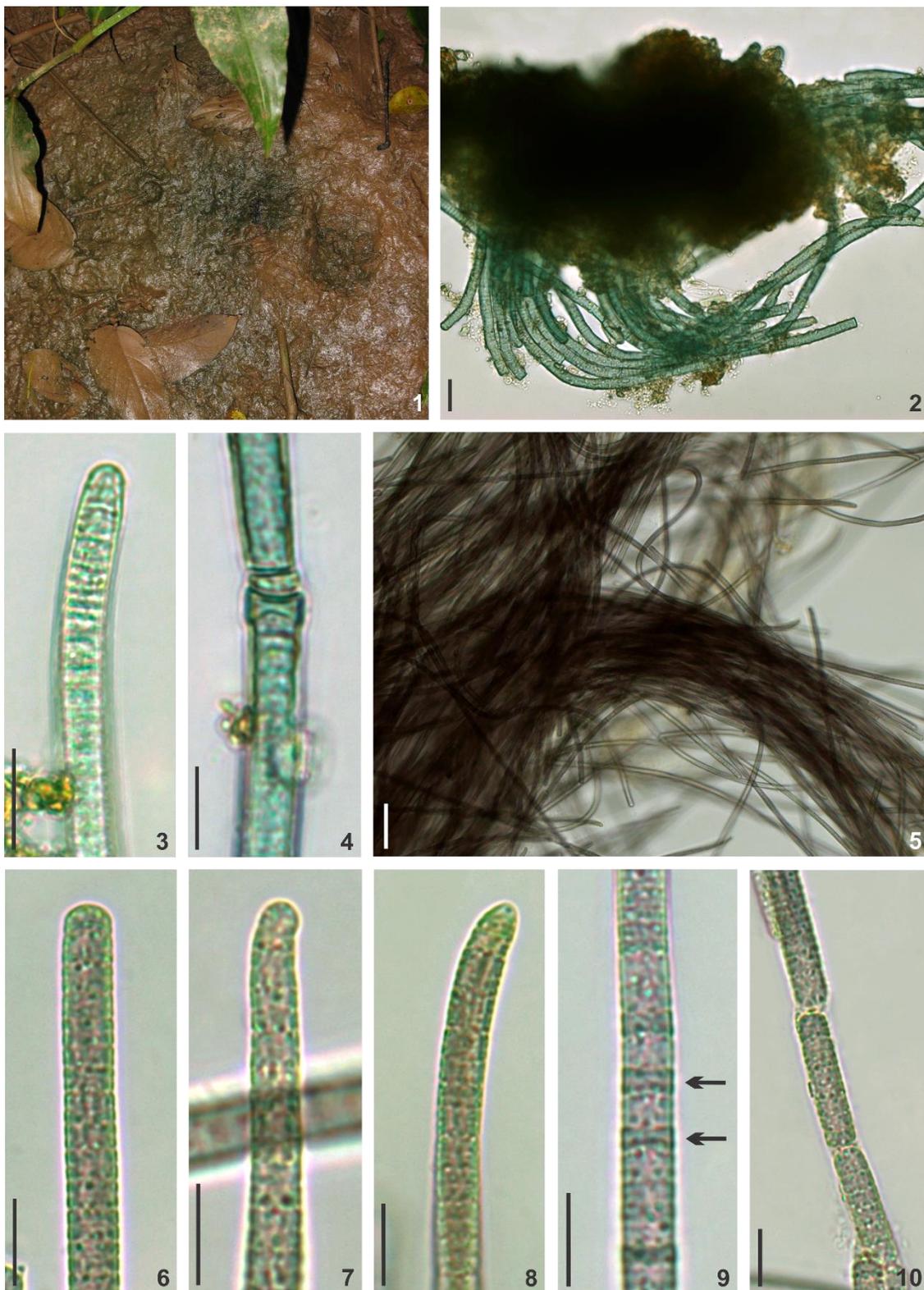


Figura 11. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr **a-d.** Região D1D1'; **e-h.** Região Box B; **i-l.** Região V3.



Prancha 7, Figuras 1-10. CCIBt 3524, *Phormidium formosum*: 1. Aspecto do material coletado sobre solo encharcado; 2-4. **Material da natureza:** 2. Tricomas dispostos em feixes; 3. Tricoma levemente atenuado e curvo no ápice; 4. Nécridio; 5-10. **Material em cultura:** 5. Tricomas dispostos em feixes; 6-8. Desenvolvimento da célula apical: 6. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 7. Tricoma levemente curvo no ápice; 8. Célula apical cônico-arredondada; 9. Nécridios (setas); 10. Hormogônios. Escalas 10 μ m, exceto figura 2= 20 μ m e 5= 50 μ m.

4.4. *Phormidium sensu stricto* (Clado C)

Dentre as populações analisadas neste estudo, CCIBt 3280, CCIBt 3595 e CCMA-UFSCAR 374 correspondem a *Phormidium sensu stricto*, uma vez que se mostraram filogeneticamente relacionadas à *Phormidium* cf. *irrigum* CCALA 759 (Sciuto *et al.* 2011). Esta linhagem é representativa do grupo VIII (Komárek & Anagnostidis 2005) ao qual a espécie tipo *P. lucidum* pertence.

Phormidium sp. 1

Prancha 8, Figuras 1-7 (CCIBt 3280) e Figuras 8-12 (CCMA-UFSCAR 374)

Filamentos dispostos em feixes. Tricomas retos, não atenuados, levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa hialina, firme e estreita. Células subquadráticas. Célula apical arredondada ou truncada, com espessamento apical. Conteúdo celular verde-azulado com uma área clara na região central da célula. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3280	CCMA-UFSCAR 374
Largura dos tricomas (µm)		
Cultura	5,0 - 5,6 (5,4)	5,0 - 5,7 (5,4)
Comprimento celular (µm)		
Cultura	2,0 - 2,4 (2,1)	2,0 - 2,7 (2,3)
Razão largura/comprimento		
Cultura	2,1 - 2,7 (2,3)	2,1 - 2,7 (2,3)

* Média entre parênteses

Material examinado: Corumbá (MS), Pantanal da Nhecolândia. **CCIBt 3280** (SP400.852) - Fazenda Nhumirim, Lagoa Salina da Ponta, material coletado com rede de plâncton. **CCMA-UFSCAR 374** (SP428.684) - Fazenda Guanandi, Lagoa Salitrada, material coletado com rede de plâncton.

Phormidium sp. 2

Prancha 9, Figuras 1-6 (CCIBt 3595)

Filamentos dispostos em feixes. Tricomas retos, não atenuados, não constrictos a levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa hialina, firme, estreita, às vezes ampla. Células

subquadráticas. Célula apical cilíndrico-arredondada. Conteúdo celular verde azulado, com aerótopos facultativos. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3595
Largura dos tricomas (μm)	
Cultura	7,2 – 7,5 (7,2)
Comprimento Celular (μm)	
Cultura	2,3 – 3,0 (2,6)
Razão largura/comprimento	
Cultura	2,4 - 3,1 (2,8)

* Média entre parênteses

Material examinado: Corumbá (MS), Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **CCIBt 3595** (SP427.683) – Material coletado com rede de plâncton em um empoçado com gramíneas.

Phormidium caracteriza-se como um dos gêneros mais complexos em Cyanobacteria, uma vez que inclui numerosos morfotipos, com diversas formas transitentes. Até o momento, mais de 200 morfoespécies já foram descritos, o que representa apenas parte da variação de todo o gênero (Komárek & Anagnostidis 2005). Em vista desta complexidade, Komárek & Anagnostidis (2005) distinguiram oito grupos taxonômicos com base na morfologia do ápice do tricoma (Figura 12).

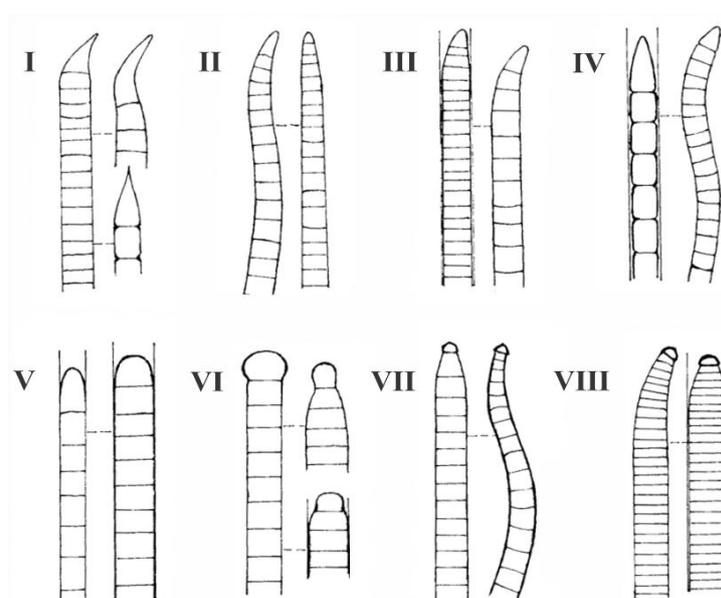


Figura 12. Grupos taxonômicos do complexo *Phormidium*, de acordo com Komárek & Anagnostidis (2005).

Recentemente, diversos estudos têm confirmado a heterogeneidade de *Phormidium* (Marquardt & Palinska 2007, Komárek *et al.* 2009, Komárek 2010, Chatchawan *et al.* 2012, Strunecký *et al.* 2013, Martins 2014) demonstrando que os grupos morfológicos reconhecidos por Komárek & Anagnostidis (2005) são congruentes com a filogenia. Consequentemente, diversas espécies de *Phormidium* têm sido transferidas para novos gêneros ou mesmo combinadas em táxons já existentes: *Phormidesmis* (Komárek *et al.* 2009), *Wilmottia* (Strunecký *et al.* 2011), *Oxynema* (Chatchawan *et al.* 2012) e *Microcoleus* (Strunecký *et al.* 2013).

Phormidium sensu stricto é representado pelo grupo morfológico VIII, que inclui a espécie tipo *P. lucidum* (designada por Geitler 1942). Entretanto, a maioria das espécies deste grupo, incluindo *P. lucidum*, está relacionada à *Oscillatoria/Lyngbya* (família Oscillatoriaceae) (Komárek & Anagnostidis 2005). Deste modo, Komárek & Anagnostidis (2005) sugeriram que *Phormidium* deveria ser proposto como *nomen conservandum* e o gênero re-tipificado. Entretanto, até o momento não há disponível nos bancos públicos sequências de *P. lucidum*, para que tal proposição seja confirmada.

Neste caso, seria necessário o sequenciamento do material tipo descrito por Geitler (1942) ou mesmo de linhagens muito bem delimitadas e representativas de *P. lucidum*. No presente estudo, não foi possível catalogar nenhum espécime deste táxon, apesar da enorme quantidade de material coletado (358 amostras) nos ambientes estudados. Vale ressaltar ainda, que não há linhagens deste táxon em coleções de culturas catalogadas.

A partir deste cenário, Sciuto *et al.* (2011) sugeriram *P. irrigum* como uma provável espécie tipo de *Phormidium*, uma vez que este táxon pertence ao grupo VIII e está relacionado à *P. lucidum*. Além disso, os autores indicaram *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759, como a linhagem-tipo deste táxon. Neste estudo, esta linhagem será utilizada como um representante de *Phormidium sensu stricto*, pelo fato dos aspectos morfológicos serem muito bem delimitados, estar relacionada ao grupo VIII e apresentar dados moleculares para comparação. Entretanto, queremos deixar claro que consideramos *P. lucidum* como espécie tipo de *Phormidium*, mas admitimos que novos estudos possam vir a nortear modificações neste contexto.

Em conclusão, o Clado C presentemente descrito será considerado como *Phormidium sensu stricto* neste estudo, uma vez que apresenta a linhagem *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759. Ressalta-se que alguns trabalhos (Strunecký *et al.* 2013, Martins 2014) também têm utilizado esta linhagem para definir o gênero *Phormidium*.

Morfológicamente, as linhagens CCIBt 3280, CCIBt 3595 e CCMA-UFSCAR 374 foram consideradas como pertencentes ao grupo morfológico VIII. Entretanto, Komárek & Anagnostidis (2005) descreve este grupo com tricomas brevemente atenuados (Figura 12, VIII), apesar de várias espécies não apresentarem esta característica, tal como as populações analisadas. Após a avaliação de todas as morfoespécies incluídas neste grupo, acredita-se que a característica mais proeminente destes organismos é a presença de células sempre distintamente mais curtas que largas, o que é totalmente condizente com o material analisado.

Vale ressaltar ainda, que a linhagem CCIBt 3595 apresentou aerótopos em uma fase do seu ciclo de vida. De acordo com a diagnose original de *Phormidium* (Gomont 1892), este gênero nunca apresenta vesículas gasosas. Entretanto, acredita-se que esta característica não possua valor taxonômico para o complexo *Phormidium*, uma vez que CCIBt 3595 apresentou alta identidade (16S RNAr) com linhagens sem aerótopos. Além disso, o novo gênero proposto neste estudo a partir de *Phormidium* (*Trichocapitatum*, item 4.5) demonstrou claramente que a presença de aerótopos não foi congruente com a filogenia.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, as linhagens CCIBt 3280, CCIBt 3595 e CCMA-UFSCAR 374 formaram um clado distinto com *P. cf. irrigum* CCALA759 (Figura 13, clado C), sendo consideradas *Phormidium sensu stricto*. Este clado apresentou alto suporte filogenético (99% NJ e 98% ML, e 1 de probabilidade posterior) e a identidade entre todas as linhagens foi acima de 97%. Ressalta-se que *Phormidium ambiguum* IAM M-71, apresentou-se em um ramo isolado, irmão ao clado C, cuja identidade foi abaixo de 94,0%. Deste modo, este táxon pode ser considerado como uma entidade distinta de *Phormidium sensu stricto*.

Internamente ao clado C, as linhagens CCIBt 3280 e CMMA-UFSCAR 374 apresentaram-se em um subclado distinto (Figura 13, subclado I), corroborando os dados morfológicos obtidos. A linhagem CCIBt 3595, morfológicamente distinta das demais populações estudadas, formou um subclado com as linhagens *Lynbya martensiana* H3b/33 e *Phormidium irrigum* f. *minor* ETS 02 (Figura 13, subclado II). Especificamente, a linhagem CCIBt 3595 apresentou identidade abaixo de 92,4% com gêneros que possuem aerótopos, como *Planktothrix* Anagnostidis et Komárek, *Aerosakkonema* Thu et al. e *Trichocapitatum*. (Tabela 9).

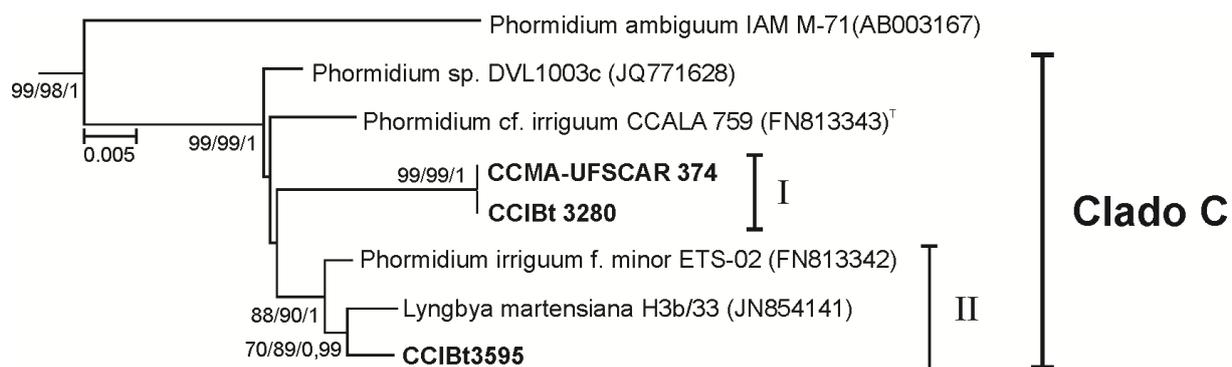


Figura 13. Detalhe do clado *Phormidium sensu stricto* (**Clado C**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G +I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos

Uma vez que o gene 16S RNAr apresenta alto grau de conservação (Fox *et al.* 1992, Boyer *et al.*, 2001, 2002), as relações interespecíficas no clado C foram avaliadas a partir da análise filogenética do gene *rpoC1*, bem como pela estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr. Ressalta-se que apenas as linhagens *P. cf. irriguum* CCALA 759 e *P. irriguum f. minor* ETS-02 apresentaram ambos os marcadores.

Com base na análise filogenética do gene *rpoC1*, CCIBt 3595 apresentou-se em um subclado distinto com as linhagens *P. cf. irriguum* CCALA 759 e *P. irriguum f. minor* ETS-02 (Figura 14, subclado I). Entretanto, as estruturas secundárias referentes as regiões D1D1', Box B e V3 apresentaram-se divergentes entre estas linhagens (Figura 15). É possível considerar que a relação filogenética neste clado será modificada a partir da inclusão de outras linhagens, tal como *Lynbya martensiana* H3b/33, que já se mostrou relacionada a partir do gene 16S RNAr. Deste modo, este subclado ainda não será considerado como uma espécie única, no caso *Phormidium irriguum*.

Por outro lado, as linhagens CCIBt 3280 e CCMA-UFSCAR 374 apresentaram-se em um ramo isolado, irmão ao subclado I (Figura 14). Os mesmos padrões evolutivos foram observados a partir da análise da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (Figura 15). As estruturas referentes às regiões D1D1', BOX B e V3, apresentaram-se conservadas para ambas as linhagens. Deste modo, conclui-se que CCIBt 3280 e CCMA-UFSCAR 374 podem ser consideradas como uma mesma espécie, distintas das demais linhagens do clado *Phormidium sensu stricto*. Vale ressaltar que todas as linhagens analisadas (Figura 15) apresentaram os dois RNA transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}).

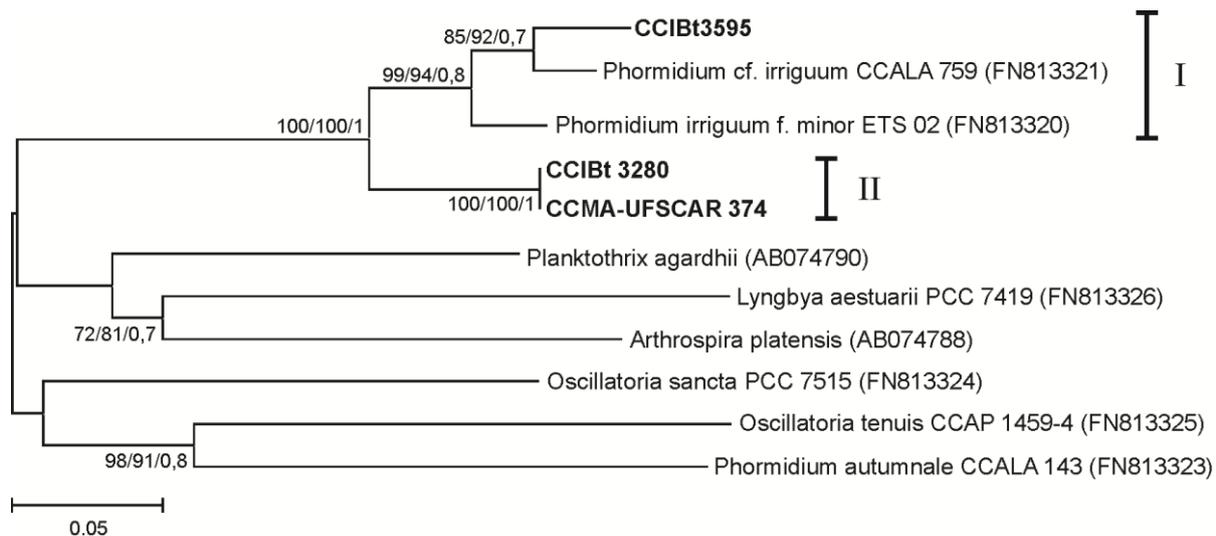


Figura 14. Análise filogenética do gene *rpoC1* (681pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Tabela 9. Identidade (%) entre as sequências de 16S RNAr das linhagens analisadas e outras retiradas do GenBank.

Cyanobacteria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. CCIBt 3280	–												
2. CCIBt 3595	97,0	–											
3. CCMA-UFSCAR 374	100	97,0	–										
4. <i>Phormidium</i> cf. <i>irriguum</i> CCALA 759	97,8	97,6	97,8	–									
5. <i>Phormidium irrigum</i> f. <i>minor</i> ETS 02	97,5	98,6	97,5	98,1	–								
6. <i>Phormidium</i> sp. DVL1003c	97,6	97,3	97,6	99,7	97,7	–							
7. <i>Lynbya martensiana</i> H3b/33	96,8	98,7	96,8	97,5	98,6	97,6	–						
8. CCIBt 3277, <i>Trichocapitatum</i>	92,0	92,2	92,0	92,5	92,0	92,6	91,9	–					
9. CCIBt 3261, <i>Trichocapitatum</i>	92,1	91,6	92,1	92,4	92,1	92,5	91,7	99,0	–				
10. CCIBt 3523, <i>Trichocapitatum</i>	92,0	92,1	92,1	92,6	92,1	92,7	92,0	100	99,0	–			
11. <i>Planktothrix agardhii</i> Niva-CYA 10	87,8	89,3	87,8	88,7	89,4	88,8	88,8	85,5	84,9	85,5	–		
12. <i>Aerosakkonema funiforme</i> Lao 26	96,1	92,4	92,1	92,2	92,6	92,4	92,4	94,3	94,5	94,3	88,5	–	
13. <i>Phormidium ambiguum</i> IAM M-71	90,2	94,0	93,9	94,0	93,8	94,0	93,6	91,9	91,6	91,8	88,2	91,2	–

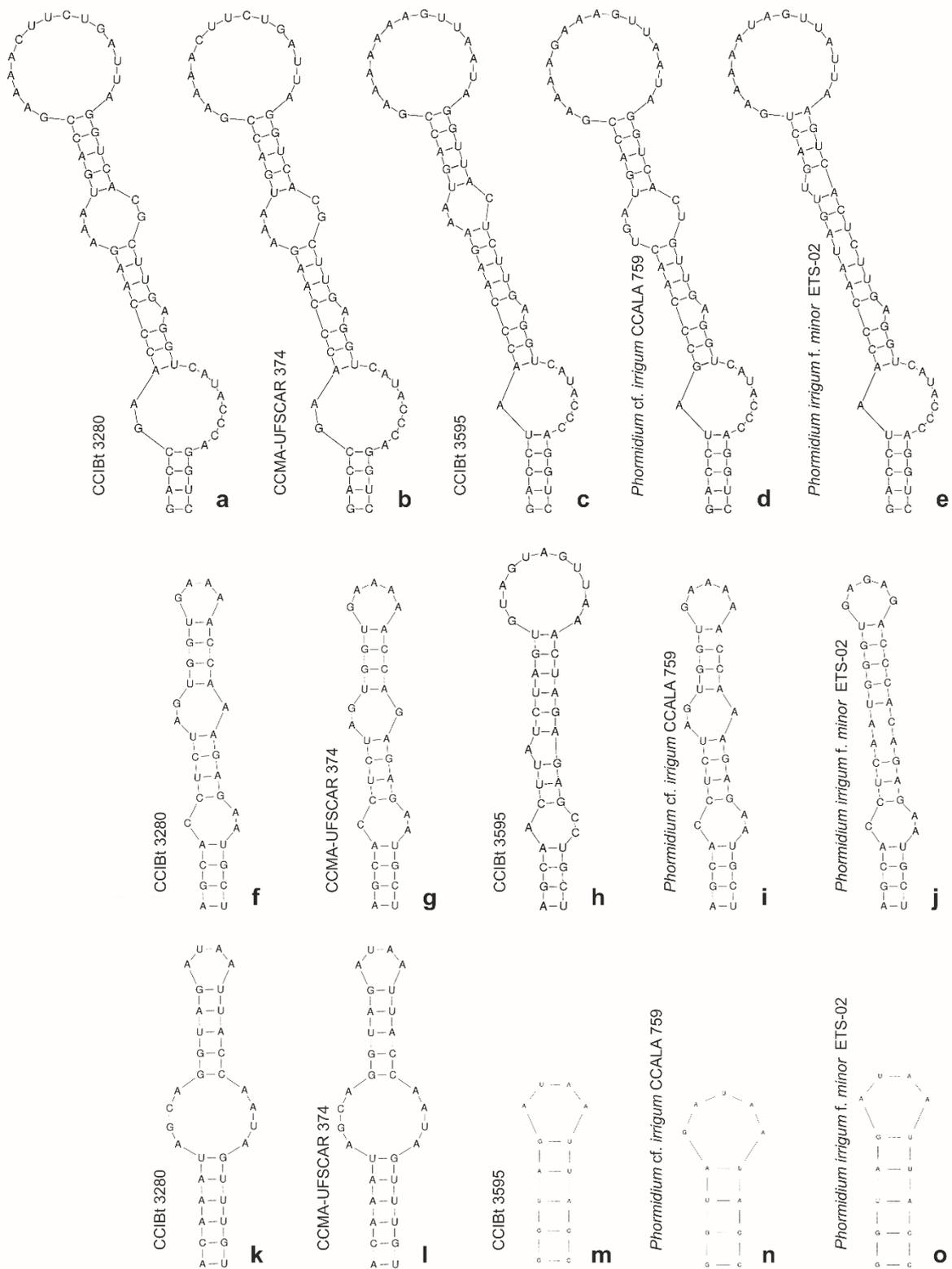
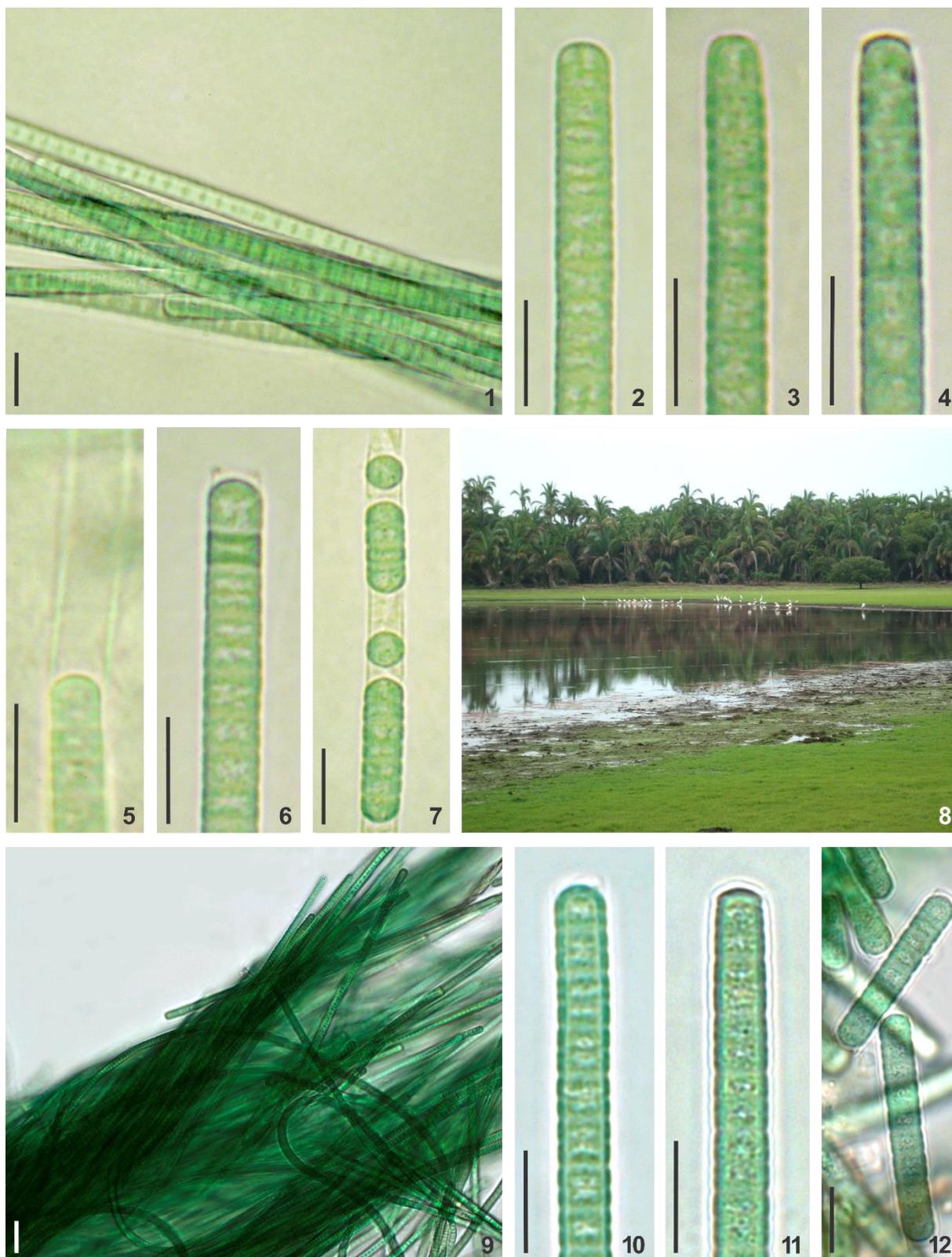
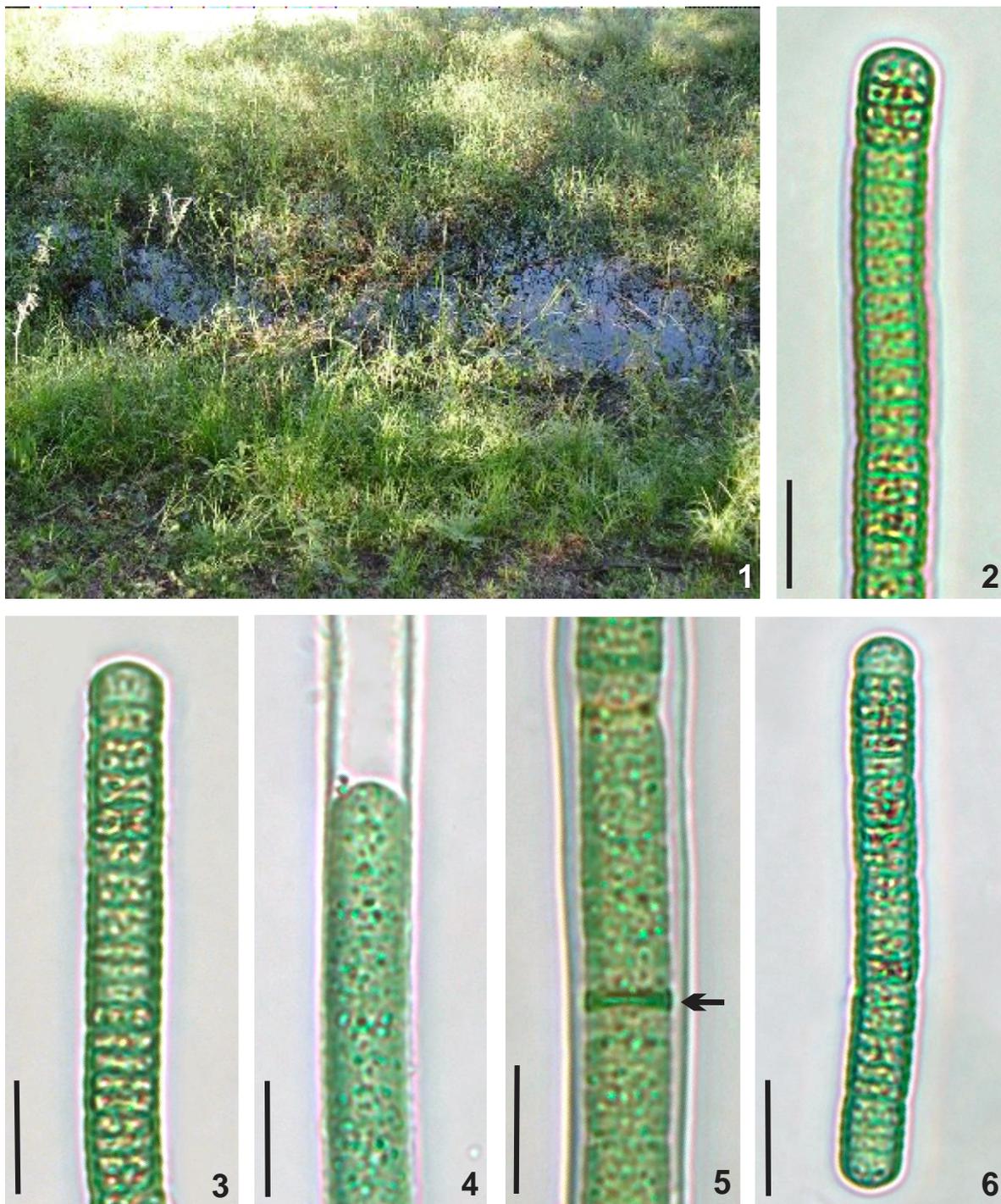


Figura 15. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr **a-e.** Região D1D1'; **f-j.** Região Box B; **k-o.** Região V3.



Prancha 8, Figuras 1-12. *Phormidium* sp. 1: 1-7. CCIBt 3280 (Material em Cultura): 1. Tricomas dispostos em feixes. 2-3. Célula apical arredondada; 4. Célula apical levemente truncada e detalhe do espessamento apical; 5. Bainha mucilaginosa; 6. Necrídio; 7. Hormogônios. **8-12. CCMA-UFSCAR 374:** 8. Lagoa Salina Salitrada onde o material foi coletado; **9-12. Material em Cultura:** 9. Tricomas dispostos em feixes; 10. Célula apical arredondada; 11. Célula apical levemente truncada e detalhe do espessamento apical. 12. Hormogônios. Escalas 10 µm, exceto figura 1 e 9= 20 µm.



Prancha 9, Figuras 1-6. CCIBt 3595, *Phormidium* sp. 2: 1. Empoçado com gramíneas onde o material foi coletado; **5-10. Material em cultura:** 2. Tricoma com aerótopos; 3. Célula apical cilíndrico-arredondada; 4. Bainha mucilaginosa estreita; 5. Detalhe do necrídio e bainha mucilaginosa ampla; 6. Hormogônio. Escalas 10 µm.

4.5. *Trichocapitatum* (Clado D)

Dentre as populações analisadas neste estudo, CCIBt 3261, 3277, 3279, 3523, CCALA 155, SAG 75.79 e UTEX 1580 correspondem ao novo gênero presentemente proposto *Trichocapitatum* Malone *et al.* O artigo foi enviado para a publicação na revista *International Journal Systematic and Evolution Microbiology* (Qualis A, fator de impacto 2.11).

***Trichocapitatum* gen. nov. (Phormidiaceae, Cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multi-locus analyses**

Camila Francieli da Silva Malone^{1*}, Janaína Rigonato², H. Dail Laughinghouse IV^{3,4,5}, Éder Carlos Schmith⁶, Zenilda Laurita Bouzon⁶, Annick Wilmotte³, Marli Fátima Fiore² and Célia Leite Sant'Anna¹

¹Institute of Botany, Nucleus of Phycology, CEP 04301-902, São Paulo, Brazil; ²Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil; ³Laboratory of Bacterial Physiology and Genetics, Centre for Protein Engineering, University of Liège, Sart Tilman B6, Liège, Belgium; ⁴Department of Arctic Biology, The University Centre in Svalbard, Longyearbyen, Norway; ⁵Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC USA. ⁶Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Abstract

For more than a decade, the taxonomy of Phormidiaceae has been complex, since morphologically similar organisms have represented phylogenetically distinct entities. The polyphyletic genus *Phormidium* and other gas-vacuolated oscilatoriods have been scattered throughout the cyanobacterial tree of life based on 16S rRNA analyses or multi-locus approach. Currently, several studies have focused on understanding oscilatoriods at the generic level. However, at the specific level, there are few studies characterizing cyanobacterial strains using combined data sets (morphology, ultrastructure, and multi-locus analyses). In this study we propose a new, well-defined genus, *Trichocapitatum* gen. nov., by analyzing filamentous strains morphologically intermediate between gas-vacuolated taxa and *Phormidium*, using a multi-locus approach. Further, we propose two new species from the strains: *Trichocapitatum komarekianum* (CCIBt 3277, 3279, CCALA 155, SAG 75.79, CCIBt3523, and UTEX 1580), and *Trichocapitatum lacustre* (CCIBt 3261).

Key words: *Phormidiaceae*, *Trichocapitatum*, intraspecific diversity, multilocus, phylogeny.

Introduction

The bulk of biodiversity on Earth is microbial and these microorganisms have an essential role in every ecological system. Cyanobacteria have been reported as the most widespread, morphologically distinct, and dominant bacteria (Whitton, 1992). To further discover 'true' cyanobacterial diversity, studies should include a 'polyphasic approach', combining both phylogenetic relationships and phenotypic characterizations. As a consequence, over the past few decades new technologies have emerged allowing researchers to study and understand these organisms in an evolutionary context (Komárek, 2005, Marquardt & Palinska, 2007). However, the polyphasic evaluation of diversity is sometimes very difficult, but only this approach will allow a consistent and natural classification of this group (Komárek, 2006).

Cyanobacterial systematics is still under revision and currently in a state of transition. Over the last decades, studies have focused heavily on generic delimitation using 16S rRNA phylogenetic analyses. However, this gene can be too conservative to resolve species-level relationships and thus not appropriate for this evaluation (Fox, Wisotzkey & Jurtshuk, 1992, Boyer *et al.*, 2002). Thus, population diversity evaluation has involved the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) region and its secondary structure analyses (Boyer *et al.*, 2001, 2002). Several studies (Johansen *et al.*, 2011, Casamatta *et al.*, 2005, Siegesmund *et al.*, 2008) have described new taxa based upon morphological and 16S-23S ITS autapomorphies. More recently, Sciuto *et al.* (2011) showed that a new approach, based on phylogenetic multilocus analyses, by the 'classical' 16S rRNA gene plus the ITS and other molecular markers (such as the *rpoC1* gene) is important to evaluate infraspecific cyanobacterial diversity. This picture is particularly useful to analyze heterogeneous genera in the family Phormidiaceae, including the polyphyletic genus *Phormidium* Kützing and gas-vacuolated oscillatoriods.

Some authors (Suda *et al.* 2002, Komárek *et al.* 2005, Thu *et al.* 2012) have shown that gas-vacuolated oscillatoriod genera, such as *Planktothrix* (Gomont) Anagnostidis & Komárek (Anagnostidis & Komárek), *Planktothricoides* (Wolszyńska) Suda & Watanabe, and *Aerosakkonema* Thu *et al.* do not represent a monophyletic group. According to Thu *et al.* (2012), the aerotope nature does not provide robust phylogenetic information in the reconstruction of phylogeny of cyanobacteria at generic or species levels. In this context, strains with or without aerotopes can be closely related phylogenetically (Thu *et al.* 2012).

In the same way, *Phormidium* *sensu lato* also represents a taxonomically complex group, since morphologically similar organisms may represent phylogenetically distinct entities (Sciuto *et al.*, 2011). From the eight morphological groups indicated by Komárek & Anagnostidis (2005),

several new genera (*Oxynema*, *Willmottia*, *Phormidesmis*) have been described based on morphological features and the 16S rRNA gene sequences. At the specific level, Sciuto *et al.* (2011) were the first authors to characterize *Phormidium*-like strains using a wide data set (morphology, ultrastructure and multi-locus analyses). In this study we propose a new, well-defined genus *Trichocapitatum* gen. nov. based on filamentous strains morphologically related to gas-vacuolated taxa and also to *Phormidium*, using a multi-locus approach. In this context, we confirmed that previously reported cyanobacterial genera were unsuitable to accommodate the studied strains (from Brazilian and European origin). Besides, from the results of this study, we propose two new species: *Trichocapitatum komarekianum* (CCIBt 3277, CCIBt 3279, CCIBt 3523, UTEX 1580 and CCALA 155) and *Trichocapitatum lacustre* (CCIBt 3261).

Materials and Methods

Cultured strains

Strains from distinct Brazilian environments and different culture collections (Culture Collection of Autotrophic Organisms – CCALA, Culture Collection of Algae at Göttingen University – SAG, and Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin - UTEX) were investigated. All strains have been maintained at the Institute of Botany Culture Collection (CCIBt), including those acquired from other culture collections. These organisms were isolated from an extreme alkaline lake (CCIBt3277), freshwater aquaria (CCIBt3279 and CCIBt3253), and a freshwater lake (CCIBt3261). The strain CCIBt3277 can be considered an extremophile, since it grows in an alkaline lake (pH 9-11) in the Brazilian Pantanal wetland region (19°34'32.6"S and 57°00'51.3"W). This ecosystem, located in the center of South America, is one of the world's largest wetlands and has hundreds of alkaline lakes (Barbiéro *et al.*, 2002, Malone *et al.*, 2012). The freshwater lake (30°03'2.48"S and 51°10'46"W), where CCIBt3261 was collected, is located in a botanical garden in the southeastern region of Brazil. *Phormidium autumnale* UTEX1580 was isolated from a gold fish aquarium. *Phormidium tergestinum* CCALA 155 and SAG 75.79, isolated from concrete in Mallorca, Spain, are duplicates of the same strain in different culture collections (Culture Collection of Autotrophic Organisms and Culture Collection of Algae at Göttingen University, respectively). In this study, all results will be reported under one accession number (CCALA 155), since both specimens are genetically identical. A subsample of the Brazilian strains and field material were preserved in formaldehyde 4% and deposited in the "Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo" Herbarium at the Institute of Botany, São Paulo, Brazil – CCIBt3261 (SP428.686), CCIBt3277 (field sample SP400.862 and culture aliquot SP427.779), CCIBt3279 (culture aliquot SP427.780), and

CCIBt3523 (field sample SP427.932 and culture aliquot SP427.792). Furthermore, replicates of the Brazilian strains were deposited in the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Cyanobacteria (BCCM/ULC): CCIBt3261 (ULC715), CCIBt3277 (ULC718), CCIBt3279 (ULC719) and CCIBt3523 (ULC733).

Culture conditions

The Brazilian strains were isolated following standard techniques (Jacinavicius *et al.* 2012). After unialgal isolation, the strains were maintained under the following conditions: temperature of 23 ± 1 °C, irradiance 40-50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (provided by day light fluorescent lamps and measured with a quantum meter sensor Li-COR), photoperiod of 14-10 light-dark cycle and liquid BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979). The strains acquired from the other culture collections were maintained at the same conditions.

Morphological evaluation

Morphological evaluations of the strains were based on the diacritical traits proposed by Komárek & Anagnostidis (2005) and Hoffmann *et al.* (2005). The analyses were carried out using a Zeiss Axioplan light microscope and the identification was undertaken based on population analyses. Photomicrographs were taken of each strain with a Zeiss Axiocam MRc digital camera. To better characterize the proposed genus, a life cycle analysis was carried out daily on strain CCIBt3277 for 30 days. The initial inoculum included only trichomes with aerotopes and without a mucilaginous sheath (at the same life stage).

Transmission electron microscopy (TEM)

Cell ultrastructure (predominantly position of thylakoids and gas vesicles) was studied from strain CCIBt3277, grown for two weeks in liquid BG-11 medium, using transmission electron microscopy (TEM). Cells were fixed overnight with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) plus 0.2 M sucrose (Schmidt *et al.*, 2009). The material was post-fixed with 1% osmium tetroxide for 4 h, dehydrated in an acetone gradient series (30, 50, 70, 90, and 100%) and embedded in Spurr's resin (Spurr, 1969). Ultrathin cross-sections were stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. The samples were examined using a TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 80 kV.

DNA extraction, PCR, and sequencing

Genomic DNA was extracted from the investigated Brazilian organisms and the strains acquired from the culture collections using the UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA). The *rbcLX* and *rpoC1* regions were amplified as previously described by Rudi *et al.* (1998) and Rantala *et al.* (2004), respectively. The full 16S rRNA plus ITS (internal transcribed spacer) from the genomic DNA was amplified by PCR using the primers 27F (Neilan *et al.*, 1997) and 23S30R (Taton *et al.*, 2003). Thermal cycling was performed in a Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK) under the following settings: initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation for 45 s at 94°C, annealing for 1 min at 57°C, extension for 1 min at 72°C, and lastly the reaction was completed with an extension for 7 min at 72°C. The PCR products were sequenced directly except the 16S rRNA plus ITS fragments, which were cloned into a pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) according to the supplier's manual. Competent *Escherichia coli* DH5α cells were transformed and recombinant plasmids were purified from white colonies by the alkaline lysis method (Birnboim & Doly, 1979). The cloned PCR product was sequenced using the Big Dye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems) with the pGEM®-T Easy Vector-anchored primers M13F and M13R and the internal primers 357F/357R, 704F/704R and 1114F/1114R (Lane 1991). The cycle sequencing reaction was performed with a Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited) under the following settings: initial denaturing at 95 °C for 1 min and 36 cycles of 95 °C for 15 s, 50 °C for 15 s and 60 °C for 2 min. After completion of the reaction, the DNA was precipitated using sodium acetate buffer (1.5 M sodium acetate - pH 9.0 and 250 mM EDTA- pH 8.0) followed by the addition of 100% and 70% ethanol. The purified reaction mixtures were reconstituted in HiDi formamide (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA), and the samples were analyzed in an ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technologies). The sequenced fragments were assembled into contigs using the Phred/Phrap/Consed software package (Ewing *et al.*, 1998, Ewing & Green, 1998, Gordon *et al.*, 1998) and only bases with a quality >20 were considered.

Phylogenetic analyses

All sequences obtained in this study and reference sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were aligned using ClustalW (Thompson *et al.* 1994), visually refined and used to generate phylogenetic trees. Phylogenetic trees for separate loci and concatenate sequences were constructed using the Maximum Likelihood (ML), Neighbor-Joining (NJ), and Bayesian (BA) methods. The best-fitting evolutionary models were

selected using jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) and showed in the legend of each figure. NJ and ML were implemented by the MEGA version 5.05 program package (Tamura *et al.* 2011). The robustness of the trees was estimated by bootstrap percentages using 1,000 replicates. Bayesian analysis was run in MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) in two independent runs, with four chains each, for 5×10^6 generations. Concatenated analyses were conducted using the 16S rRNA, *rpoC1*, *rbcLX* genes, and 16S-23S rRNA ITS region. For all protein-coding sequences, the occurrence of saturation was checked using DAMBE 5.3.4 (Xia & Xie, 2001). The best-fitting evolutionary model GTR+G+I was selected for all the four cases. The evolutionary history of strains was reconstructed in the same manner as described above.

Secondary structure models of ITS regions

The 16S-23S rRNA ITS region (550 bp) was analyzed by determining secondary structure of the conserved D1-D1' and Box B helices domain. Structures were determined after identifying each helix through position in the ITS as well as through common sequences at the base of the helix. Once the sequence fragment was identified, it was folded individually using Mfold version 3.2 (Zuker, 2003). Except for the use of the structure draw mode *untangle with loop fix*, default conditions in Mfold were used in all cases.

Results and Discussion

All studied strains (from Brazilian and European origin) had a number of morphological features similar to well-defined and distinct traditional oscillatorian genera, such as *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek, *Trichodesmium* Eherenberg ex Gomont and *Phormidium*. Morphological analysis of studied material showed, in a single strain, trichomes with and without gas vesicles or in an intermediate stage (some segments having gas vesicles) and facultative mucilaginous sheaths. Except for CCALA 155, the studied strains are similar to *Planktothrix* and *Trichodesmium* due to having gas vesicles in one part of its life cycle, the main morphological feature that distinguishes both genera from *Phormidium*. However, all the strains had characteristics resembling *Phormidium*, such as a conspicuous mucilaginous sheath (absent in *Planktothrix* and *Trichodesmium*) and a variety of tips. As in *Phormidium*, *Trichodesmium* can have an apical cell (slightly capitate) similar to some analyzed strains. However, *Trichodesmium* usually forms colonies with parallel or radially arranged fascicles or flocculent masses in marine environments (Capone *et al.* 1997, Komárek and Anagnostidis 2005), which was different than our studied strains. Therefore, morphologically, the studied strains presented an intermediate feature between *Planktothrix* and *Phormidium*.

Additionally, the analyzed material is similar to the new genus *Aerosakkonema* Thu et al. (2012) due to aerotopes. According to the original description, *Aerosakkonema* has twisted trichomes with small and inconspicuous gas vacuoles as diagnostic features. These features differ *Aerosakkonema* from the other freshwater gas-vacuolated oscillatoriid genera, including *Trichocapitatum*. Besides, our results also showed a difference in cell form: *Aerosakkonema* has discoid cells and *Trichocapitatum* has trichomes with subquadratic cells.

In relation to the presence of aerotopes in the studied strains, we performed daily analysis of the strain CCIBt3277. From this analysis was possible to confirm two distinct phases in the life cycle: from an initial inoculum of trichomes with aerotopes and without a mucilaginous sheath (Fig. 1 a-b), we observed that after six days there is an initial loss of aerotopes (Fig. 1 e) and formation of conspicuous hyaline sheaths (Fig. 1 h). The mucilaginous sheaths then become wider (Fig. 1 i) and the trichomes break repeatedly forming hormogonia (Fig. 1 k-l). Afterwards, the hormogonia are released from the sheath and aerotopes begin to appear again (Fig. 1 m). This cycle indicates that in nature, these trichomes may have a planktonic phase with aerotopes and a benthic phase without aerotopes. The gas vesicle structure was clearly confirmed using TEM (Fig. 2 a-b). We also found these two distinct phases in the strains CCIBt 3279 (Fig. 3 a-e), CCIBt 3523 (Fig. 3 f-j), UTEX 1580 (Fig. 3 k-o) and CCIBt 3261 (Fig. 4 a-e). However, aerotopes have not been observed in CCALA155 (from concrete surface) (Fig. 4 f-j), which may be influenced by environmental factors (Werner & Laughinghouse IV, 2009). Interestingly, only the SAG75.79 replicate presented a mucilaginous sheath (Fig. 4 j), similar to the gas vacuolated strains analyzed. Probably, the presence or absence of the sheath in these replicates (CCALA155 and SAG75.79) is related to variability in the different culture conditions that each strain has been maintained, since they belong to distinct collections.

All strains demonstrated a high morphological similarity in relation to the trichome end therefore, the capitata apical cell can be considered as the diagnostic morphological feature of the proposed genus, which is supported by phylogenetic placement. To delimit the species, we are considering the variations of the apical cell, phylogenetic placement of several genetic markers, and secondary structure of 16S-23S rRNA ITS (D1-D1' and Box B).

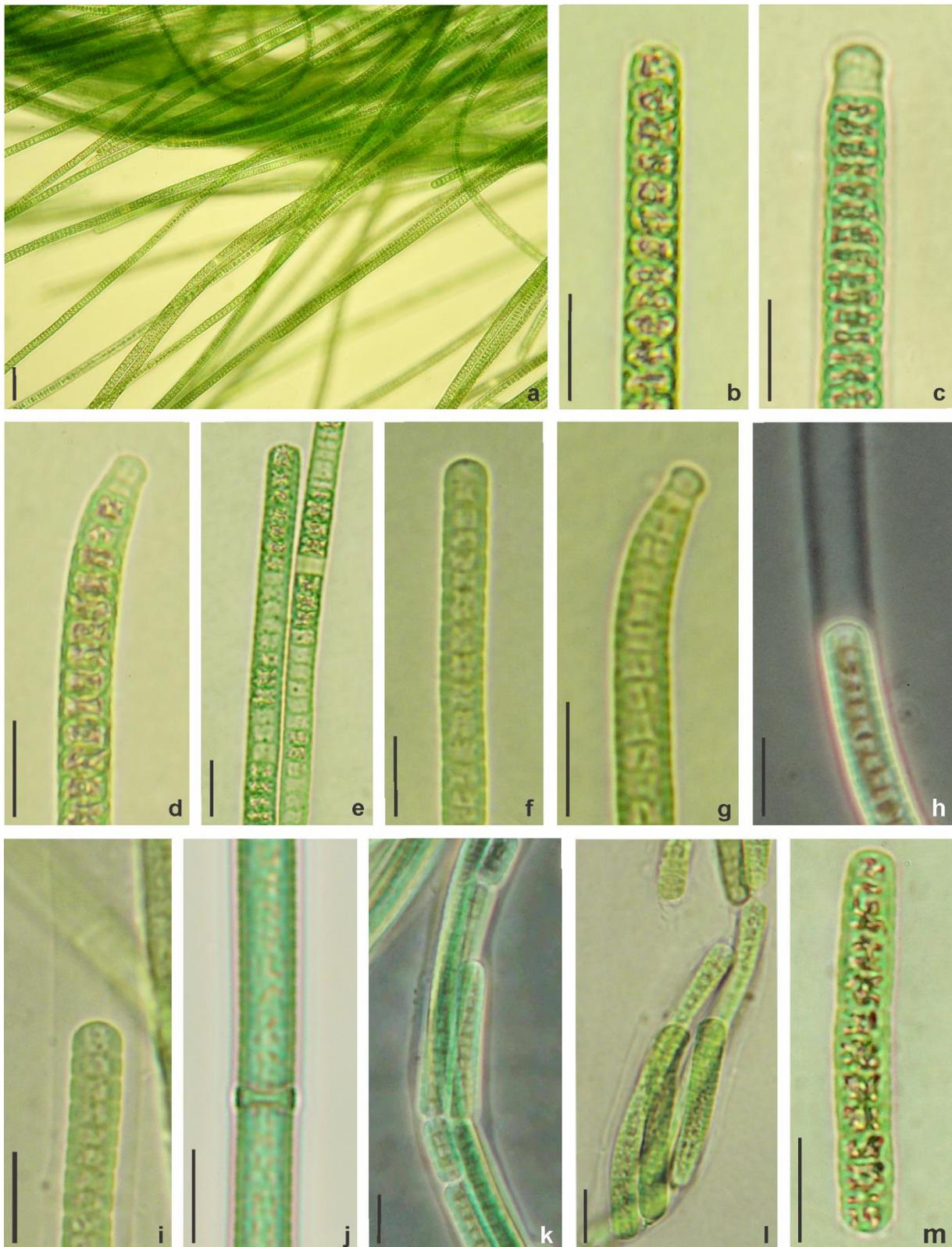


Figure 1. *Trichocapitatum komarekianum* CCIBt 3277: a. Trichomes with aerotopes and without a mucilaginous sheaths (initial inoculum of the cycle life); b-d. Development of the apical cell; e. Trichomes with initial loss of aerotopes; f. Trichomes completely without aerotopes; g. Apical cell fully developed; h. Detail of the sheath attached to trichome; i. Sheath wide; j. Detail of biconcave necridic cells; l-m. Trichomes breaking repeatedly to form hormogonia; n. Hormogonia with aerotopes. Scale bars 10 μm , except figure a= 20 μm .

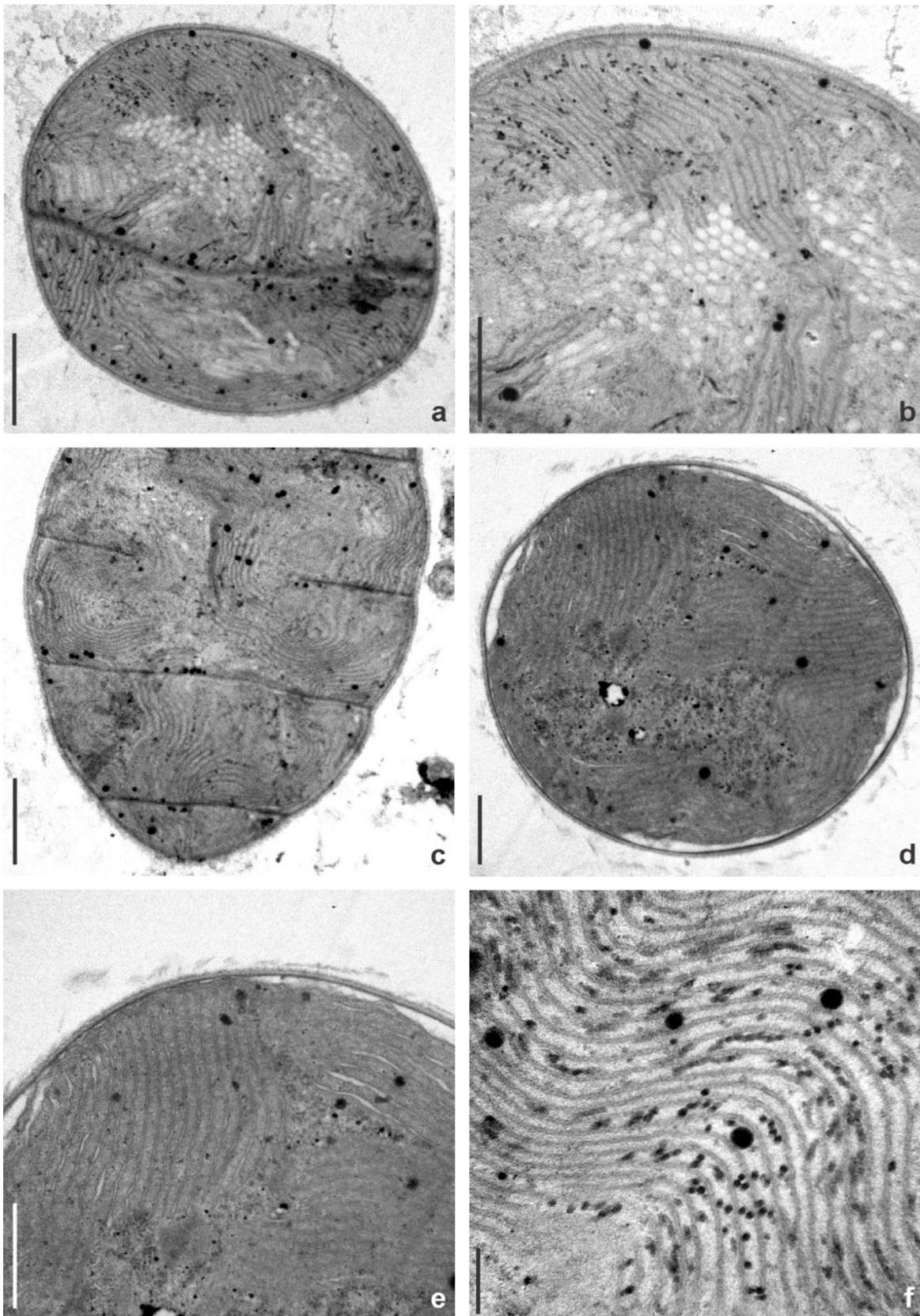


Figure 2. Transmission electron micrographs of *Trichocapitatum komarekianum* CCIBt 3277 strain: a. General view of a vegetative cells with aerotopes; b. Detail of aerotopes (side view); c. Radial arrangement of the thylakoids (longitudinal section). d. General view of cross section of a cell; e-f. Detail of thylakoids. Scale bars 1 μm , except 2 and 5 = 0,5, and 6= 0,2 μm .

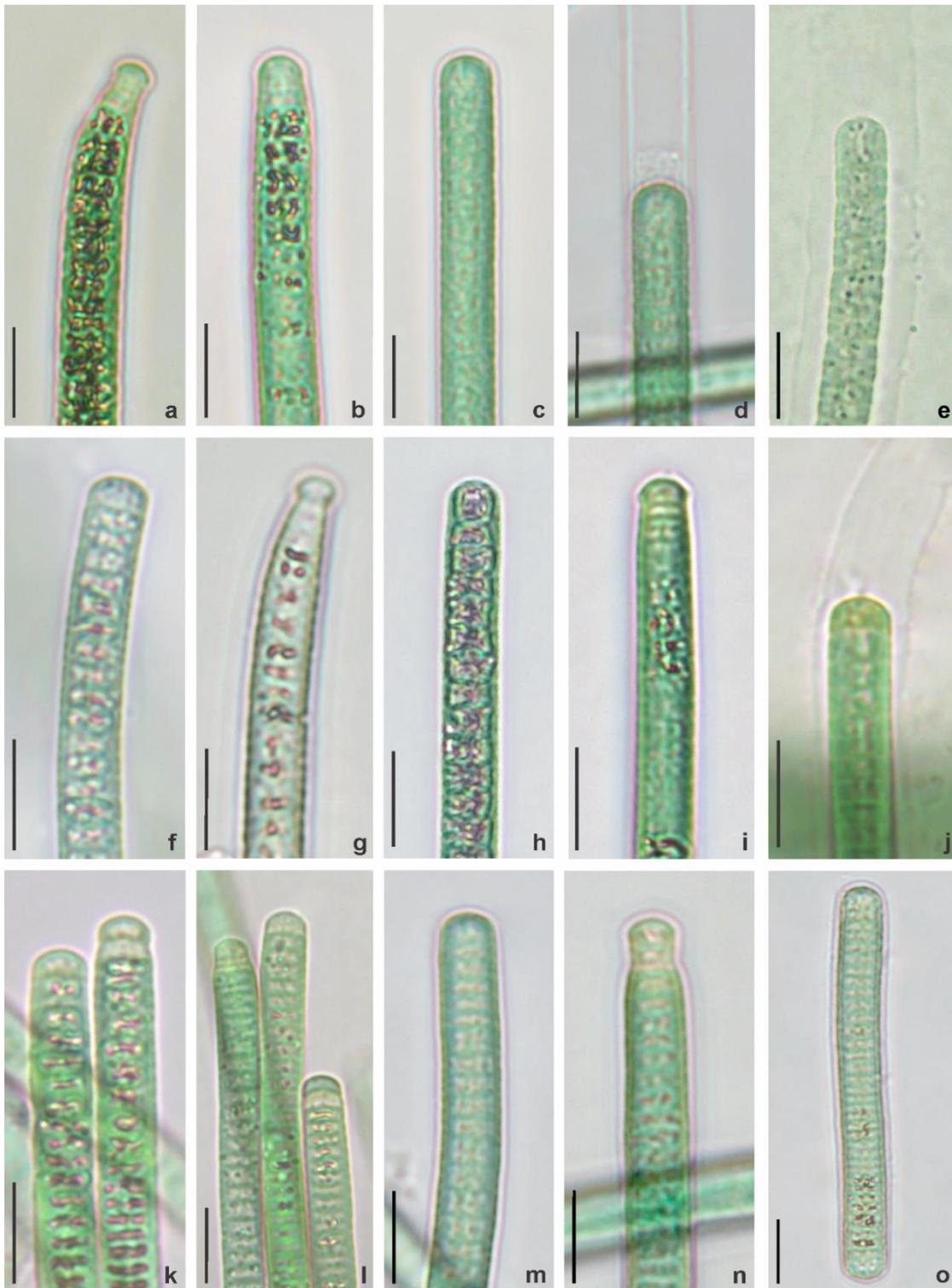


Figure 3. a-e. *Trichocapitatum komarekianum* CCIBt 3279: a. Apical cell fully developed; b. Trichomes with initial loss of aerotopes; c. Trichomes completely without aerotopes; d. Detail of the sheath attached to trichome; e. Sheath wide; f-l. *Trichocapitatum komarekianum* CCIBt 3523: f-g. Nature material: g. Apical cell fully developed; h-j: Culture material: h. Trichomes totally with aerotopes; i. Trichomes with initial loss of aerotopes; j. Detail of sheath wide; k-o. *Trichocapitatum komarekianum* UTEX 1580: k. Trichomes with aerotopes and detail of apical cell strongly capitate; l. Trichomes with initial loss of aerotopes; m. Trichomes completely without aerotopes; n. Sheath wide; o. Hormogonia with aerotopes. Scale bars 10 μ m.

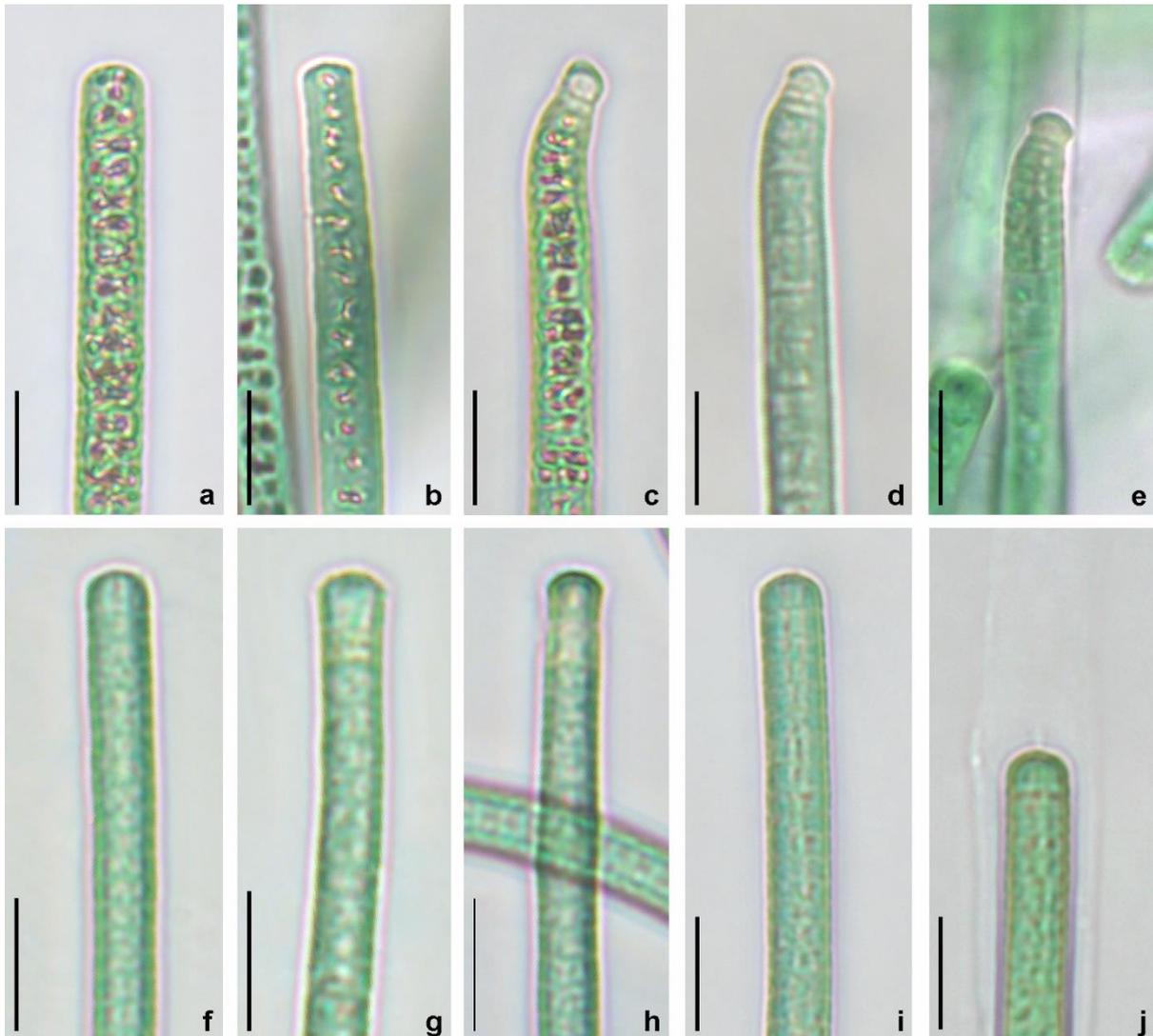


Figure 4: a-e *Trichocapitatum lacustre* CCIBt 3261: a-c. Trichomes totally with aerotopes and detail of apical cell development. d. Apical cell strongly capitates with calyptra (fully developed); e. Detail of sheath. f-g. *Trichocapitatum komarekianum* CCALA 155: Apical cell development; h. Apical cell slightly capitates with calyptra (fully developed). i-j. *Trichocapitatum komarekianum* SAG 75.79: i. Detail of trichome; j. Sheath wide. Scale bars 10 µm.

The phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences placed Brazilian strains in a robust novel clade that included isolated *Phormidium*-like taxa, such as CCALA 155, UTEX 1580, and *Phormidium* sp. KS (AB510147) (Fig. 5). Tree topology and position of the proposed genus is highly supported by NJ, ML and BA phylogenetic analyses (bootstrap values, 99%, 100% and 1.0 Bayesian posterior probability, respectively) and the three phylograms were similar. This new clade was distantly related to well-known gas-vacuolated oscillatorians, such as *Planktothrix*, *Planktothricoides* and *Trichodesmium* (pair-wise similarity less than 90%) (Table 1), and formed a sister group to a recently published gas vacuolated genus

Aerosakkonema, with a similarity between 94.3% - 94.7%. Other genera proposed from traditional *Phormidium sensu lato* species, such as *Wilmottia* and *Oxynema*, share less than 92% of genetic similarity with *Trichocapitatum*. The new genus presented herein showed a low similarity (around 90%) when compared to *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759. According to Sciuto *et al.* (2011), the strain CCALA 759 belongs to the traditional group VIII of *Phormidium* (designated by Komárek & Anagnostidis, 2005), which included the type species *P. lucidum*. Based on this assumption, the clade that comprises *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759 has been considered as representing *Phormidium sensu stricto* (Sciuto *et al.*, 2011). Furthermore, the strain previously reported by Chatchawan *et al.* (2012) as *Phormidium sensu stricto* ("*Phormidium tergestinum*" CCALA 155) in fact belongs to our new genus presently described. Thus, strain CCALA 155 is not related to *Phormidium tergestinum*, but to *Trichocapitatum* and in this novel genus, CCALA 155 is included in the species *T. komarekianum*. In this same way, UTEX 1580 belongs to *Trichocapitatum* and is not related to *Phormidium autumnale*, as identified previously. The presence of gas vesicles (Fig. 3 k) in this strain corroborates the placement of UTEX 1580 in the proposed genus.

In conclusion, the phylogenetic results confirm that the clade presented in this study belongs to a distinct genus *Trichocapitatum* and that previously reported cyanobacterial genera are unsuitable to accommodate the studied strains (from Brazilian and European origin). Besides, the cellular ultrastructure of the CCIBt3277 strain revealed the presence of radial thylakoids (Fig. 2 c-e) similar to other genera belonging to the Phormidiaceae family, confirming the generic identity within this family. Strain CCALA 155 presented a similar thylakoid arrangement pattern (Fig. 5d published by Marquardt & Palinska, 2007) to CCIBt 3277, corroborating its phylogenetic position in the *Trichocapitatum* clade.

The use of single gene trees to reconstruct phylogenetic history is debated (Lipscomb *et al.* 2003; Tautz *et al.*, 2003) and authors have demonstrated that the 16S rRNA in Cyanobacteria is good for generic placement, however can be too conservative to solve many species-level relationships (Boyer *et al.*, 2001, 2002). The 16S rRNA gene tree topologies (NJ, ML, and Bayesian) indicated a potential for a larger diversity (several species) within the proposed genus.

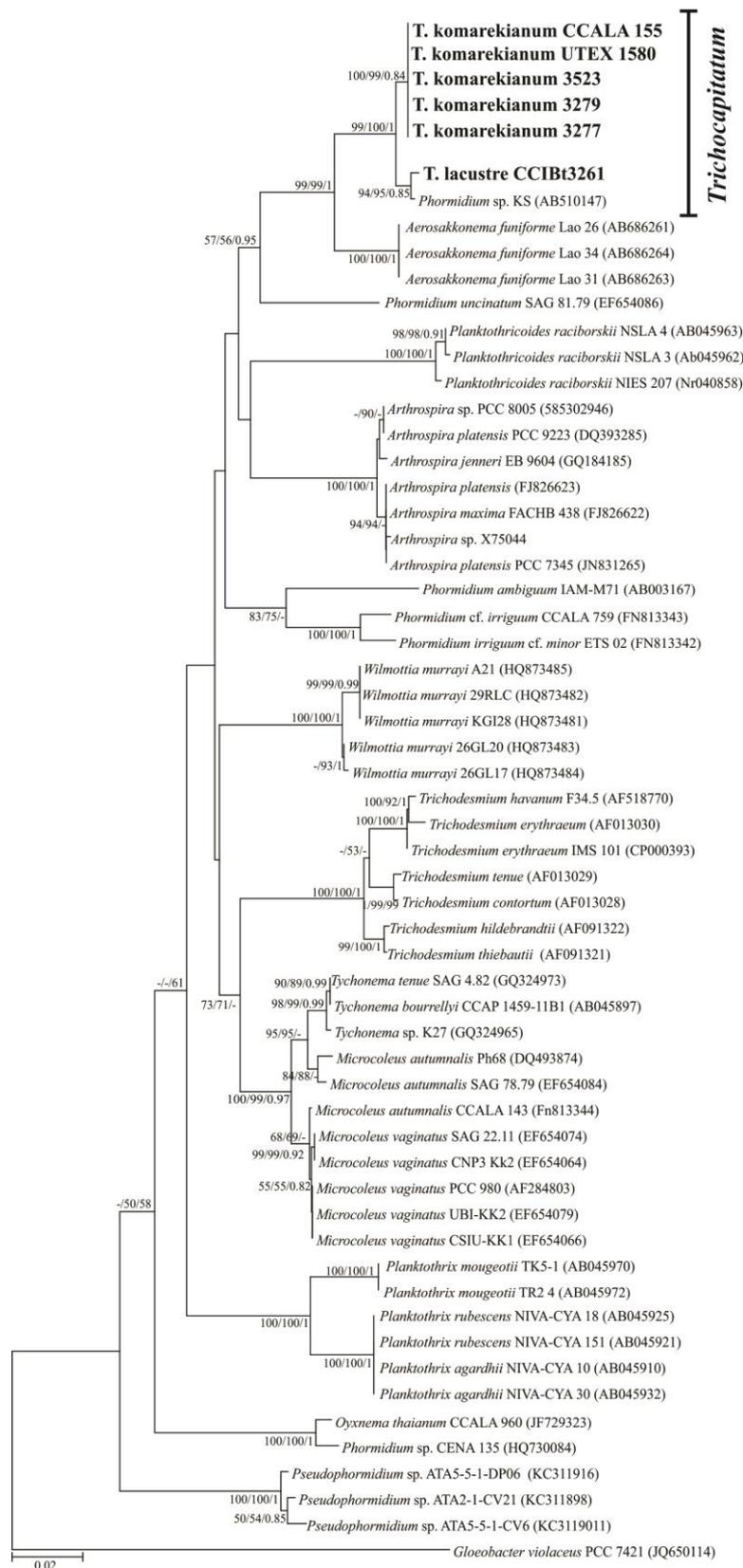


Figure 5. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1020 bp) and reconstructed using the maximum-likelihood (ML) analysis of evolutionary distances determined by the Hasegawa-Kishino-Yano + G + I model. NJ and ML bootstrap values (above 50%) and Bayesian posterior probabilities are provided for each node, respectively. Sequences determined in this work are indicated in bold.

Table 1. Similarity matrix (p-distance) of partial 16S rRNA sequences selected from the phylogenetic tree.

Cyanobacteria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>T. lacustre</i> CCIBt 3261	–															
2. <i>T. komarekianum</i> CCIBt 3277	99.0	–														
3. <i>T. komarekianum</i> CCIBt 3279	99.0	100	–													
4. <i>T. komarekianum</i> CCIBt 3523	99.0	100	100	–												
5. <i>T. komarekianum</i> CCALA 155	99.0	100	100	100	–											
6. <i>T. komarekianum</i> UTEX 1580	99.0	100	100	100	100	–										
7. <i>Phormidium</i> sp. KS	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	–									
8. <i>Aerosakkonema funiforme</i> Lao 26	94.5	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	94.7	–								
9. <i>Aerosakkonema funiforme</i> Lao 31	94.5	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	94.7	100	–							
10. <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA CYA 10	84.9	85.5	85.5	85.5	85.5	85.5	84.7	88.4	88.4	–						
11. <i>Planktothrix mougeotii</i> TK5-1	85.9	86.5	86.5	86.5	86.5	86.5	86.1	88.1	88.1	96.3	–					
12. <i>Planktothrix rubescens</i> NIVA CYA 18	84.7	85.3	85.3	85.3	85.3	85.3	84.6	88.3	88.3	99.9	96.2	–				
13. <i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES 207	88.1	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	88.3	90.9	90.9	89.2	89.2	89.1	–			
14. <i>Trichodesmium erythraeum</i>	88.7	89.0	89.0	89.0	89.0	89.0	88.9	90.5	90.5	89.5	89.2	89.4	90.5	–		
15. <i>Phormidium</i> cf. <i>irriguum</i> CCALA 759	90.1	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.1	91.9	91.9	88.6	88.3	88.5	89.6	90.6	–	
16. <i>Phormidium irriguum</i> f. <i>minor</i> ETS-02	89.6	89.9	89.2	89.9	89.9	89.9	89.7	92.1	92.1	89.3	88.8	89.2	89.3	90.4	98.3	–

The 16S rRNA gene tree demonstrated two well supported groups in our genus (*Trichocapitatum komarekianum* and *Trichocapitatum lacustre*). Further analysis on the *rpoC1* sequences (Fig. 6) and secondary structure of the 16S-23 rRNA ITS region (D1-D1' helix, Fig. 7) showed populational-level diversity in *T. komarekianum* group, demonstrating that there was more diversity at this level in our proposed species. The Box B secondary structure (Fig. 8) clearly showed two distinct groups (*T. komarekianum* and *T. lacustre*).

To verify the specific-level diversity, a multi-locus approach based on concatenated *rpoC1*, *rbcLX* genes, and the 16S-23S rRNA ITS region was also applied to investigate and reconstruct the specific phylogenetic history of the isolates (Fig. 9). These loci have a smaller sampling size than the 16SrRNA due to the low number of data available for comparison, but it was still feasible to understand the relationships among the strains. From these data we propose two new species among our strains: *Trichocapitatum komarekianum* (CCIBt 3277/3279/3523, CCALA 155, and UTEX 1580) and *Trichocapitatum lacustre* (CCIBt 3261). The clade formed by strain *Trichocapitatum lacustre* CCIBt 3261 and *Phormidium* sp. KS were separated in the 16S rRNA phylogeny (Fig. 5) with a well-supported subclade (bootstrap values 94, 95 and 0.85 posterior probability) and this separation was also confirmed in the multi-locus analyses (Figs. 6 and 9). Morphologically, CCIBt 3261 showed a unique feature: an apical cell with a pronounced calyptra (Fig. 4 c-e), distinguishing it from other strains. Additionally, the habitat of this organism, a freshwater lake, is different from the other studied strains (Table 2). According to phylogenetic data, *Phormidium* sp. KS probably belongs to *T. lacustre*, but as we did not study this strain, it is still necessary to confirm its inclusion in this new species.

Interestingly, there is some morphological and ecological diversity in the subclade A of *Trichocapitatum komarekianum* (CCIBt 3277, CCIBt 3279 and CCALA 155), though the branch length is small in both *rpoC1* and concatenated tree (Figs. 6 and 9). We hypothesize that there is diversity within the population of this subclade. CCALA 155 has been maintained in culture since 1962 and some modifications in genotype can occur, such as loss of the aerotopes. The inactivation of gas vesicles synthesis has been reported in other genera, such as *Microcystis*, due to gene rearrangements with insertion sequences (a putative transposase) at different sites (Mlouka *et al.*, 2004). Morphologically, some similar features among these strains were observed, such as the formation of a wide mucilaginous sheath. We relate the presence of different apical cells in CCALA 155 to its long-term cultivation. Besides, the full development of the apical cell is very difficult to observe in culture, due to intense fragmentation of trichomes. The subclade B formed by CCIBt 3523 and UTEX 1580 was well-defined in *rpoC1* and in the concatenated phylogenetic analysis (Figs. 6 and 9). These strains are morphologically similar to CCIBt 3277 and CCIBt 3279 (subclade A, Figs. 6 and 9). Besides,

CCIBt 3523 and UTEX 1580 strains were isolated from an aquarium, as was CCIBt 3279. According to Rejmankova *et al.* (2004), studies covering molecular and phenotypic data indicated that the genotypic diversity in Cyanobacteria is probably greater than that recognized on the basis of morphological analyses. Thus, the constructed phylogeny, which includes data on the evolutionary history of different genes from the strains of subclades A and B (Figs. 6 and 9), showed that they are two different populations of the same species. Some morphological difference among them can be related to the maintenance of material in culture, since cultivation has been known to cause alterations in morphology (Stanier, 1971, Nadeau *et al.*, 2001, Palinska *et al.*, 1996, Casamatta *et al.*, 2005).

Several authors have found the 16S-23S rRNA ITS region an adequate marker for species-level identification of taxa (Wilmotte, 1994, Boyer *et al.*, 2001, 2002, Johansen *et al.*, 2011). For further comparison between species and to resolve cryptic diversity, the secondary structure of different regions of the 16S-23 rRNA ITS has been used as an important marker (Bohunická *et al.*, 2011, Johansen *et al.*, 2011, Perkerson III *et al.*, 2011).

This study indicates that single gene genealogy does not necessarily match the true history of the species. Therefore, we recommend the combination of several genes for better-supported hypotheses in phylogenetic inference. Furthermore, it was found that morphological analyses of strain material could lead to underestimating the ‘true’ biodiversity.

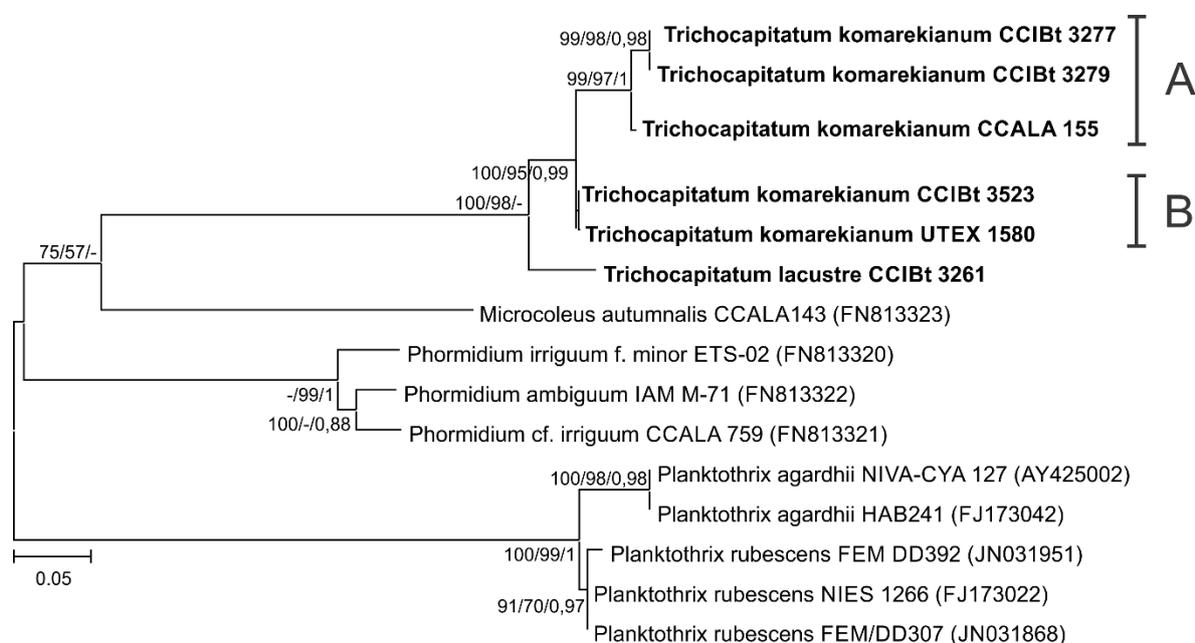


Figure 6. Phylogenetic tree based on *rpoC1* gene sequences (520 bp), reconstructed using the maximum-likelihood analysis of evolutionary distances determined by the Tamura-Nei + G + I model. MP and ML bootstrap values (above 70%) and Bayesian posterior probabilities (above 0,7) are provided for each node, respectively.

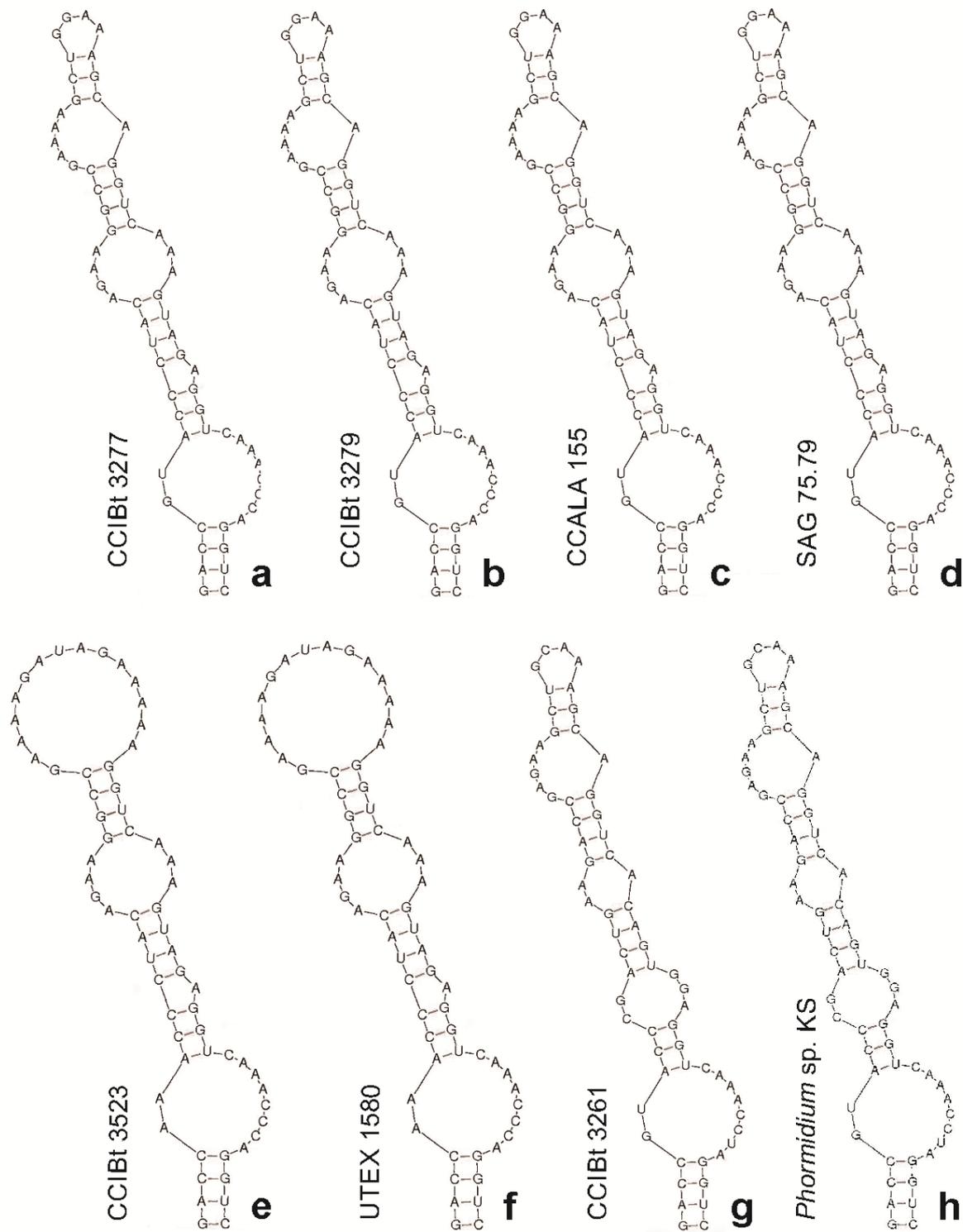


Figure 7. Secondary structures of D1-D1' helices. **a.** CCIBt 3277, **b.** CCIBt 3279, **c.** CCALA 155, **d.** SAG 75.79, **e.** CCIBt 3523, **f.** UTEX 1580, **g.** CCIBt 3261, **h.** *Phormidium* sp. KS.

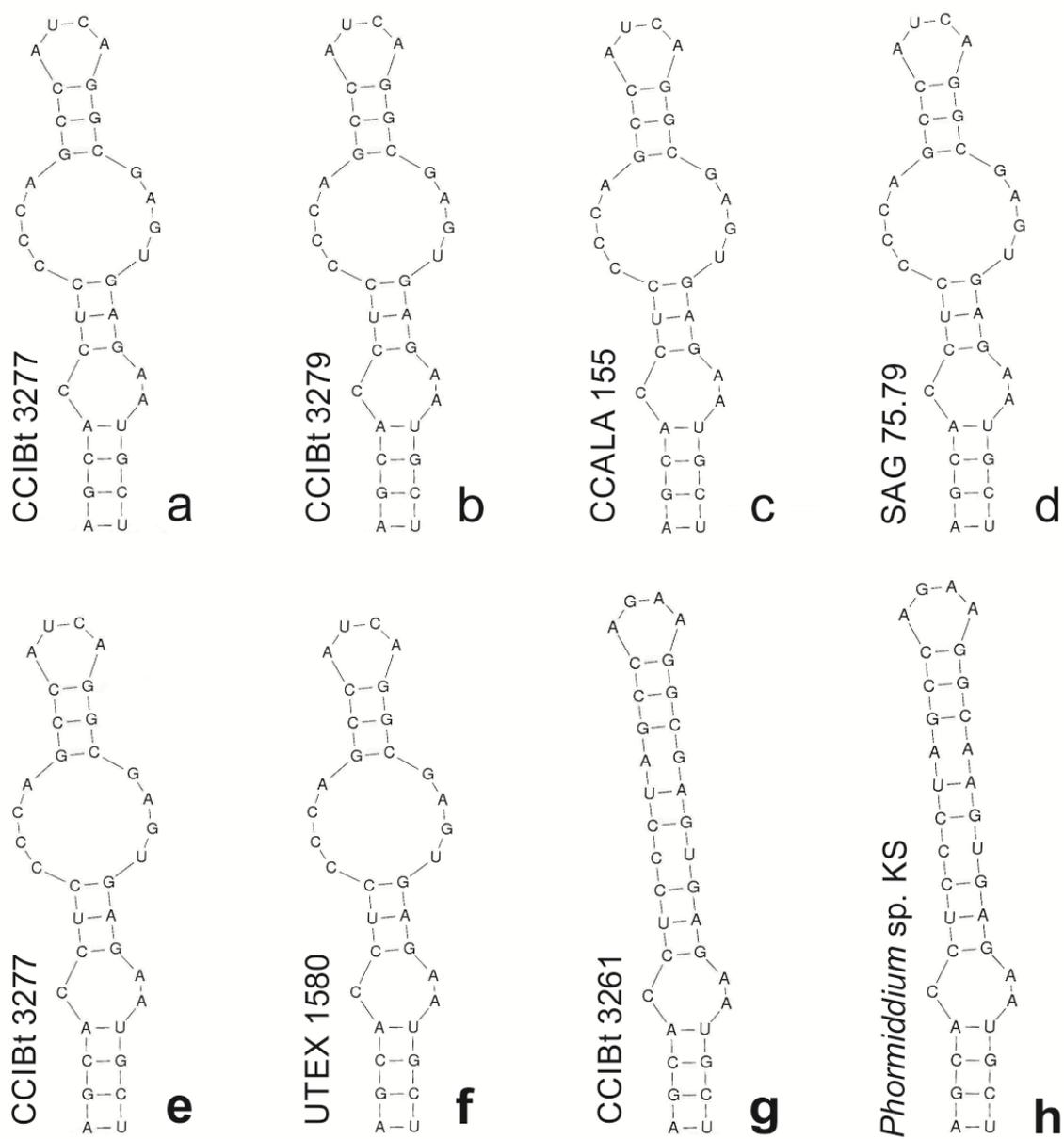


Figure 8. Secondary structures of Box B helices. **a.** CCIBt 3277, **b.** CCIBt 3279, **c.** CCALA 155, **d.** SAG 75.79, **e.** CCIBt 3523, **f.** UTEX 1580, **g.** CCIBt 3261, **h.** *Phormidium* sp. KS.

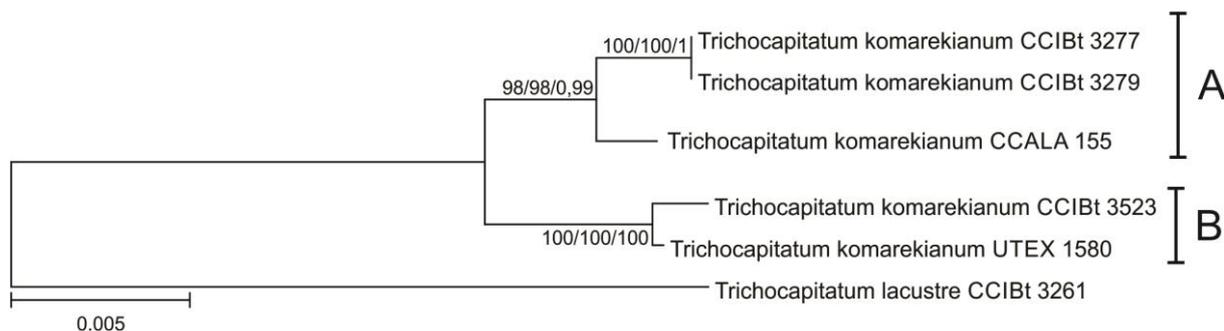


Figure 9. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA + ITS + *rpoC1* + *rbcLX* multiple alignment (3,594 bp) reconstructed using the maximum-likelihood analysis of evolutionary distances determined by the GTR + I + C model. MP and ML bootstrap values (above 70%) and Bayesian posterior probabilities (above 0,7) are provided for each node, respectively.

Description of *Trichocapitatum* gen. nov.

Trichocapitatum (C.F.S. Malone *et al.*) gen. nov.

(Tri.cho.ca.pi.ta'tum. Gr. n. thrix, trichos hair; L. adj. capitatus capitate; N.L. neut. n.

Trichocapitatum hair-like capitate organism)

Thallus fasciculated, blue-green. Cylindrical and straight trichomes, slightly attenuated, sometimes bent at the end, unconstricted or slightly constricted at the crosswalls, facultative hyaline and firm sheath, attached to trichome or wider. Cells wider than long, 2.0-3.4 (mean 2.6) μm long, 4.2-6.5 (mean 5.2) μm wide. Apical cell strongly or slightly capitate, sometimes with conical calyptra, cell content with facultative aerotopes. Hormogonia formation by biconcave necridic cells. Thylakoids radially-oriented. The type species is *Trichocapitatum komarekianum*.

Table 2. Comparative morphology of morpho-species.

Features	<i>T. komarekianum</i>			<i>T. lacustre</i>		
	CCIBt3277	CCIBt3279	UTEX 1580	CCIBt3523	CCALA155	CCIBt3261
Cycle of Life	Two phases	Two phases	Two Phases	Two Phases	One phase	Two Phases
Gas vesicles	present	present	present	present	absent	present
Trichome apex	slightly attenuated and constricted, bent	slightly attenuated and constricted, bent	not attenuated and nonconstricted, slightly bent	slightly attenuated and nonconstricted, bent	not attenuated and nonconstricted, straight	slightly attenuated and constricted, bent
Apical Cell	strongly capitate	strongly capitate	strongly capitate	strongly capitate	slightly capitate	strongly capitate
Calyptra	absent	absent	absent	absent	absent	conical
Mucilaginous sheath	attached to trichome or wide	attached to trichome or wide	attached to trichome or wide	attached to trichome or wide	Wide (only SAG 75.79)	attached to trichome
Cell diameter (µm)	4.8-6.6	5.8-7.3	5.8-7.1	5.8-6.8	4.8 – 6.4	5.6 – 6.7
Cell length (µm)	2.0-3.4	2.4-3.5	2.4-3.2	2.3-3.2	2.1 – 3.0	2.2 – 3.1
Habitat	alkaline lake	fish aquarium	fish aquarium	fish aquarium	Concrete surface	freshwater

Species Description

***Trichocapitatum komarekianum* (C.F.S. Malone *et al.*) sp. nov.**

Trichocapitatum komarekianum (Ko.ma.re.ki.a'num. N.L. neut. adj. komarekianum to honour Prof. Jiri Komárek).

Cylindrical and straight trichomes, bent at the end, slightly attenuated, unconstricted or constricted at the crosswalls, facultative hyaline and firm sheath, wide or attached to trichome. Cells wider than long, 2.0 – 3.5 µm long, 4.8 – 7.3 µm wide. Apical cell slightly or strongly capitate, cell content with facultative aerotopes. Hormogonia formation by biconcave necridic cells. The type strain, CCIBt3277, was isolated from alkaline lake in Brazilian Pantanal, municipality of Corumbá, Mato Grosso do Sul State (18°57'42''S and 56°37'26''W).

***Trichocapitatum lacustre* (C.F.S. Malone *et al.*) sp. nov.**

Trichocapitatum lacustre (la.cus'tre. N.L. neut. adj. lacustre inhabiting lakes).

Cylindrical and straight trichomes, bent at the end, slightly attenuated and constricted at the crosswalls, hyaline and firm sheath, attached to trichome or wide. Cells wider than long, 2.2 – 3.1 µm long, 5.6 – 6.7 µm wide. Apical cell strongly capitate with conical calyptra, cell content with facultative aerotopes. Hormogonia formation by biconcave necridic cells. The type strain, CCIBt3261, was isolated from freshwater lake in Botanical Garden, municipality of Porto Alegre, Rio Grande do Sul Estate (30°03'2.48''S and 51°10'46''W).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 562213/2010-4). C.F.S Malone received a graduate fellowship from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2010/51666-0). M.F. Fiore would like to thank CNPq for a research fellowship (306607/2012-3). H.D. Laughinghouse IV would like to thank FRS-FNRS for a postdoctoral fellowship and the Drouet Fund (Dept. Botany, NMNH-SI) for support. A. Wilmotte is Research Associate of the FRS-FNRS of Belgium. We are very grateful to Dr. J. Komárek for morphological and phylogenetic discussion that have significantly improved our paper. We would like to thank Dr. T. Filgueiras for help with Latin names.

References

- Barbiéro, L., Queiroz-Neto, J. P., Ciornei, G., Sakamoto, A. Y., Capellari, B., Fernandes, E. & Valles, V. (2002).** Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetlands* **22**, 528–540.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–518.
- Bohunická, M., Johansen, J. R. & Fučíková, K. (2011).** *Tapinothrix clintonii* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria), a new species at the nexus of five genera. *Fottea* **11**, 127–140.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. & Johansen, J. R. (2001).** Is the ITS 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for the use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Mol Biol Evol* **18**, 1057–1069.
- Boyer, S. L., Johansen, J. R. & Flechtner, V. R. (2002).** Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S - 23S ITS region. *J Phycol* **38**, 1222–1235.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. & Broadwater, S. T. (2005).** Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J Phycol* **41**, 421–438.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B. & Carpenter, E. J. (1997).** *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science* **276**, 1221–1229.
- Chatchawan, T., Komárek, J., Strunecký, O., Šmarda, J. & Peerapornpisal, Y. (2012).** Oxynema, a new genus separated from the genus Phormidium (Cyanophyta). *Cryptogam Algal* **33**, 41–59.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012).** jModeltest 2: more models new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**, 772.
- Ewing, B. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175–185.
- 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. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 166–70
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195–202.

- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kastovsky, J. (2005).** System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) – state in 2004. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* **117**, 95–115.
- Jacinavicius, F. R., Gama-Junior, W. A., Azevedo, M. T. P. & Sant’Anna, C. L. (2012).** *Manual para cultivo de Cianobactérias*. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SP: Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia.
- Johansen, J. R., Kovacik, L., Casamatta, D. A, Fučíková, K. & Kaštovský, J. (2011).** Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). *Nova Hedwigia* **92**, 283–302.
- Komárek, J. (2005).** The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanol Hydrobiol Stud* **34**, 5–17.
- Komárek, J. (2006).** Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* **21**, 349–376.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005).** Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 19/2. Edited by B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- Lane, D.J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115–204. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons.
- Lipscomb, D., Platnick, N. & Wheeler, Q. (2003).** The intellectual content of taxonomy. A comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* **18**, 65–66.
- Malone, C. F. S., Santos, K. R. S., Sant’Anna, C. L. (2012).** Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal brasileiro. *Oecol Australis* **16**, 745-755.
- Marquardt, J. & Palinska, K. A. (2007).** Genotypic and phenotypic diversity of Cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol* **187**, 397–413
- Mlouka, A., Comte, K., Castets, A., Bouchier, C. & De Marsaci, N. T. (2004).** The gas vesicle Gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. *J Bacteriol* **186**, 2355–2365.
- Nadeau, T. L., Milbrandt, E. C. & Castenholz, R.W. (2001).** Evolutionary relationships of cultivated Antarctic Oscillatorians (Cyanobacteria). *J Phycol* **37**, 650–654.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T. & Goodman, A. E. (1997).** rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 693–697.

- Palinska, K. A., Liesack, W., Rhiel, E. & Krumbein, W. E. (1996).** Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates. *Arch Microbiol* **166**, 224–33.
- Perkerson III, R. B., Kovácik, L., Brand, J., Kaštovský, J. & Casamatta, D. (2011).** A unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J Phycol* **47**, 1397–1412.
- 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. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 568–573.
- Rejmankova, E., Komárek, J. & Komárková, J. (2004).** Cyanobacteria - a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). *Divers Distrib* **10**, 189–199.
- Rippka, R. (1979).** Isolation and purification of Cyanobacteria. In *Cyanobacteria Methods in Enzymology*, pp. 3–27. Edited by L. Pacher & A.N. Glazer. Blackwell.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics Application Notes* **19**, 1572–1574.
- Rudi, K., Skulberg, O. M. & Jakobsen, K. S. (1998).** Evolution of Cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. *J Bacteriol* **180**, 3453–3461.
- Schmidt, E. C., Scariot, L. A., Rover, T. & Bouzon, Z. L. (2009).** Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* **40**, 860–869.
- Sciuto K., Andreoli C., Rascio N., La Rocca N. & Moro, I. (2011).** Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics* **1**, 1–18.
- Siegesmund, M. A., Johansen, J. R., Karsten, U. & Friedl, T. (2008).** *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *J Phycol* **44**, 1572–1585.
- Spurr, A. R. (1969).** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**, 31–43.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971).** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Ver* **35**, 171–205.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.

- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. (2003).** Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5157–5169.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. & Vogler, A. P. (2003).** A plea for DNA-taxonomy. *Trends Ecol Evol* **18**, 70–74.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Werner, V. R. & Laughinghouse IV, H. D. (2009).** Bloom-forming and other planktonic Anabaena (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Nova Hedwigia* **89**, 17–47.
- Whitton, B. A. (1992).** Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In *Photosynthetic Prokaryotes*, pp. 1-51. Edited by N.H. Mann & N.G. Carr. NY: Plenum Press.
- Wilmotte, A. (1994).** Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp. 1–25. Edited by D.A. Bryant. Boston: Kluwer Academic Press.
- Xia, X. & Xie, Z. (2001).** DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. 4.0.36. <http://web.hku.hk/xxia/software/software.htm>.
- Zuker, M. (2003).** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406–3415.

4.6. *Wilmottia* (Clado E)

Dentre as linhagens analisadas neste estudo, CCIBt 3449 e 3571 apresentaram morfologia relacionada ao gênero monoespecífico *Wilmottia* Strunecký *et al.* (*Wilmottia murrayi*), corroborando os dados filogenéticos obtidos. Ressalta-se que o gênero *Wilmottia* foi proposto recentemente a partir da espécie *Phormidium murrayi*, descrita originalmente da Antártica por West et West em 1911 como *Lyngbya murrayi*.

Wilmottia sp.

Prancha 10, Figuras 1-10 (CCIBt 3449)

Prancha 11, Figuras 1-7 (CCIBt 3571)

Filamentos emaranhados. Tricomas retos, não atenuados, não constrictos. Bainha mucilaginosa hialina, firme e estreita. Células aproximadamente isodiamétricas. Célula apical cônica-arredondada, geralmente levemente capitada. Conteúdo verde-azulado, finamente granular. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3449	CCIBt 3571
Largura dos tricomas (µm)		
Cultura	4,9 - 5,8 (5,3)	3,9 – 4,7 (4,2)
Comprimento Celular (µm)		
Cultura	3,7 - 4,8 (4,2)	3,4 – 4,6 (3,9)
Razão largura/comprimento		
Cultura	1,2 - 1,3 (1,3)	1,0 – 1,2 (1,1)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Cananéia (SP), Parque Estadual da Ilha do Cardoso: **CCIBt 3449** (SP427.789); Vale do Ribeira (SP), Estação Ecológica Juréia-Itatins: **CCIBt 3571** (SP428.680) - Materiais raspados de rochas submersas em cachoeiras.

Morfologicamente, as linhagens CCIBt 3449 e 3571 concordam com a descrição do gênero *Wilmottia* proposto por Strunecký *et al.* (2011) como pertencente à família Pseudanabaenaceae. Em comparação com a espécie tipo, as populações analisadas distinguem-se principalmente em relação ao ambiente: *Wilmottia murrayi* foi descrita como endêmica da Antártica, enquanto as linhagens CCIBt 3449 e 3571 foram isoladas a partir de amostras aquáticas (sobre rochas submersas) em regiões subtropicais da Mata Atlântica. Entretanto,

Strunecký *et al.* (2011) sugerem que espécies ecologicamente e geograficamente distantes podem pertencer a este clado.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, CCIBt 3449 e 3572 formaram um clado distinto com espécies do gênero *Wilmottia*, incluindo a linhagem-tipo *Wilmottia murrayi* KGL28, determinada por Strunecký *et al.* (2011) (Figura 16, Clado E). Ambas as linhagens apresentaram-se em ramos distintos, irmãos ao subclado (Figura 16, subclado I) composto pelas sequências de *Wilmottia murrayi*. Deste modo, considerando-se a elevada identidade apresentada entre estas linhagens (acima de 97%) e o alto suporte filogenético do clado conclui-se que o material analisado corresponde ao gênero *Wilmottia*, corroborando os dados morfológicos.

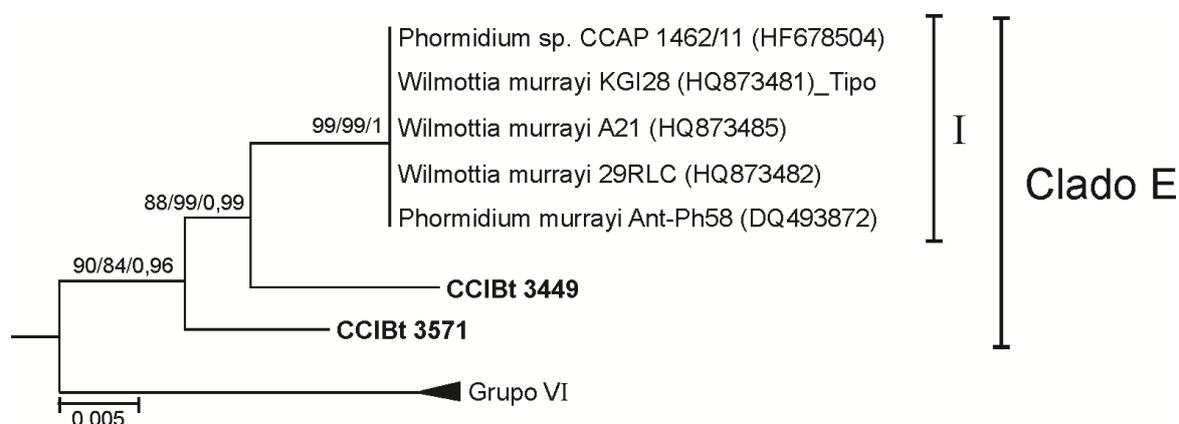


Figura 16. Detalhe do clado *Wilmottia* (**Clado E**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G +I, 1000x). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos

A relação interespecífica no clado E foi avaliada a partir da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S. A partir desta análise, é possível concluir que ambas as linhagens estudadas são filogeneticamente distintas entre si, e não correspondem a espécie *Wilmottia murrayi*. Todas as estruturas secundárias referentes às regiões D1D1', Box B e V3 foram divergentes entre si (Figura 17). Deste modo, CCIBt 3449 e 3572 podem ser consideradas como novas espécies do atual gênero monoespecífico *Wilmottia*. Além disso, os nossos resultados demonstraram que a diversidade genética neste gênero é maior do que a morfologia observada. Vale ressaltar que a avaliação de diferentes marcadores moleculares (*rbcLX*, *rpoC1*) seria essencial para avaliar mais precisamente a relação interespecífica. Entretanto, não há dados disponíveis para comparação nos bancos públicos referentes ao gênero *Wilmottia*.

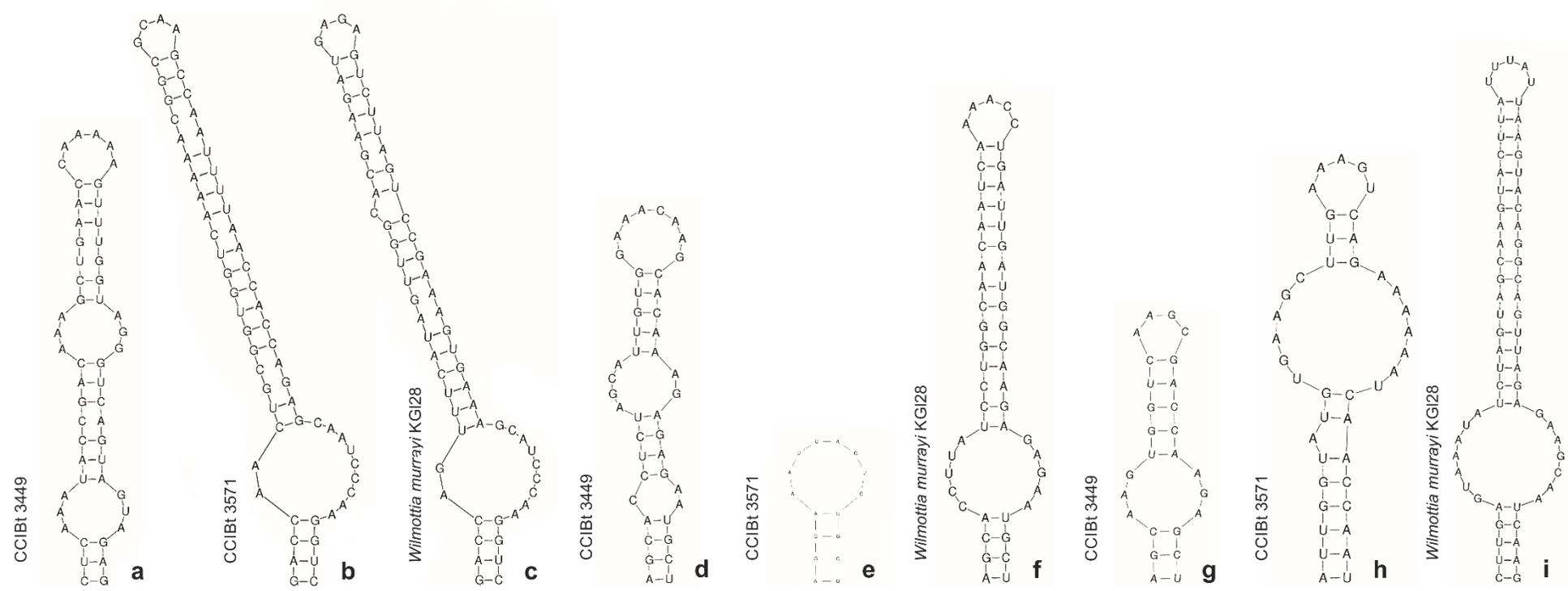
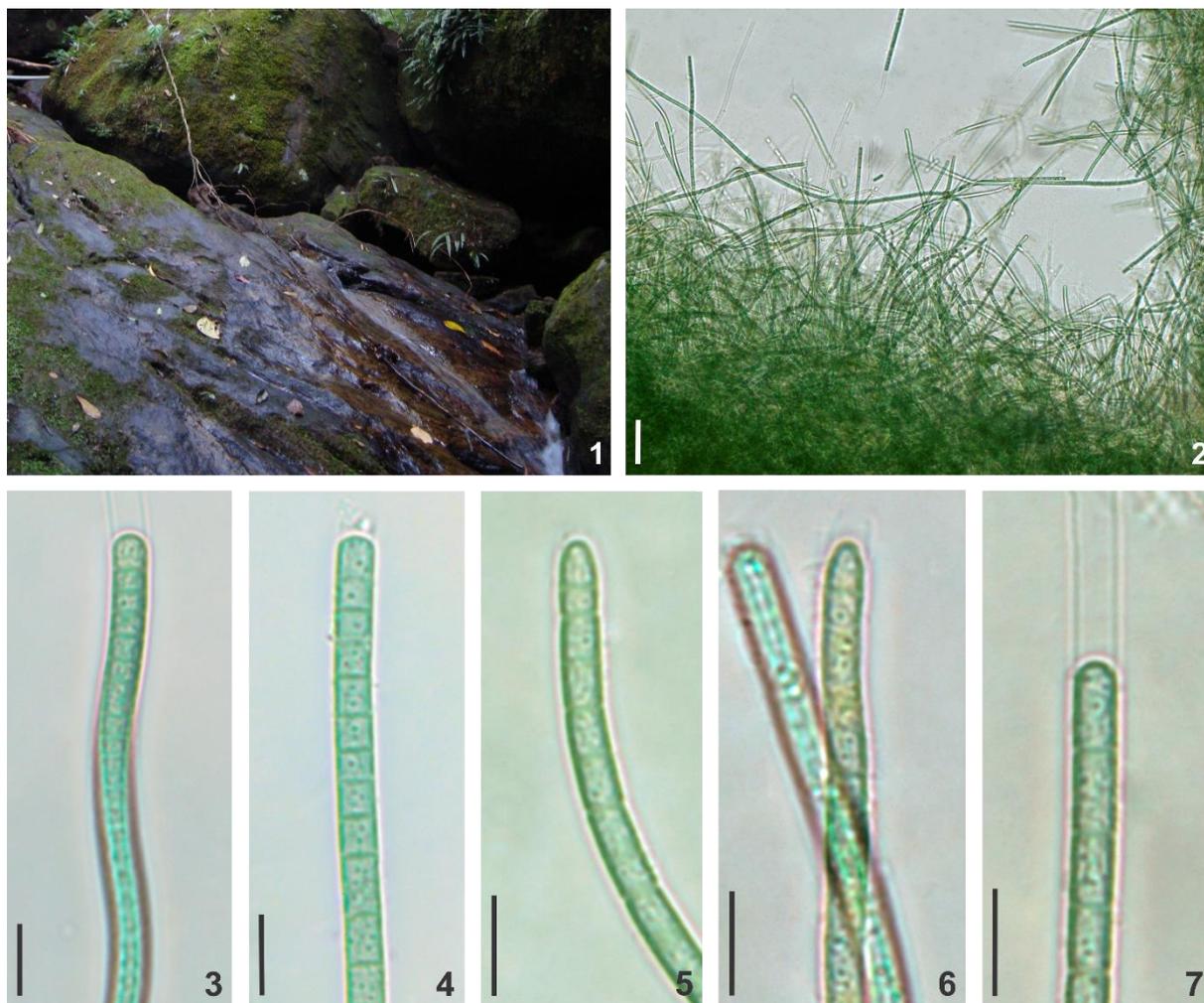


Figura 17. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S rRNA **a-c.** Região D1D1'; **d-f.** Região Box B; **g-i.** Região V3.



Prancha 10, Figuras 1-10. CCIBt 3449, *Wilmottia* sp.: 1. Cachoeira onde o material foi coletado. 2. Detalhe da rocha com o material incrustado. **Material em cultura:** 3. Filamentos emaranhados. 4-7. Desenvolvimento da célula apical: 4. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 5-6. Célula apical cônico-arredondada; 7. Célula apical levemente capitada e bainha mucilaginosa. 8. Necrídio. 9. Detalhe da quebra do tricoma. 10. Hormogônios. Escalas 10 μ m, exceto figura 3= 50 μ m.



Prancha 11, Figuras 1-7 CCIBt 3571, *Wilmottia* sp.: 1. Cachoeira onde o material foi coletado. **2-7. Material em cultura:** 2. Filamentos emaranhados. 3. Tricoma flexuoso; 4-7. Desenvolvimento da célula apical: 4. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 5. Célula apical cônico-arredondada; 6. Célula apical levemente; 7. Bainha mucilaginosa. Escalas 10 μm , exceto figura 2= 50 μm .

4.7. “*Microcoleus steenstrupii*” (Clado F)

Dentre as populações analisadas neste estudo, CCIBt 3468 e 3570 correspondem às morfoespécies *Phormidium inundatum* Gomont e *P. papyraceum* Gomont, respectivamente. Entretanto, filogeneticamente ambas as linhagens apresentaram-se relacionadas à *Microcoleus steenstrupii* HTT-U-KK5 e *Microcoleus steenstrupii* SAG 2212, designadas por Siegesmund *et al.* (2008).

“*Microcoleus steenstrupii*” I

Prancha 12, Figuras 1-7 (CCIBt 3468)

Filamentos emaranhados. Tricomas retos ou flexuosos, não atenuados ou curvos no ápice, levemente constrictos, sem movimento. Bainha mucilagínosa hialina, firme e estreita. Células isodiamétricas. Célula distintamente longa, cônico-arredondada. Conteúdo celular verde-azulado, homogêneo. Reprodução por hormogônios formados a partir da fragmentação do tricoma.

Dimensões Celulares	CCIBt 3468
Largura dos tricomas (µm)	
Cultura	4,2 – 5,2 (4,8)
Comprimento celular (µm)	
Cultura	4,0 – 5,6 (4,8)
Razão largura/comprimento	
Cultura	0,9 – 1,2 (1,0)
Comprimento célula apical (µm)	
Cultura	7,8- 10,0 (9,0)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Corumbá (MS), Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **CCIBt 3468** (SP427.931) - Material coletado sobre solo úmido.

“*Microcoleus steenstrupii*” II

Prancha 12, Figuras 8-14 (CCIBt 3570)

Filamentos emaranhados. Tricomas retos ou flexuosos, não atenuados ou curvos no ápice, levemente constrictos, sem movimento. Bainha mucilagínosa hialina, firme e estreita. Células isodiamétricas. Célula longa, cônico-arredondada, as vezes levemente capitada. Conteúdo castanho-escuro, homogêneo. Reprodução por hormogônios formados a partir da fragmentação do tricoma.

Dimensões Celulares	CCIBt 3570
Largura dos tricomas (μm)	
Cultura	4,2 – 5,6 (4,7)
Comprimento celular (μm)	
Cultura	3,5 – 5,0 (4,2)
Razão largura/comprimento	
Cultura	0,9 – 1,3 (1,1)
Comprimento célula apical (μm)	
Cultura	5,3 – 7,9 (6,8)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Vale do Ribeira (SP), Estação Ecológica Juréia-Itatins. **CCIBt 3570** (SP428.679) – Material coletado sobre solo úmido.

Ambas as populações analisadas (CCIBt 3468 e 3570) apresentaram aspectos morfológicos muito similares: dimensões celulares, tricomas retos ou flexuosos, levemente constrictos, não atenuados ou curvos no ápice. Entretanto, estas linhagens se diferenciaram principalmente em relação à célula apical. A linhagem CCIBt 3468 apresentou célula apical longa (7,8 - 10,0 μm), distintamente cônico-arredondada e tricomas verde-azulados, como descrito para *P. inundatum* (Komárek & Anagnostidis 2005). Por outro lado, CCIBt 3570 possui célula apical mais curta (5,3 - 7,9 μm), cônico-arredondada e levemente capitada no ápice, exatamente como ilustrado por Komárek & Anagnostidis (2005, figura 619b) para *P. papyraceum*. Além disso, ambas as populações analisadas apresentaram coloração do tricoma distinta, sendo verde-azulado em CCIBt 3468 e castanho-escuro em CCIBt3570. Em termos ecológicos, ambas as populações analisadas concordaram com as descrições das respectivas espécies, que podem ocorrer tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres.

Apesar da similaridade morfológica dessas morfoespécies com o gênero *Phormidium*, ambas as linhagens analisadas mostraram-se relacionadas à *Microcoleus steenstrupii* HTT-U-KK5 e *Microcoleus steenstrupii* SAG 2212, de acordo com a análise filogenética do gene 16S RNAr (Figura 18, Clado F). No que se refere a *Phormidium sensu stricto* (Clado C) este clado apresentou identidade abaixo de 92,2 %, confirmando que CCIBt 3468 e CCIBt3570 não pertencem a este gênero.

Em termos morfológicos, ambas as linhagens analisadas assemelham-se à *Microcoleus steenstrupii* Boye-Petersen. Entretanto, a linhagem CCIBt 3570 apresenta célula apical diferente (levemente capitada) do que foi descrito para esta espécie e, provavelmente, trata-se de uma entidade distinta, uma vez que a morfologia da célula apical tem se mostrado extremamente importante para a caracterização dos táxons. Além disso, tanto a linhagem CCIBt 3468 como CCIBt 3570 apresentaram apenas um tricoma por bainha mucilaginosa, diferindo desta morfoespécie, que é caracterizada por possuir mais que um. Apesar disto, como citado anteriormente (*Microcoleus sensu stricto*, Clado A), diversos estudos têm demonstrado que o número de tricomas no interior da bainha mucilaginosa não é congruente com a filogenia (Boyer *et al.* 2002, Palinska & Marquardt 2008, Siegesmund *et al.* 2008, Strunecký *et al.* 2010, 2012a, b e Hašler *et al.* 2012, Martins 2014). Neste contexto, morfoespécies do complexo *Phormidium autumnale* foram transferidas para o gênero *Microcoleus* (Clado A, item 4.2).

Filogeneticamente, o clado *Microcoleus steenstrupii* apresentou identidade entre 91,5% e 93% com *Microcoleus sensu stricto* (Clado A) e, portanto, também não deve ser considerado como este gênero. Assim, é possível concluir que o Clado F, designado neste estudo, representa um novo gênero para a ciência, uma vez que apresentou alto suporte filogenético (99% NJ, ML e 1 de probabilidade posterior) e mostrou-se distante tanto do gênero *Phormidium* quanto de *Microcoleus*.

Internamente ao Clado F, as linhagens brasileiras apresentaram-se em um subclado distinto com *Microcoleus steenstrupii* HTT-U-KK5 e *Microcoleus* sp. PCC 7113 (Figura 18, subclado D), cuja identidade entre todas as linhagens foi igual a 100%. Por outro lado, *Microcoleus steenstrupii* SAG 2212 apresentou-se em um ramo isolado, irmão ao subclado I. A relação interespecífica neste clado foi avaliada a partir da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S (Figura 19). Entretanto, esta avaliação foi parcial, uma vez que somente a linhagem *Microcoleus* sp. PCC 7113 apresentou esta região gênica sequenciada.

A estrutura secundária das regiões D1D1', Box B e V3 referentes às linhagens CCIBt 3468 e *Microcoleus* sp. PCC 7113 apresentaram-se conservadas, indicando que ambas as populações devem tratar-se de uma mesma espécie. Por outro lado, a linhagem CCIBt 3570, apresentou estruturas secundárias divergentes, e pode ser caracterizada como uma espécie

distinta da linhagem CCIBt 3468, corroborando os resultados morfológicos obtidos. Ressalta-se que as linhagens analisadas não apresentaram sequencias correspondentes aos dois RNA transportadores (RNA^t^{Ile} e RNA^t^{Ala}).

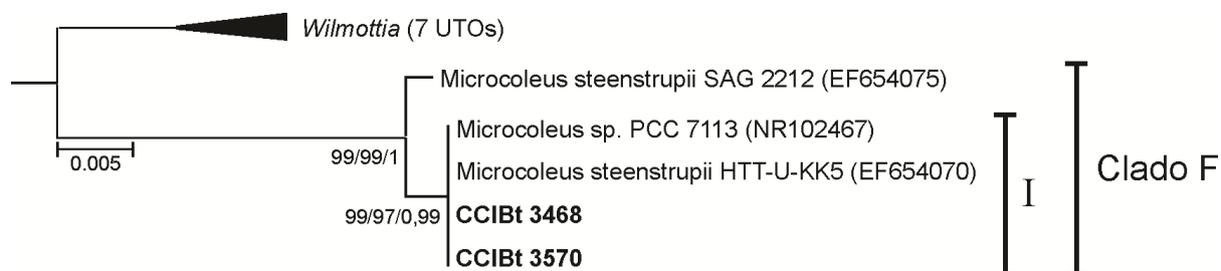


Figura 18. Detalhe do clado “*Microcoleus steenstrupii*” (**Clado F**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

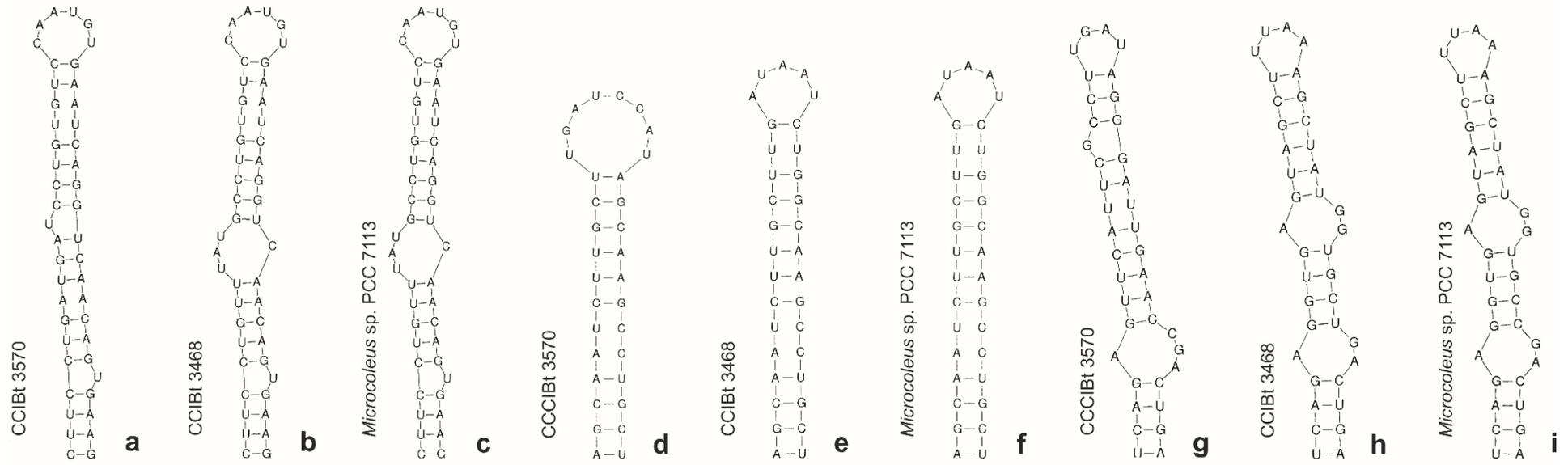
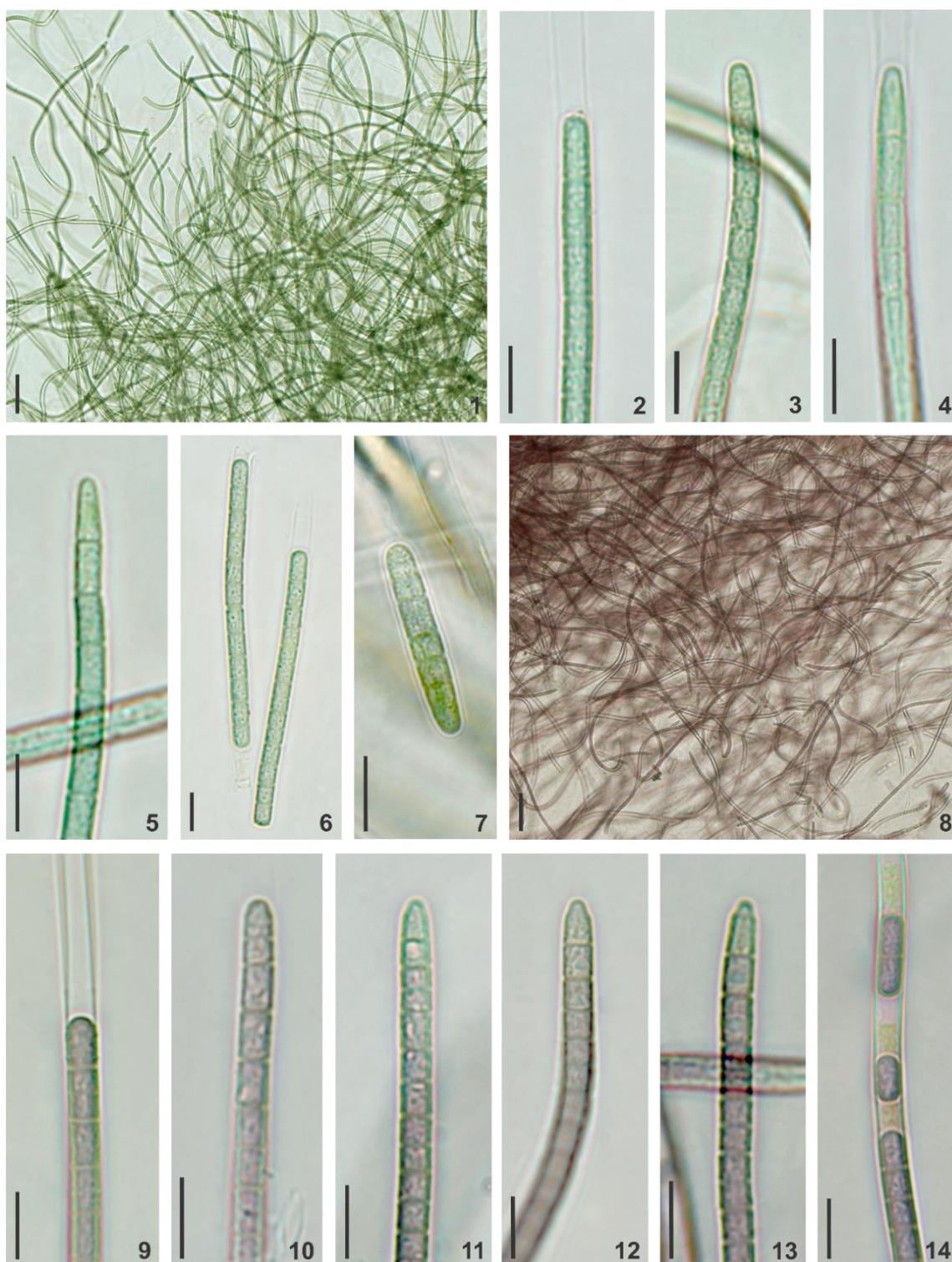


Figura 19. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S rRNAr. **a-c.** Região D1D1'; **d-f.** Região Box B; **g-i.** Região V3.



Prancha 12, Figuras 1-7. CCIBt 3468, “*Microcoleus steenstrupii*” I (Material Cultura): Filamentos emaranhados; 2-5. Desenvolvimento da célula apical: 2. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma e bainha mucilaginosa; 4-5. Célula apical cônico-arredondada, completamente desenvolvida. 6-7. Hormogônios; **8-14. CCIBt 3570, “*Microcoleus steenstrupii*” II (Material em cultura):** 8. Filamentos emaranhados; 9-13. Desenvolvimento da célula apical: 9. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma e detalhe da bainha mucilaginosa; 13. Célula apical cônico-arredondada e levemente capitada no ápice, completamente desenvolvida; 14. Hormogônios. Escalas 10 μm , exceto figuras 1 e 8= 50 μm .

4.8. *Phormidium aerugineo-caeruleum* (Clado G)

Dentre as linhagens analisadas neste estudo, a linhagem CCIBt 3465 apresentou morfologia relacionada à *Phormidium aerugineo-caeruleum* (Gomont) Anagnostidis et Komárek.

Phormidium aerugineo-caeruleum (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 407. 1988.

Basônimo: *Lyngbya aerugineo-caerulea* Gomont, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Sér. 7, v. 16, p 146. 1892.

Prancha 13, Figuras 1-12 (CCIBt 3465)

Filamentos dispostos em feixes. Tricomas retos, não atenuados, geralmente não constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa hialina, firme e estreita. Células subquadráticas. Célula apical cilíndrico-arredondada, às vezes levemente cônico-arredondada, geralmente não capitada. Conteúdo celular verde-azulado, finamente granular, às vezes com grânulos conspícuos. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3465
Largura dos tricomas (µm)	
Natureza	6,9 - 8,4 (7,5)
Cultura	7,5 - 9,3 (9,0)
Comprimento celular (µm)	
Natureza	4,5 - 6,1 (5,1)
Cultura	5,7 - 6,4 (5,9)
Razão largura/comprimento	
Natureza	1,3 - 1,6 (1,5)
Cultura	1,3 - 1,6 (1,5)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Cananéia (SP), Parque Estadual da Ilha do Cardoso. **CCIBt 3465** (SP 427.790, SP427.791) - Massa sobre tronco submerso e sobre solo no Rio Perequê. Filamentos entre *Geitlerinema splendidum* (Gomont) Anagnostidis.

Morfologicamente a população analisada concorda com a diagnose original de *Phormidium aerugineo-caeruleum* (Gomont) Anagnostidis & Komárek descrita por Gomont (1892) e com o material brasileiro documentado por diversos autores (Sant'Anna & Azevedo

1995, Nechi Jr. *et al.* 1997 e Branco *et al.* 1997, Branco *et al.* 1999), diferindo apenas em relação ao diâmetro do tricoma. O material analisado apresenta diâmetro de 6,9-9,3 μm , superior ao encontrado em literatura (3 - 6,8 (7,5) μm).

De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), *P. aerugineo-caeruleum* ocorre em ambientes de água doce, bentônico e epifítico em águas correntes ou estagnadas e, frequentemente, sobre plantas mortas, como é o caso do material analisado que foi encontrado formando massas sobre tronco submerso em um ambiente lótico com lento fluxo de água (prancha 13, figura 1-2).

Em relação ao material brasileiro, Nechi Jr. *et al.* (1997) e Branco *et al.* (1999) documentaram esta espécie para ambientes lóticos do Estado de São Paulo, enquanto Sant'Anna & Azevedo (1995) encontraram-na em águas estagnadas na mesma área. Além disso, Branco *et al.* (1997) registraram a espécie em áreas de mangue, também do estado de São Paulo.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, CCIBt 3465 apresentou-se em um clado bem definido com linhagens identificadas como *Phormidium aerugineo-caeruleum* (Figura 20, Clado G). Este clado apresentou alto suporte filogenético (99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior) e a identidade entre as todas as linhagens foi acima de 97%. Em relação aos demais clados analisados neste estudo (Figura 4), incluindo *Phormidium sensu stricto* (Clado C), o Clado G apresentou identidade abaixo de 94%. Deste modo, nossos resultados indicaram o clado *Phormidium aerugineo-caeruleum* como um putativo gênero novo para a ciência.

Internamente, o clado G apresentou um subclado bem definido (I) formado pelas linhagens de *Phormidium aerugineo-caeruleum* disponíveis no GenBank. A linhagem estudada apresentou-se em um ramo isolado, irmão ao subclado I. Possivelmente, esta linhagem trata-se de uma nova entidade dentro de *Phormidium aerugineo-caeruleum*. Porém, a relação entre estas populações deve ser avaliada a partir de diferentes marcadores moleculares.

A relação filogenética a partir de outros fragmentos gênicos (*rbcLX* e *rpoC1*) não pode ser avaliada, uma vez que não há sequências disponíveis para comparação nos bancos públicos. Além disso, as linhagens incluídas no clado de *Phormidium aerugineo-caeruleum* não apresentam o espaçador intergênico 16S-23S RNAr sequenciado. Apesar disso, a estrutura secundária desta região foi avaliada para a linhagem CCIBt 3465 e será apresentada neste estudo (Figura 21). Ressalta-se que a linhagem estudada apresenta apenas o RNAt^{lle}.

Vale ressaltar que as estruturas secundárias referentes à linhagem CCIBt3465 foram similares às duas populações brasileiras de *Phormidium aerugineo-caeruleum* (1CP e 2CP) descritas por Martins (2014). A identidade (16S RNAr) de ambas as linhagens descritas pela

autora foi de 98,7% quando comparada com *Phormidium aerugineo-caeruleum* MED-28, incluída no subclado I (Figura 20).

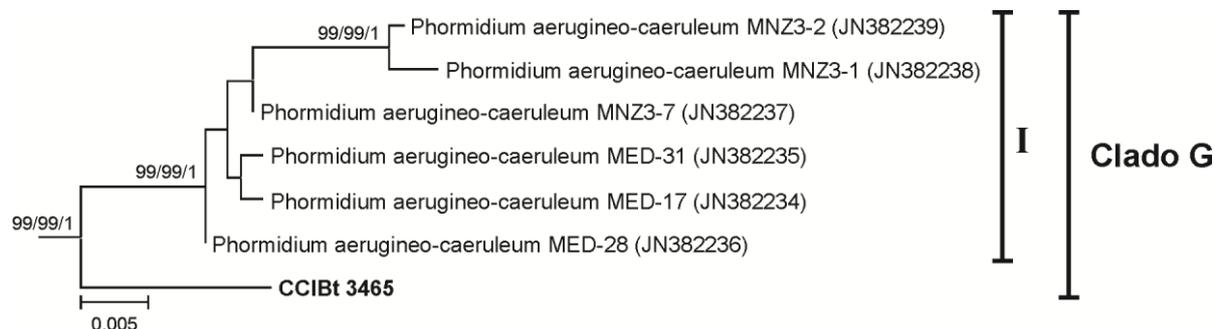


Figura 20. Detalhe do clado *Phormidium aerugineo-caeruleum* (**Clado G**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model + G + I, 1000x*). A sequência gerada neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

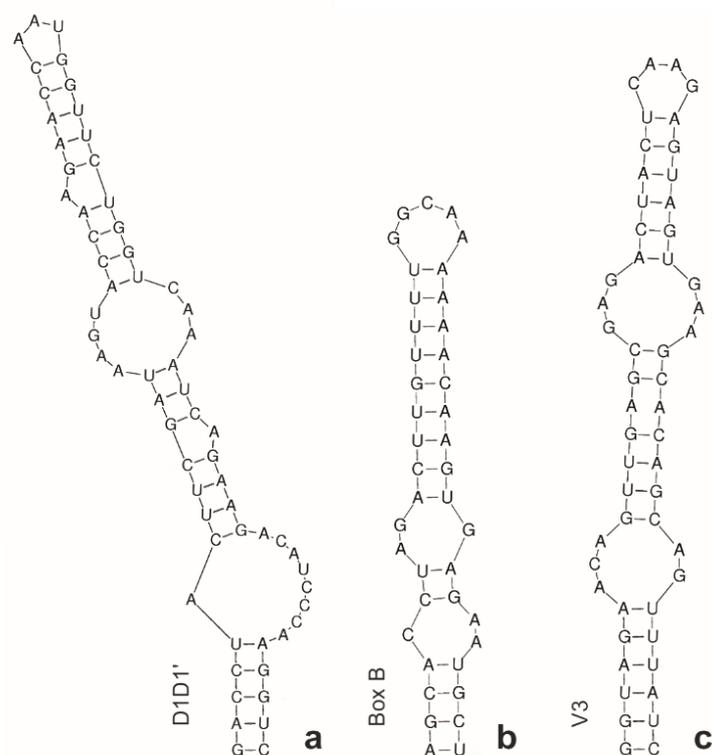
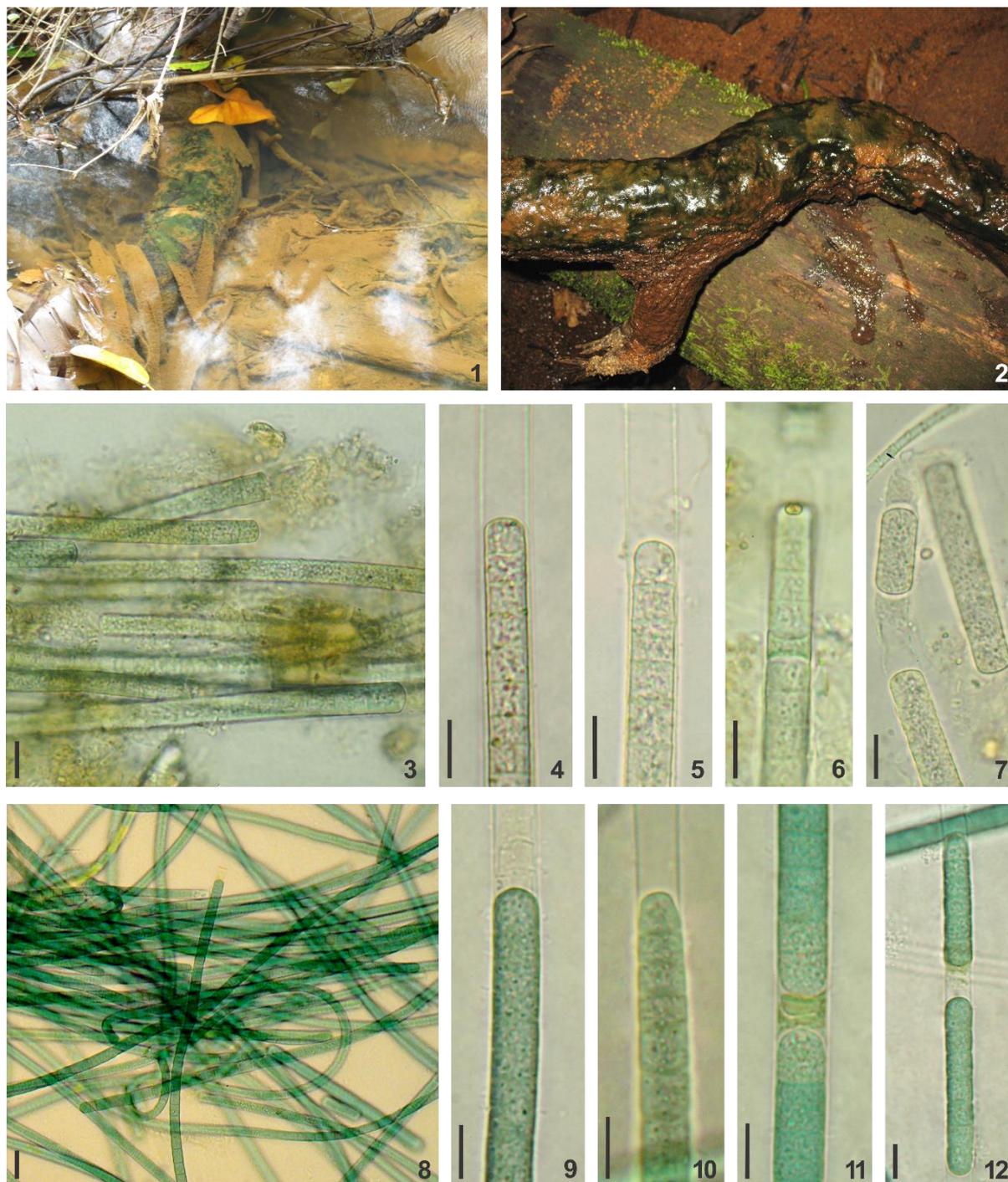


Figura 21. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr referente a linhagem CCIBt 3465. **a.** Região D1D1'; **b.** Região Box B; **c.** Região V3.



Prancha 13, Figuras 1-12. CCIBt 3465, *Phormidium aerugineo-caeruleum*: 1. Talo macroscópico sob tronco submerso no Rio Perequê; 2. Detalhe do talo macroscópico; 3-7. **Material da natureza:** 3. Filamentos em feixes; 4. Célula apical cilíndrico-arredondada e bainha mucilaginosa; 5. Detalhe da célula apical levemente capitada; 6. Necrídios; 7. Hormogônios em formação; 8-12. **Material em cultura:** 8. Filamentos em feixes; 9. Aspecto geral do tricoma e bainha mucilaginosa; 10. Célula apical levemente côncavo-arredondada; 11. Necrídio; 12. Hormogônios. Escalas 10 μm , exceto figura 8= 20 μm .

4.9. *Phormidium terebriforme* I (Clado H)

Dentre as linhagens analisadas neste estudo, duas populações apresentaram morfologia relacionada à espécie *Phormidium terebriforme*, corroborando os dados filogenéticos obtidos a partir da análise do gene 16S RNAr: CCIBt 3322 e 3309, isoladas a partir de amostras coletadas em distintas lagoas alcalinas no Pantanal da Nhecolândia.

Phormidium terebriforme (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 406. 1988.

Basônimo: *Oscillatoria terebriformis* Gomont, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Sér. 7, v. 16, p. 234. 1892.

Prancha 14, Figuras 1-8 (CCIBt 3309)

Prancha 15, Figuras 1-10 (CCIBt 3322)

Tricomas dispostos em feixes, retos ou flexuosos, levemente atenuados e curvos no ápice, levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa ausente. Células subquadráticas. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular verde-azulado, finamente granular, às vezes com grânulos conspícuos nos septos. Reprodução por hormogônios sigmóides formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3309	CCIBt 3322
Largura dos tricomas (µm)		
Natureza	-	3,3 - 4,3 (3,9)
Cultura	4,2-5,0 (4,7)	4,3 - 5,0 (4,7)
Comprimento celular (µm)		
Natureza	-	2,4 - 3,4 (2,9)
Cultura	2,3-3,1 (2,7)	2,9 - 3,8 (3,2)
Razão largura/comprimento		
Natureza	-	0,7 - 0,9 (1,3)
Cultura	0,5 - 0,7 (1,6)	0,6 - 0,8 (1,4)

* Média entre parênteses

Material analisado: Corumbá (MS), Pantanal da Nhecolândia. **CCIBt 3309** (SP400869) - Fazenda Nhumirim, Lagoa Salina da Ponta, material coletado com rede de plâncton. **CCIBt 3322** (SP427.781, SP427.782) - Fazenda Firme, Lagoa Salina Rondon, material coletado sobre lama na região litorânea da lagoa.

Ambas as linhagens analisadas (CCIBt 3322 e 3309) neste estudo assemelham-se a *Phormidium terebriforme* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, tanto em termos morfológicos quanto ecológicos. De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), *P. terebriforme* é tipicamente bentônica, sendo comumente encontrada no litoral de lagos, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Em concordância, a linhagem CCIBt 3322 foi isolada a partir de massas (Prancha 15, figura 2) crescendo na região litorânea de uma lagoa alcalina no Pantanal brasileiro. No que se refere a linhagem CCIBt 3309, os organismos foram isolados a partir de amostra planctônica e se desenvolveram apenas em cultivo. Entretanto, acredita-se que esta população também seja capaz de formar massas, uma vez que as lagoas alcalinas no Pantanal são similares.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, ambas as populações estudadas formaram um clado com linhagens identificadas como *P. terebriforme* e com a cepa brasileira *Phormidium* sp. CENA 525 (Figura 22, Clado H). Este clado apresentou alto suporte filogenético a partir dos métodos evolutivos empregados: 99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior. Além disso, a identidade entre as linhagens foi acima de 99,0%. Uma linhagem não cultivável foi incluída na análise devido à alta identidade (99,1%) com as populações estudadas. Ressalta-se, que *Phormidium* sp. CENA 525, apresenta aspectos morfológicos semelhantes as linhagens CCIBt 3309 e 3322 (Andreote *et al.* 2014).

Em relação aos ramos internos do Clado H, ambas as linhagens analisadas formaram um subclado bem definido (99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior) com *Phormidium terebriforme* KR2003/25 e *Phormidium* sp. CENA 525 (Figura 22, subclado I). A identidade entre estas linhagens foi acima de 99,3%. Apesar disso, a relação interespecífica entre estes táxons não pode ser considerada a partir do gene 16S RNAr, uma vez que este marcador é altamente conservado (Fox *et al.* 1992, Boyer *et al.*, 2001, 2002).

A relação filogenética a partir de outros marcadores (*rpoC1* e *rbcLX*) não pode ser avaliada, uma vez que não há sequências disponíveis para comparação nos bancos públicos. Além disso, as linhagens incluídas no clado de *Phormidium terebriforme* não possuem o espaçador intergênico 16S-23S RNAr sequenciado. Apesar disso, a estrutura secundária desta região foi avaliada para as linhagens CCIBt 3309 e 3322 e será apresentada neste estudo (Figura 23).

A partir desta análise, observou-se que as regiões D1D1' e V3 apresentaram-se conservadas em ambas as linhagens. Por outro lado, a região Box B da linhagem CCIBt 3322 apresentou um loop na porção inicial da hélice, além de alguns nucleotídeos divergentes quando comparada com a estrutura da cepa CCIBt 3309. Apesar disso, acredita-se que ambas as

linhagens devem ser consideradas como uma mesma espécie, corroborando as análises morfológicas. Vale ressaltar que ambas as linhagens analisadas apresentaram apenas o RNA^t_{le}.

Por fim, conclui-se que o clado *Phormidium terebriforme* (Clado H) deve ser considerado como um novo táxon para a ciência, pois apresenta alto suporte filogenético e baixa identidade com *Phormidium sensu stricto* (Figura 4, Clado C) e demais grupos analisados neste estudo (abaixo de 91,2%).

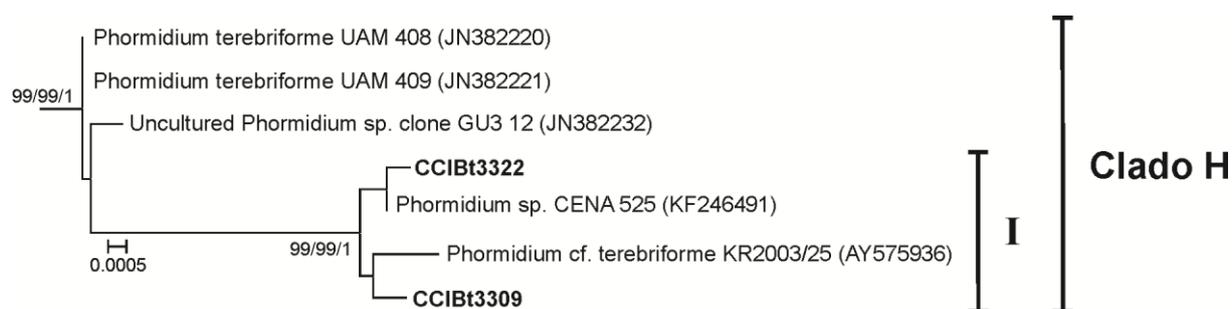


Figura 22. Detalhe do clado *Phormidium terebriforme* (Clado H) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

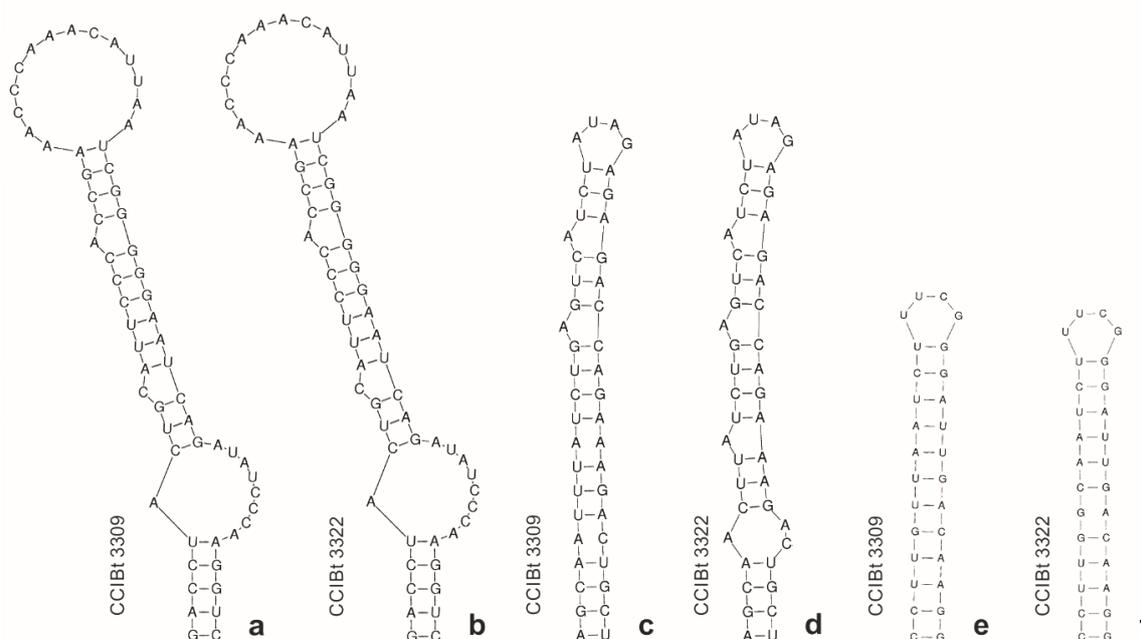
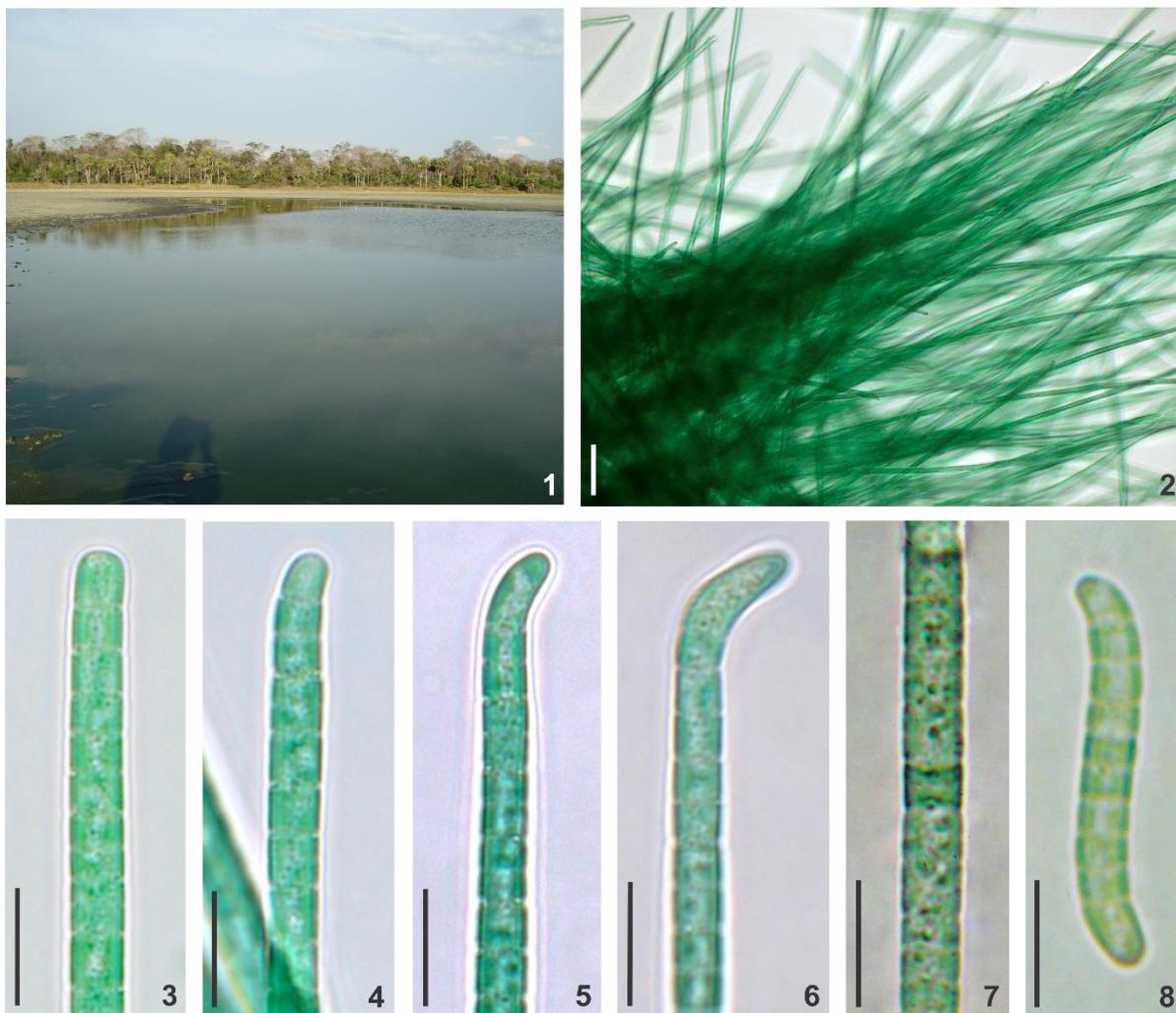
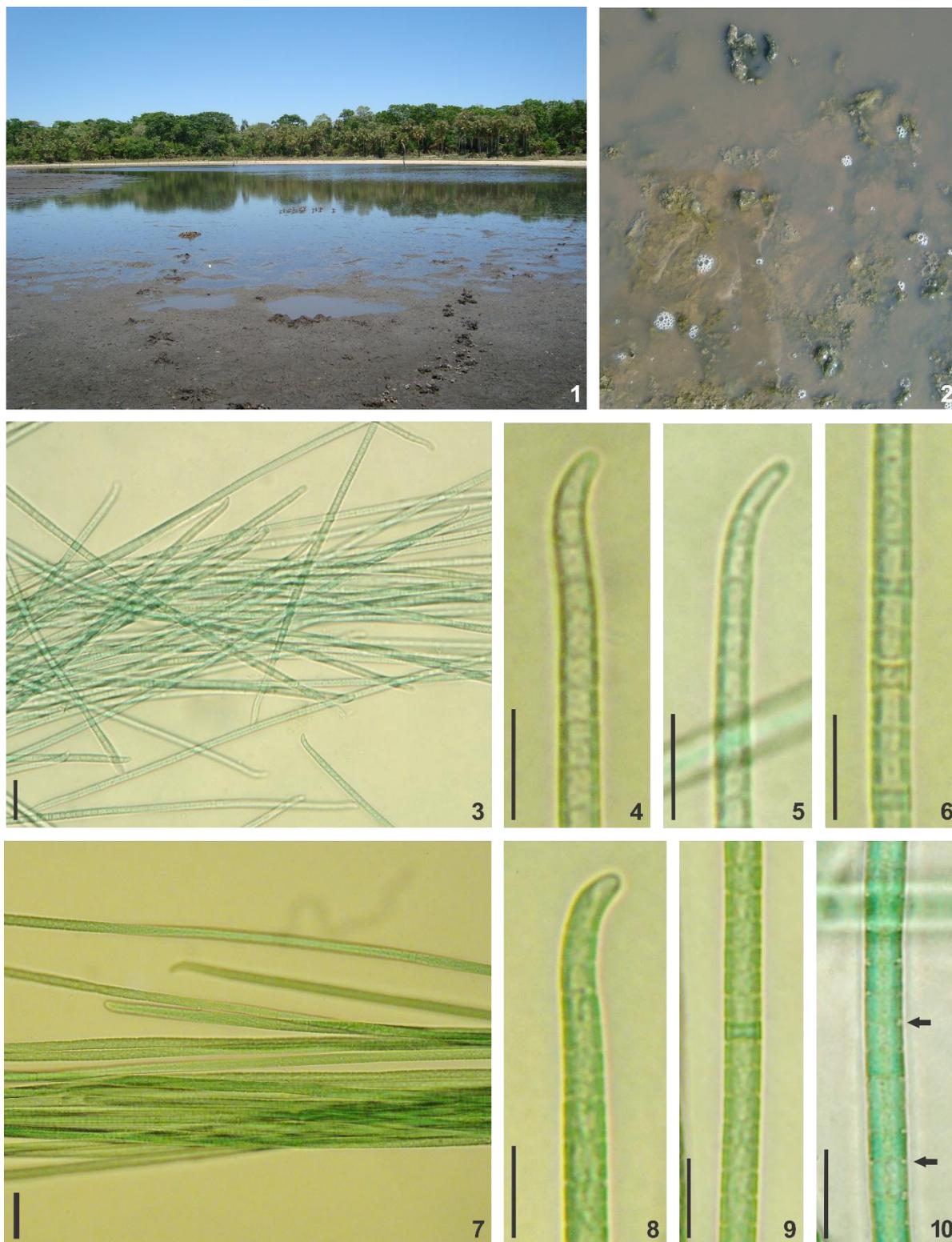


Figura 23. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr das cepas CCIBt 3309 e 3322. **a-b.** Região D1D1'; **c-d.** Região Box B; **e-f.** Região V3.



Prancha 14, Figuras 1-8. CCIBt 3309, *Phormidium terebriforme* I: 1. Lagoa Salina da Ponta onde o material foi coletado; **2-5. Material em Cultura:** 2. Tricomas dispostos em feixes; 3-6. Desenvolvimento da célula apical: 3. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 4. Tricomas curvos no ápice; 5. Célula apical cônico-arredonda. 6. Célula apical completamente desenvolvida; 7. Necrídio; 8. Hormogônios sigmóides. Escalas 10 μm , exceto figura 2= 50 μm .



Prancha 15, Figuras 1-10. CCIBt 3322, *Phormidium terebriforme* I: 1. Lagoa Salina Rondon onde o material foi coletado; 2. Talo macroscópico sobre a lama na região mais rasa da lagoa; **3-6. Material da natureza:** 3. Tricomas dispostos em feixes; 4. Célula apical cônico-arredondada. 5. Tricomas levemente atenuados e curvos no ápice; 6. Necrídios; **7-10. Material em Cultura:** 7. Tricomas dispostos em feixes; 8. Detalhe da célula apical cônico-arredondada; 9. Necrídio; 10. Detalhe de grânulos conspícuos nos septos (setas). Escalas 10 μm , exceto figura 3 e 7= 20 μm .

4.10. *Desertifilum* Dadheech (Clado I)

Dentre as linhagens analisadas neste estudo, duas populações apresentaram morfologia relacionada ao gênero monoespecífico *Desertifilum* (*D. tharense*), recentemente proposto por Dadheech *et al.* (2012): CCIBt 3265 e 3275, isoladas de uma lagoa alcalina do Pantanal da Nhecolândia. Ressalta-se que estas linhagens foram coletadas na mesma lagoa, porém em períodos distintos (maio/2007 e abril/2008, respectivamente).

Desertifilum tharense Dadheech *et al.*, *Phycologia*, v. 51, p. 263. 2012.

Prancha 16, Figuras 1-7 (CCIBt 3265) e Figuras 8-14 (CCIBt 3275)

Filamentos dispostos em feixes. Tricomas retos, levemente atenuados e curvos no ápice (em forma de gancho), levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa hialina, firme e estreita. Células aproximadamente isodiamétricas. Célula apical longa, cônico-arredondada. Conteúdo celular verde-azulado, homogêneo. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3265	CCIBt 3275
Largura dos tricomas (µm)		
Cultura	2,8-3,4 (3,1)	3,2-3,7 (3,5)
Comprimento celular (µm)		
Cultura	2,4-3,7 (3,1)	2,4-3,9 (2,8)
Razão largura/comprimento		
Cultura	0,9-1,2 (1,0)	0,9- 1,5 (1,1)
Comprimento célula apical (µm)		
Cultura	6,0-9,8 (7,4)	4,5-7,4 (6,3)

* Média entre parênteses

Material examinado: Corumbá (MS), Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Lagoa Salina da Ponta. **CCIBt 3265** (SP427.778), **CCIBt 3275** (SP400.857) - Material coletado com rede de plâncton.

Morfologicamente, as linhagens CCIBt 3265 e 3275 caracterizam-se por apresentar tricomas relativamente estreitos (2,8-3,7 µm de diâmetro), levemente atenuados, curvos no ápice e célula apical longa, cônico-arredondada. A característica diagnóstica de ambas as linhagens (ápice em forma de “gancho”; Prancha 16, figuras 4-5 e 11-12) diferenciaram-nas de

todas as espécies já descritas para *Phormidium*. Entretanto, ambas as linhagens concordaram plenamente com a descrição de *Desertifilum* (Dadheech *et al.* 2012).

De acordo com Dadheech *et al.* (2012), *Desertifilum* pertence a ordem Oscillatoriales e, apesar da semelhança morfológica com gêneros da família Phormidiaceae, difere em termos evolutivos (filogenia do gene 16S RNAr) e em relação ao arranjo dos tilacóides. *Phormidium*, por exemplo, apresenta tilacóides radiais, enquanto em *Desertifilum* os mesmos são parietais. A posição dos tilacóides não foi avaliada para as linhagens CCIBt 3265 e 3275.

Em termos ecológicos, tanto as populações estudadas como *Desertifilum tharense* Dadheech *et al.* podem ser consideradas extremófilas. No entanto, as linhagens CCIBt 3265 e 3275 foram isoladas em uma lagoa alcalina (pH acima de 11) no Pantanal brasileiro, enquanto *Desertifilum tharense* ocorreu em crostas biológicas de solos desérticos na Índia. Apesar disso, Dadheech *et al.* (2012) indicou que a linhagem tipo *D. tharense* PD2001/TDC17 apresentou crescimento ótimo em temperaturas elevadas (30 - 35 °C), semelhantes àquelas mensuradas nas lagoas alcalinas. Propriedades fisiológicas como tolerância e requerimento a altas temperaturas têm sido descritas como aspectos congruentes com a filogenia de Cyanobacteria (Garcia-Pichel *et al.* 1998, Nübel *et al.* 2000, Miyashita *et al.* 2003).

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, ambas as linhagens analisadas (CCIBt 3265 e 3275) agruparam-se em um clado bem definido com *Desertifilum tharense* (Figura 24, Clado I), corroborando os aspectos morfológicos e ecológicos observados. Este clado apresentou alto suporte filogenético a partir dos métodos evolutivos empregados: 99% NJ e ML, e 1 de probabilidade posterior. Além disso, as linhagens analisadas apresentaram identidade igual a 100% com as quatro populações de *Desertifilum tharense*. Em relação à *Phormidium sensu stricto* (Figura 4, Clado C) a identidade foi abaixo de 90%.

A partir da estrutura secundária das regiões conservadas (D1D1', Box B e V3) do espaçador intergênico 16S-23S foi possível avaliar as relações intraespecíficas em *Desertifilum*. As estruturas correspondentes às regiões D1D1' e V3 foram conservadas neste clado (Figura 25). No que se refere ao Box B, a linhagem CCIBt 3275 apresentou apenas 1 nucleotídeo divergente no loop intermediário da hélice (Figura 25 I, seta). Todas as linhagens deste clado apresentaram os dois RNA transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}).

Deste modo, as linhagens CCIBt 3265 e 3275 podem ser consideradas como *Desertifilum tharense*. A relação filogenética a partir dos marcadores *rpoC1* e *rbcLX* não foi analisada, uma vez que não há sequências de *Desertifilum* passíveis de comparação disponíveis nos bancos públicos.

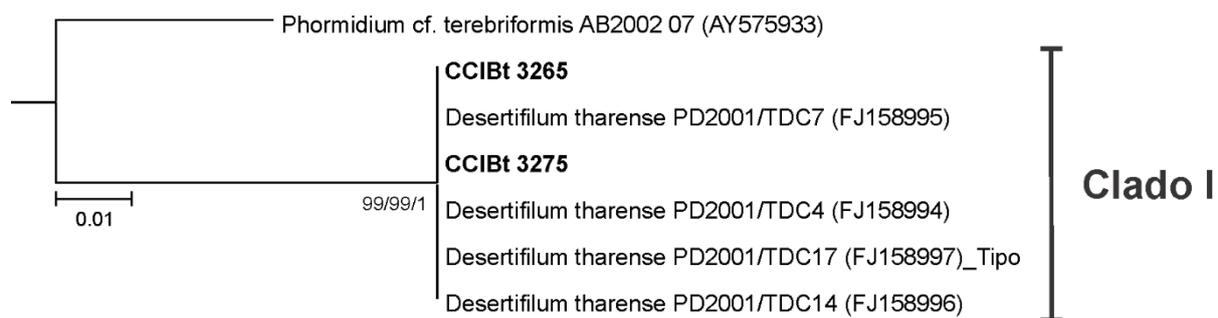


Figura 24. Detalhe do clado *Desertifilum* (**Clado I**) com base na análise filogenética do gene RNAr 16S (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). As sequencias geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

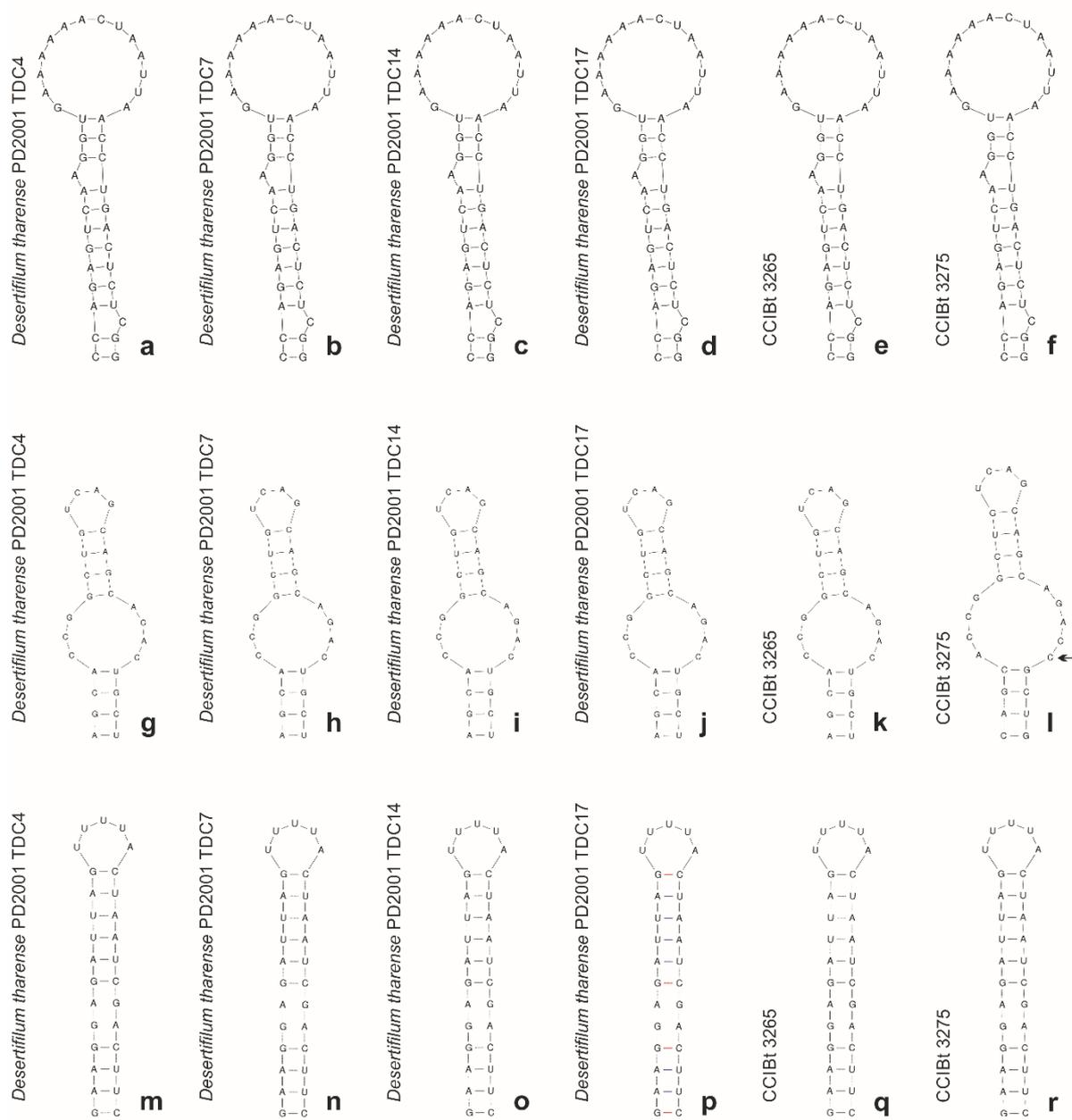
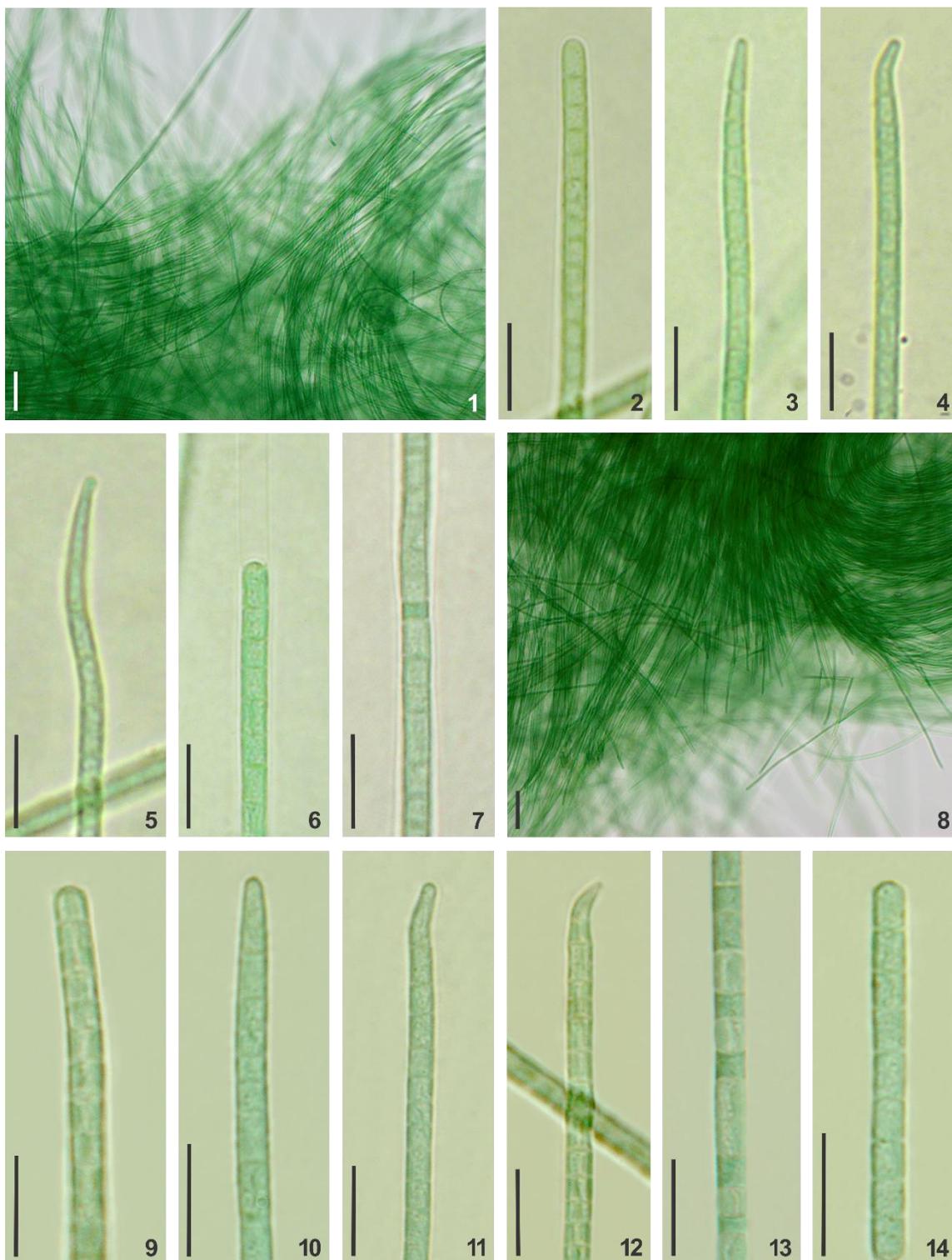


Figura 25. Estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S rRNAr. **a-f.** Região D1D1'; **g-l.** Região Box B; **m-r.** Região V3.



Prancha 16, Figuras 1-14. *Desertifilum tharense*: 1-7. CCIBt 3265 (Material Cultura): 1. Filamentos em feixes; 2-5. Desenvolvimento da célula apical: 2. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 3. Célula apical cônico-arredondada; 4-5. Tricomas levemente atenuados e curvos no ápice (em forma de gancho); 6. Bainha mucilaginosa; 7. Nécridio; **8-14. CCIBt 3275 (Material em cultura):** 8. Filamentos em feixes; 9-12. Desenvolvimento da célula apical: 9. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 10. Célula apical cônico-arredondada; 11-12. Tricomas levemente atenuados e curvos no ápice (em forma de gancho); 13. Nécridios; 14. Hormogônio. Escalas 10 μm , exceto figuras 1 e 8= 50 μm .

4.11. *Phormidium terebriforme* II (Clado J)

Dentre as populações analisadas neste estudo, CCIBt 3281 e 3572 correspondem à morfoespécie *Phormidium terebriforme* (Gomont) Anagnostidis & Komárek e formaram um clado distinto com a linhagem *Phormidium* sp. ETS 05, a partir da análise filogenética do gene 16S RNAr.

Phormidium terebriforme (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 406. 1988.

Basônimo: *Oscillatoria terebriformis* Gomont, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Sér. 7, v. 16, p. 234. 1892. Prancha 17, Figuras 1-5 (CCIBt 3281) e Figuras 6-9 (3572)

Tricomas dispostos em feixes, retos ou flexuosos, levemente atenuados e curvos no ápice, levemente constrictos, móveis. Bainha mucilagínosa ausente. Células subquadráticas a isodiamétricas. Célula apical longa, cônico-arredondada. Conteúdo verde-azulado, finamente granular, às vezes com grânulos conspícuos nos septos. Reprodução hormogônios formados a da fragmentação do tricoma.

Dimensões Celulares	CCIBt 3281	CCIBt 3572
Largura dos tricomas (μm)		
Cultura	3,8 – 4,4 (4,1)	5,1 – 6,4 (5,7)
Comprimento celular (μm)		
Cultura	2,6 – 3,7 (3,1)	3,7 – 5,8 (4,9)
Razão largura/comprimento		
Cultura	1,2 – 1,6 (1,3)	1,0 – 1,4 (1,2)
Comprimento célula apical (μm)		
Cultura	5,6 - 8,9 (7,5)	6,7 – 8,2 (7,6)

* Média entre parênteses

Material analisado: Corumbá (MS). **CCIBt 3281** (SP400.889) – Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Lagoa Salina da Reserva, material coletado com rede de plâncton. **CCIBt 3572** (SP428.681) – Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Lagoa da Medalha, material coletado com rede de plâncton entre plantas aquáticas.

Morfologicamente, CCIBt 3281 e 3572 correspondem à espécie *Phormidium terebriforme*, assim como as linhagens CCIBt 3309 e 3322, inseridas no clado H (item 4.9). Deste modo, todas estas linhagens poderiam ser caracterizadas como uma mesma espécie por compartilhar aspectos morfológicos similares e bem delimitados: tricomas retos ou flexuosos, levemente atenuados e curvos no ápice, levemente constrictos, além de célula apical longa, cônico-arredondada. Entretanto, com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, estas linhagens apresentaram-se em clados distintos (Figura 26).

Como citado anteriormente, as linhagens CCIBt 3309 e 3322 formaram um clado com diversas sequencias designadas como *P. terebriforme* (Figura 26, Clado H), cuja identidade foi acima de 99%. Por outro lado, as linhagens CCIBt 3281 e 3572, apresentaram-se em um clado distante (Figura 26, Clado J) com *Phormidium* sp. ETS-05 que, segundo Berrini *et al.* (2004), assemelha-se à *P. terebrifome*. A identidade entre as linhagens pertencentes ao clado J foi maior que 96%.

Ressalta-se que ambos os clados apresentaram alto suporte filogenético (99% NJ e 99% ML, e 1 de probabilidade posterior) e a identidade entre estes grupos foi abaixo de 91% (Tabela 10). Deste modo, considera-se que os clados H e J devem ser considerados como gêneros distintos, e provavelmente novos para a ciência, uma vez que apresentaram baixa identidade (89,8 – 91,2%) com *Phormidium sensu stricto* (Clado C).

Os mesmos padrões evolutivos foram observados a partir da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (Figura 27). As estruturas referentes às regiões D1D1', BOX B e V3 apresentaram-se totalmente distintas entre os clados H (CCIBt 3309 e 3322) e J (CCIBt 3281). Ressalta-se que as demais linhagens incluídas em ambos os clados não apresentaram o ITS sequenciado. Em relação à linhagem CCIBt 3572, não foi possível obter esta sequencia, mesmo após inúmeras tentativas.

A relação filogenética a partir dos marcadores *rpoC1* e *rbcLX* não foi analisada para os clados H e J, uma vez que não há sequencias de *Phormidium terebriforme* passíveis de comparação disponíveis nos bancos públicos.

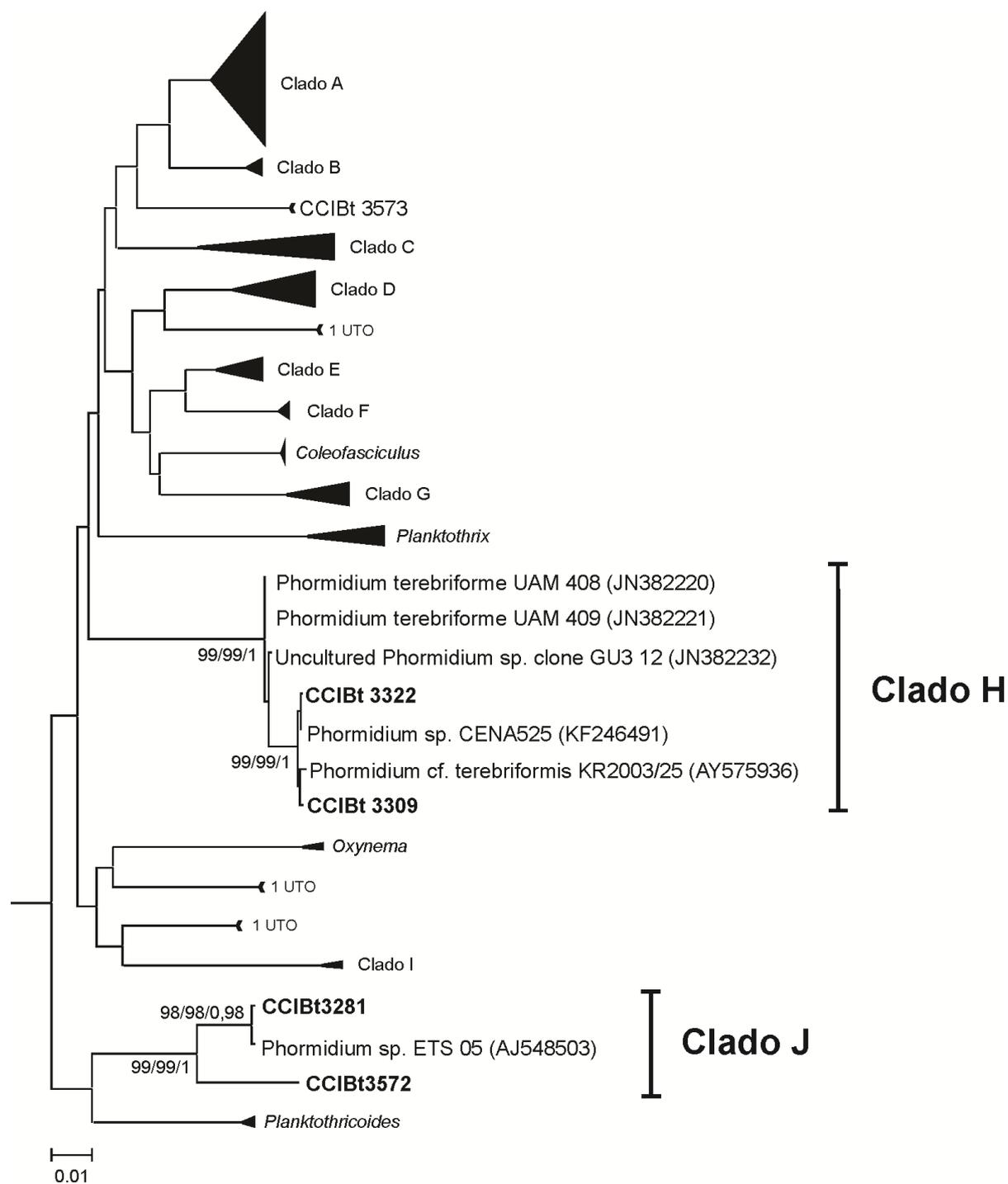


Figura 26. Análise filogenética do gene 16S RNAr (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model + G + I, 1000x*). Detalhe dos clados H e J, correspondentes a morfoespécie *P. terebriforme*. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos (clados em detalhe).

Tabela 10. Identidade (%) entre as sequências de 16S RNAr das linhagens analisadas e outras retiradas do GenBank.

Cyanobacteria		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Clado H	1. CCIBt 3309	–										
	2. CCIBt 3322	99,8	–									
	3. <i>Phormidium</i> sp. CENA 525	99,7	99,9	–								
	4. <i>Phormidium</i> cf. <i>terebriforme</i> KR2003/25	99,3	99,5	99,7	–							
	5. <i>Phormidium terebriforme</i> UAM 408	99,1	99,2	99,3	99,0	–						
	6. <i>Phormidium terebriforme</i> UAM 409	99,1	99,2	99,3	99,0	100	–					
	7. Unculture <i>Phormidium</i> sp. clone GU3 12	99,0	99,1	99,2	98,9	99,9	99,9	–				
Grupo J	8. CCIBt 3281	90,8	90,9	91,0	90,9	90,4	90,4	90,3	–			
	9. CCIBt 3572	89,6	89,7	89,8	90,0	89,8	89,8	89,7	96,0	–		
	10. <i>Phormidium</i> sp. ETS 05	90,8	90,9	91,0	89,6	90,4	90,4	90,3	99,8	96,0	–	
Grupo C	11. <i>Phormidium</i> cf. <i>irrigum</i> CCALA 759	90,8	90,6	90,8	90,9	91,2	91,2	91,1	89,9	89,3	89,8	–

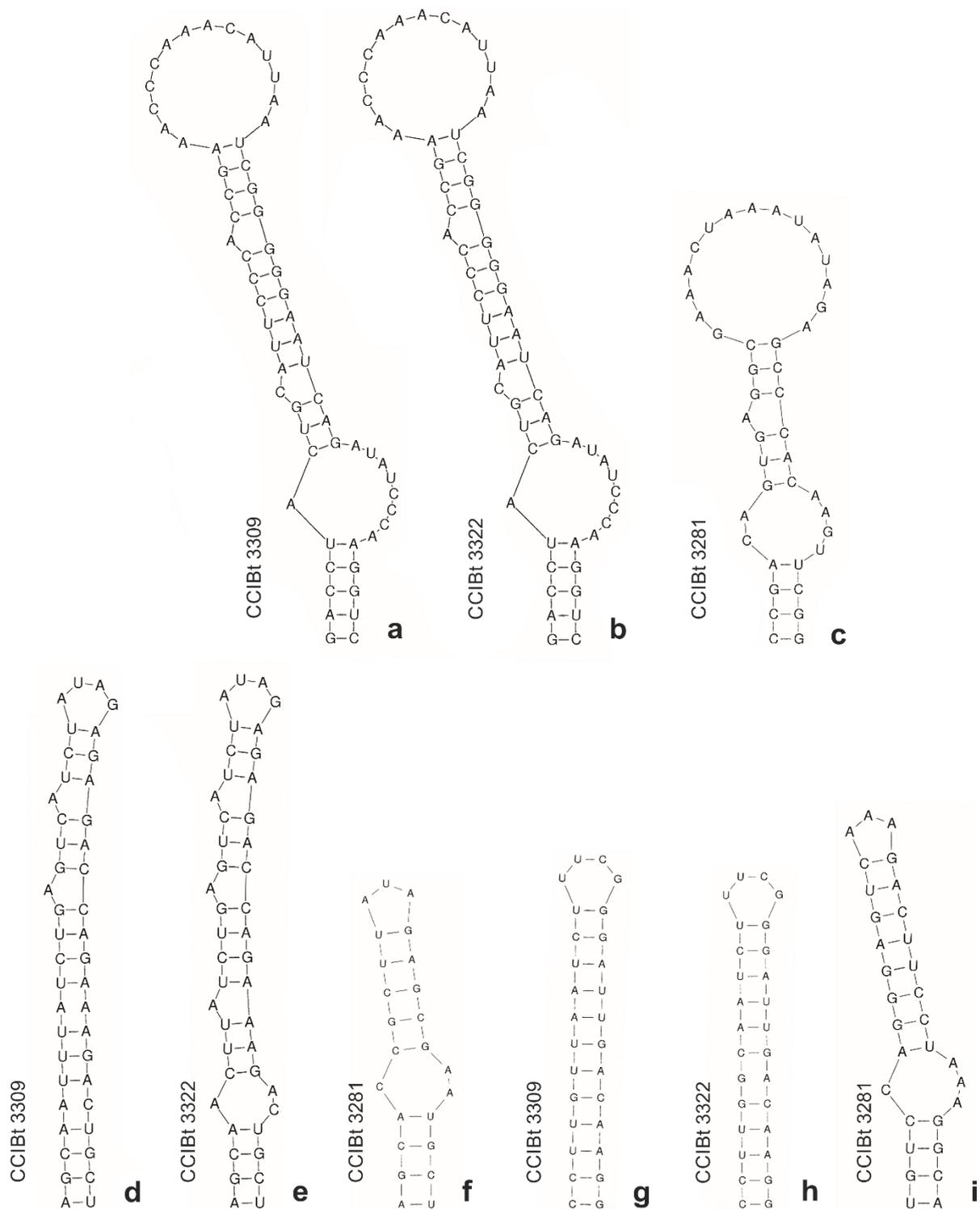
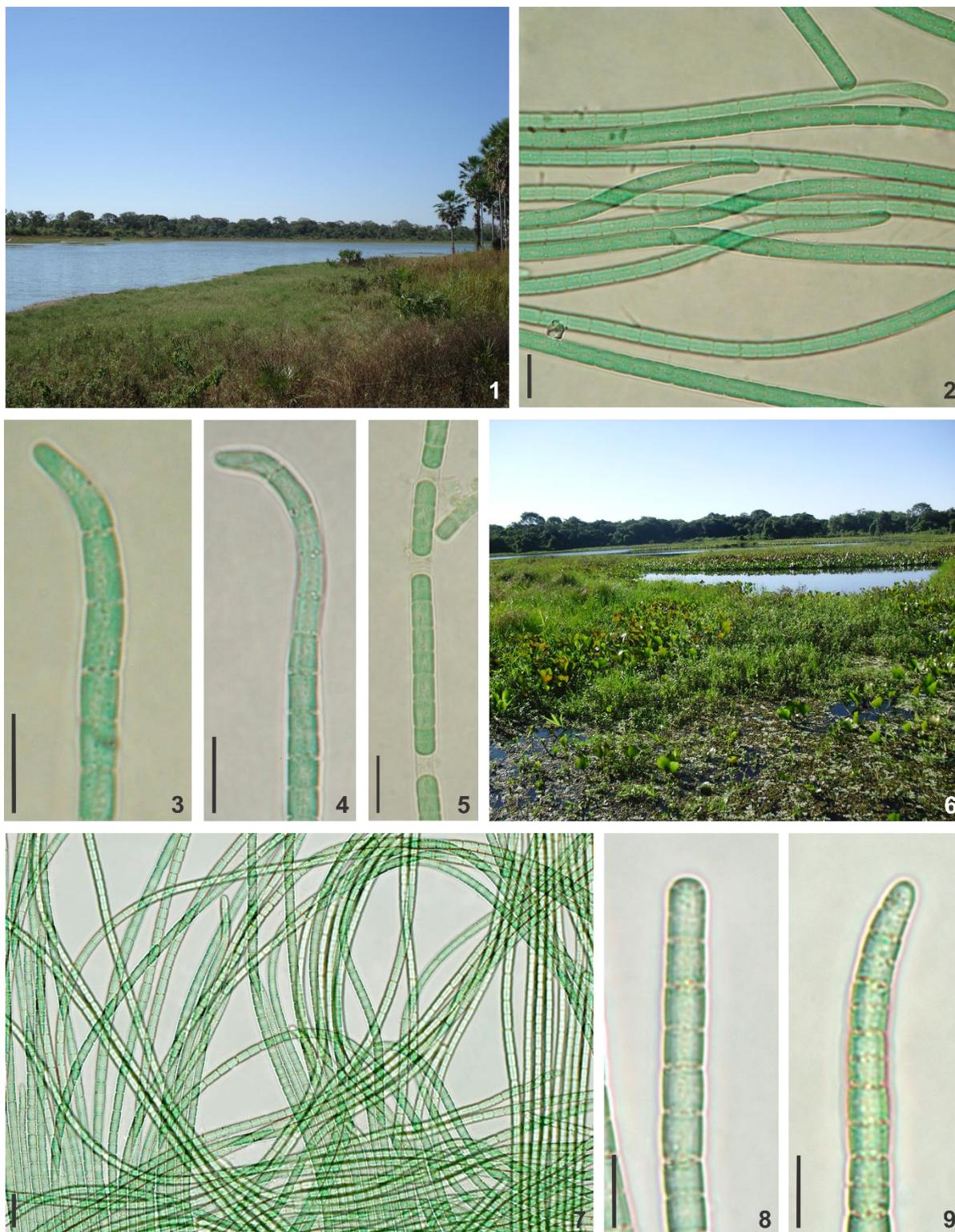


Figura 27. Comparação da estrutura secundária do espaçador intergênico 16S-23S rRNA entre as linhagens CCIBt 3309-3322 (Clado H) e CCIBt 3281 (Clado J). **a-c.** Região D1D1'; **d-f.** Região Box B; **g-i.** Região V3.



Prancha 17, Figuras 1-9. *Phormidium terebriforme* II: 1-5. CCIBt 3281: 1. Lagoa Salina da Reserva, onde o material foi coletado; 2-5. **Material em cultura:** 2. Tricomas dispostos em feixes; 3. Célula apical cônico-arredondada. 4. Tricoma levemente atenuado e curvo no ápice; 5. Hormogônios. **6-9. CCIBt 3572:** 6. Lagoa da Medalha, onde o material foi coletado; **7-9. Material em cultura:** 7. Tricomas dispostos em feixes; 8-9. Desenvolvimento da célula apical: 8. Célula apical arredondada após a quebra do tricoma; 9. Tricoma levemente atenuado/curvo no ápice e detalhe da célula apical cônico-arredondada. Escalas 10 μm , exceto figuras 2 e 7 = 20 μm .

4.12. Demais linhagens

Neste tópico, será discutido a morfologia da linhagem CCIBt 3469 (*Phormidium* cf. *formosum*), cuja sequência do gene 16S RNAr não pode ser obtida e, CCIBt 3573, que apresentou-se em um ramo isolado e distante dos demais grupos filogenéticos analisados neste estudo (Figura 4).

Phormidium cf. *formosum* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 407. 1988.

Basônimo: *Oscillatoria formosa* Gomont, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Sér. 7, v. 16, p. 230. 1892. Prancha 18, Figuras 1-7 (CCIBt 3469)

Tricomas dispostos em feixes, retos, levemente atenuados e curvos no ápice, levemente constrictos, móveis. Bainha mucilaginosa ausente. Células subquadráticas. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular verde-azulado, homogêneo. Reprodução por hormogônios formados a partir de necrídios.

Dimensões Celulares	CCIBt 3469
Largura dos tricomas (µm)	
Cultura	6,9 – 7,7 (7,2)
Comprimento celular (µm)	
Cultura	3,5 – 4,9 (4,0)
Razão largura/comprimento	
Cultura	1,4 – 2,1 (1,8)

* Média entre parênteses

Material Analisado: Cananéia (SP), Parque Estadual da Ilha do Cardoso. **CCIBt 3469** (SP428.687) - Material coletado sobre solo seco (com brita).

Morfologicamente, a linhagem CCIBt 3469 caracteriza-se como representante do grupo morfológico III, descrito por Komárek & Anagnostidis (2005). Dentre as morfoespécies deste grupo, *Phormidium formosum* é o táxon mais semelhante à população analisada. Entretanto, em termos ambientais, o material analisado difere desta morfoespécie por ter sido isolado em amostra de solo seco com brita. De acordo com Gomont (1892), *Phormidium formosum* é tipicamente aquático. Por este motivo a linhagem analisada foi identificada como *Phormidium* cf. *formosum*.

A fim de definir a correta classificação taxonômica desta linhagem, torna-se necessário a análise filogenética a partir do gene 16S RNAr, uma vez que este marcador tem sido amplamente utilizado para a definição genérica em cianobactérias (Fox *et al.* 1992).

Neste estudo foi possível analisar apenas a relação filogenética a partir do gene *rpoC1* (Figura 28), utilizado geralmente para classificação em nível interespecífico (Sciuto *et al.* 2011). Com base nesta análise, a linhagem CCIBt 3469 apresentou-se em um ramo isolado, não relacionado a *Phormidium formosum* (CCIBt 3524, Clado B) e *Phormidium sensu stricto* (Clado C). Deste modo, não foi possível definir a correta classificação taxonômica desta linhagem a partir dos dados apresentados.

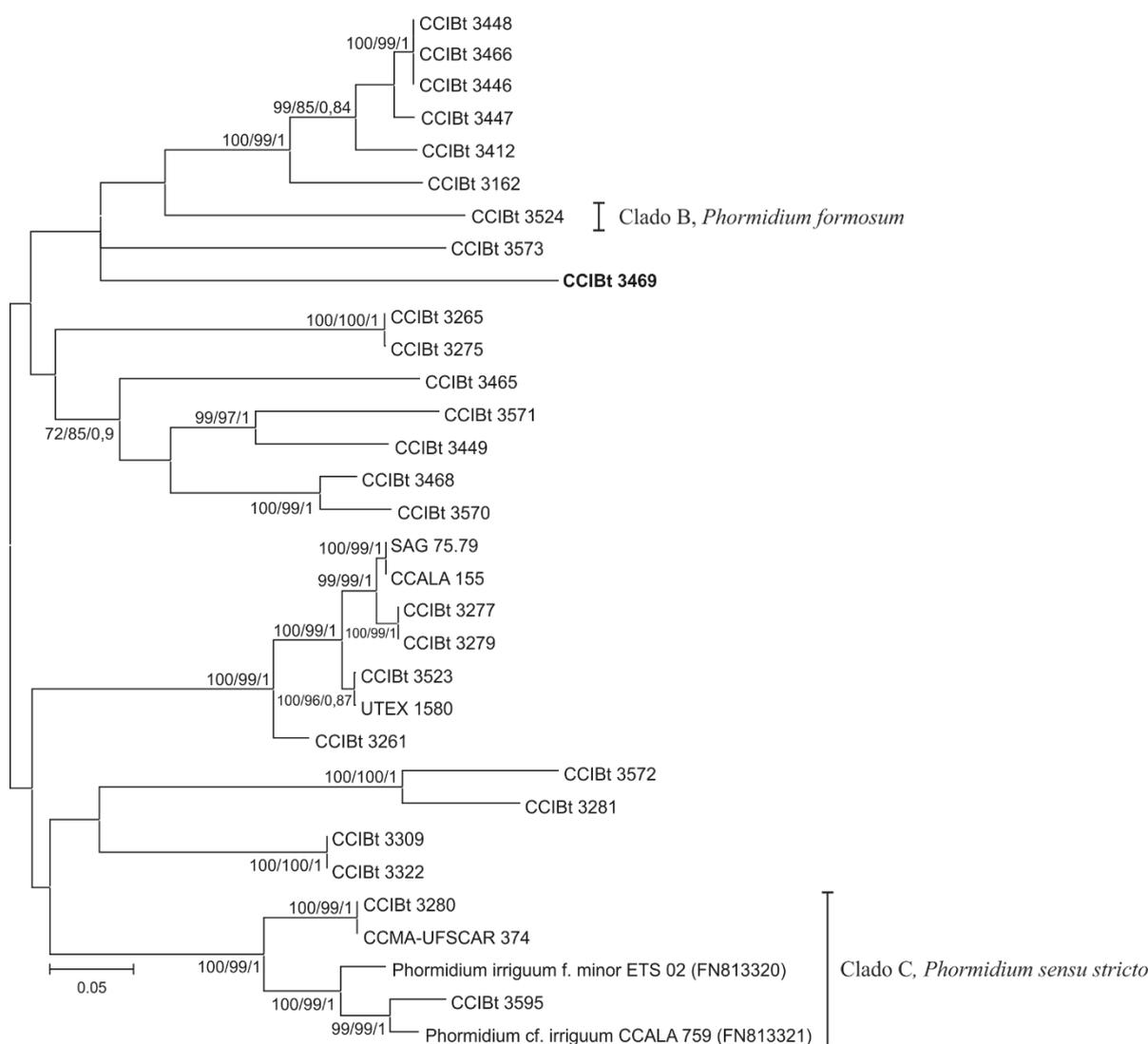
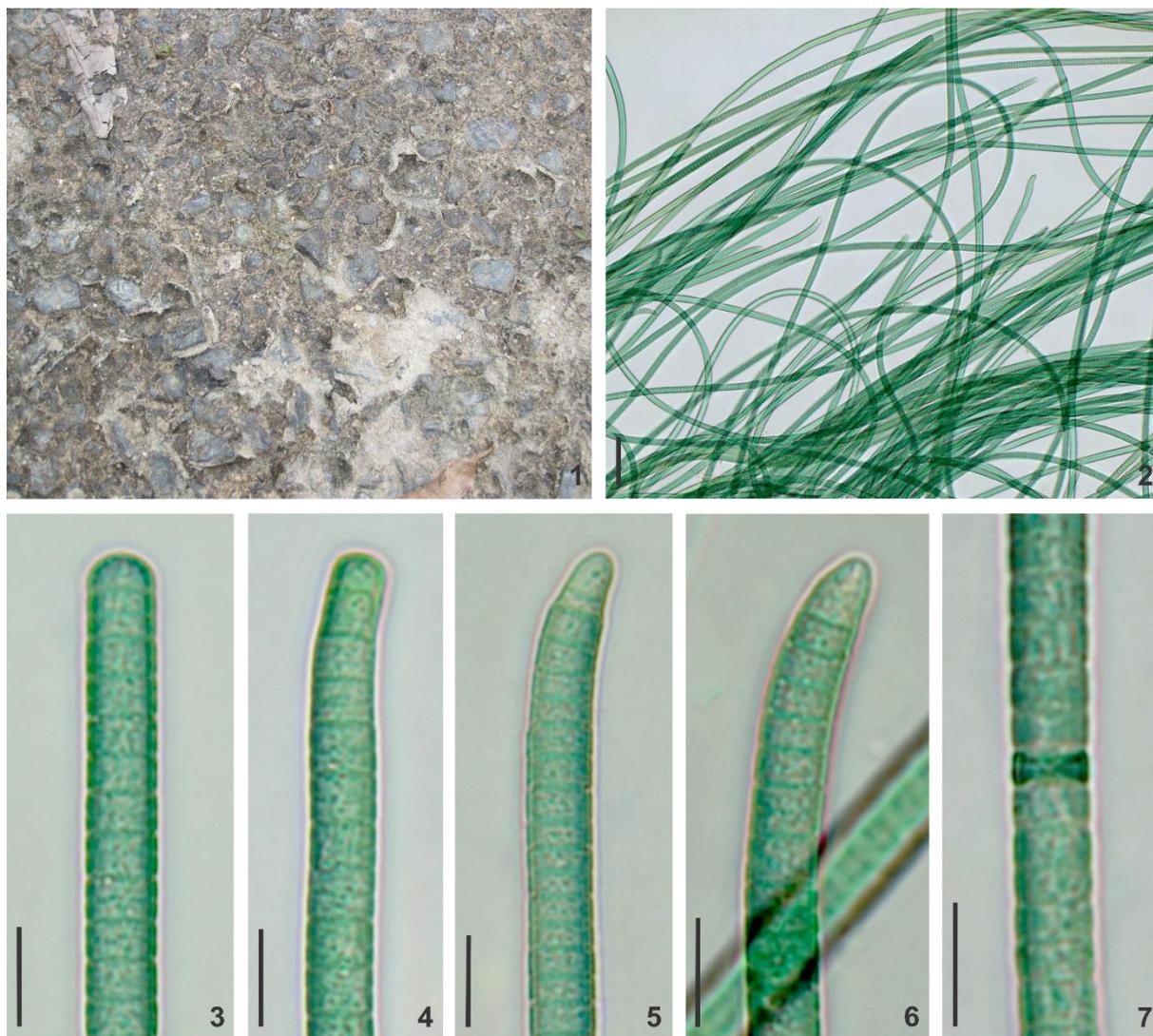


Figura 28. Análise filogenética do gene *rpoC1* (725pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). Detalhe do ramo correspondente a linhagem CCIBt 3469. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.



Prancha 18, Figuras 1-7. CCIBt 3469, *Phormidium cf. formosum*: 1. Local onde o material foi coletado: solo seco com brita. **2-7. Material em cultura:** 2. Tricomas dispostos em feixes; 3-6. Desenvolvimento da célula apical: 3. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma; 4-5. Tricomas levemente constrictos e curvos na extremidade; 6. Célula apical cônico-arredondada completamente desenvolvida; 7. Nécridio. Escalas 10 μm , exceto figura 2= 50 μm .

CCIBt 3573

Prancha 19, Figuras 1-4

Tricomas emaranhados, retos, levemente atenuados e curvos no ápice, não constrictos, móveis. Bainha mucilagínosa ausente. Células isodiamétricas. Célula apical cônico-arredondada, com aerótopos apical. Conteúdo celular verde-azulado, com grânulos dispostos irregularmente nos septos. Reprodução por hormogônios formados a partir da fragmentação do tricoma.

Dimensões Celulares	CCIBt 3573
Largura dos tricomas (μm)	
Cultura	4,3 – 4,8 (4,5)
Comprimento celular (μm)	
Cultura	3,2 – 4,1 (3,8)
Razão largura/comprimento	
Cultura	1,1 – 1,4 (1,2)

* Média entre parênteses

Material examinado: Corumbá (MS), Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **CCIBt 3573** (SP428.682) – Material coletado sobre solo úmido.

Morfológicamente, a linhagem CCIBt 3573 caracteriza-se como representante do grupo taxonômico II, descrito por Komárek & Anagnostidis (2005). Entretanto, a população analisada apresenta como característica diagnóstica a presença de um aerótopo na extremidade da célula apical. Como mencionado anteriormente (item 4.4 e 4.5), acredita-se que filogeneticamente este aspecto não possua valor taxonômico para o complexo *Phormidium*. Deste modo, considerando-se os aspectos morfológicos e ambientais observados para a população analisada, não foi possível identificá-la com as morfoespécies já descritas para este gênero.

Com base na análise filogenética do gene 16S RNAr, a linhagem CCIBt 3573 apresentou-se em um ramo isolado, irmão ao clado designado como *Phormidium formosum* (Figura 29, Clado B). Apesar disso, a relação entre estes táxons apresentou baixo suporte filogenético indicando que a posição desta linhagem na árvore não está bem estabelecida. Além disso, a identidade em relação aos demais clados analisados neste estudo foi abaixo de 94%. Acredita-se que a partir da inclusão de novos táxons seja possível definir a correta

classificação taxonômica desta população. Vale ressaltar que as sequências com maior grau de identidade com a linhagem CCIBt 3573, indicadas pela ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), foram incluídas neste estudo (*Microcoleus vaginatus* SNM1-KK1 EF654077 e *Microcoleus vaginatus* CSU-U-KK1 EF667462). Entretanto, estas linhagens pertencem ao clado de *Microcoleus sensu stricto*. Deste modo, acreditamos que a população estudada deve constituir um novo táxon para a ciência.

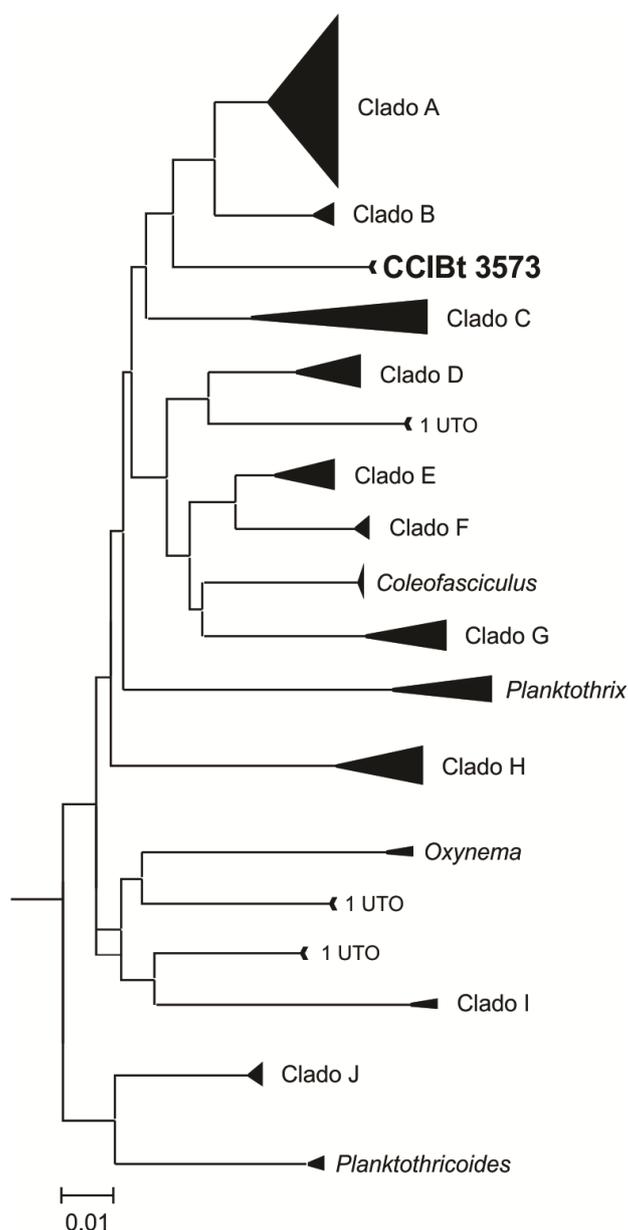
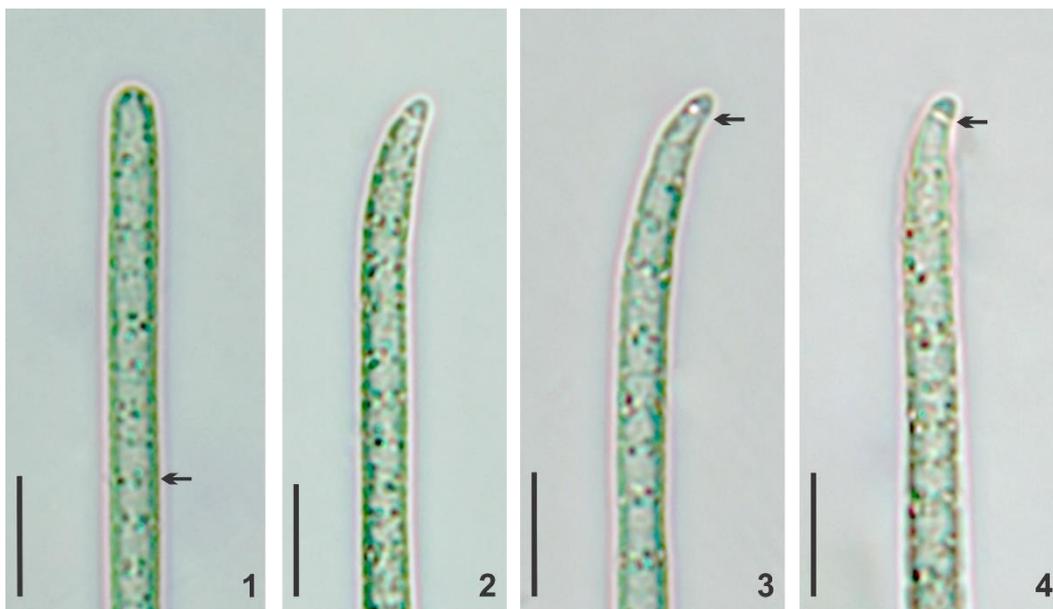


Figura 29. Análise filogenética do gene 16S RNAr (1014 pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model + G + I, 1000x*). Detalhe do ramo correspondente a linhagem CCIBt 3573.



Prancha 19, Figuras 1-4. CCIBt 3573 (Material em cultura): 1-4. Desenvolvimento da célula apical: 1. Célula com ápice arredondado após a quebra do tricoma e detalhe dos grânulos nos septos; 2. Tricoma levemente atenuado e curvo no ápice; 3-4. Célula apical com aerótopo na extremidade. Escalas 10 μ m.

4.13. Caracterização dos genes *nifD* e *nifH*

A reação química da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada pelo complexo enzimático nitrogenase, codificada pelos agrupamentos dos genes *nifDKH* (Zehr *et al.* 2000, 2001). Além disso, há outros sistemas alternativos para esta reação, porém estes são raros entre as cianobactérias (Boison *et al.* 2006). Deste modo, a caracterização dos genes *nifD* e *nifH* permitiu indicar neste estudo potenciais linhagens diazotróficas, além de estabelecer relações filogenéticas. Dentre as 30 linhagens analisadas, 11 apresentaram ambos os genes, sendo estas tanto de ambientes aquáticos como terrestres. Além disso, cinco linhagens apresentaram apenas o *nifH*, sendo a maioria terrestre (4) (Figuras 30 e 31).

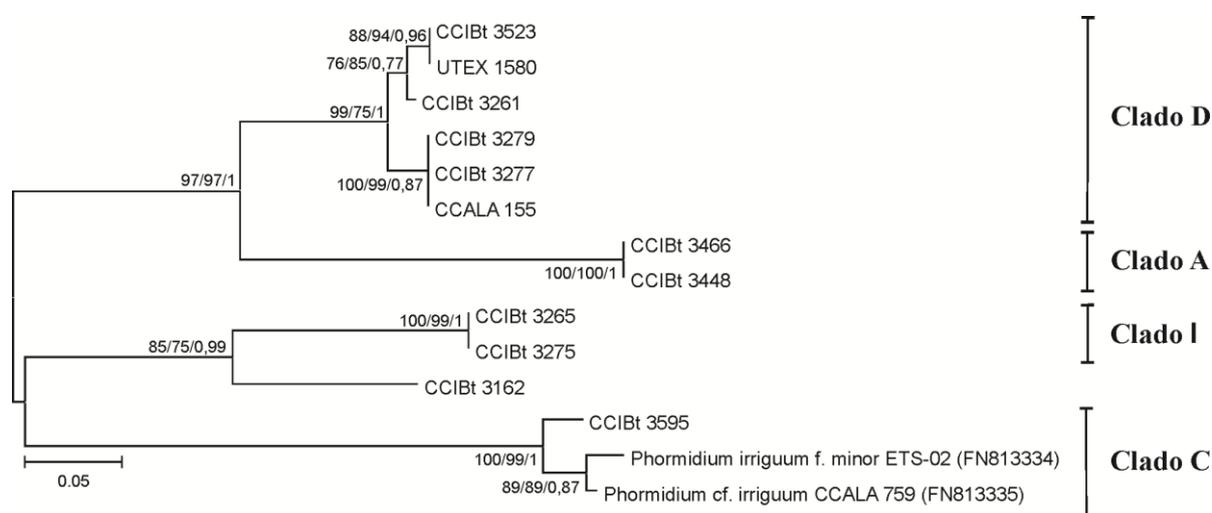


Figura 30. Análise filogenética do gene *nifD* (245pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

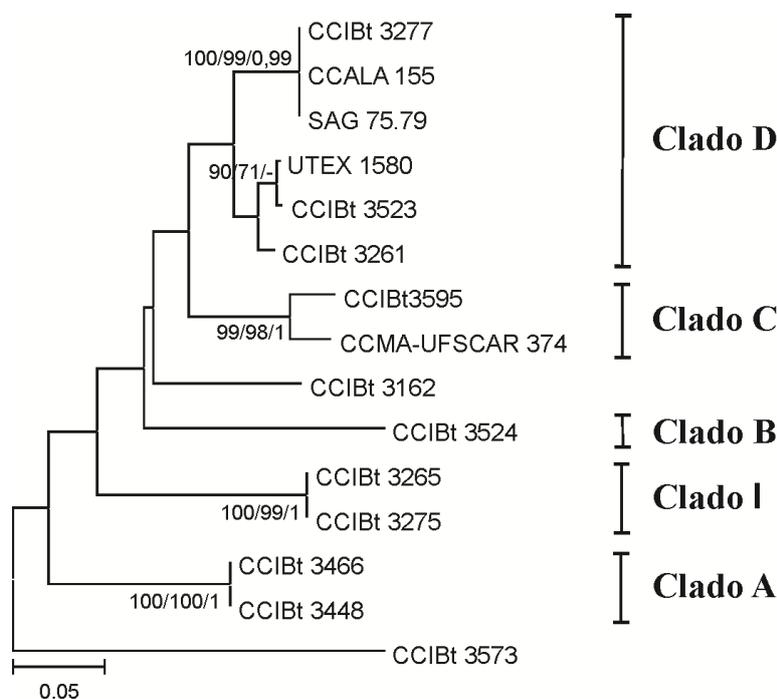


Figura 31. Análise filogenética do gene *nifH* (347pb) pelo método de Máxima Verossimilhança (*General Time Reversible model* + G + I, 1000x). Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos NJ, ML, e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos. (-) indica reamostragem < 70%.

Vale ressaltar que a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por estas linhagens não está relacionada necessariamente a presença de ambos os genes sequenciados. Primeiramente, é necessário determinar se todos os genes envolvidos nesta reação química estão presentes. Além disso, para a realização da FBN é requerido ambiente anóxico. Em cianobactérias homocitadas esta condição é alcançada através da separação espacial ou temporal entre a fotossíntese e a FBN ou, por meio de conformações estruturais tais como a disposição dos filamentos (Bermanfrank, Lundgren & Falkowski 2003, Fiore & Honda 2008). Apesar disto, a detecção destes genes torna-se importante a fim de colaborar com estudos futuros, principalmente aqueles de cunho ecológico.

No que se refere à relação filogenética estabelecida por ambos os genes (Figuras 30 e 31), os resultados obtidos neste estudo foram congruentes com análise do 16S RNAr, mesmo com um número reduzido de linhagens. Neste contexto, Zehr *et al.* (1995) indicaram que o *nifH* é um dos mais antigos genes funcionais conhecidos, sendo sua sequência altamente conservada. Deste modo, os autores sugerem que a filogenia baseada no gene *nifH* concorda com as inferências filogenéticas a partir do gene 16S RNA. No que se refere ao *nifD*, Roeselers

et al. (2007) indicam que este marcador molecular pode conferir maior robustez a reconstrução filogenética a partir do 16S RNAr ou de outros genes funcionais.

Vale ressaltar que este é o primeiro estudo a sequenciar o *nifD* a partir de linhagens brasileiras. Em relação ao *nifH*, pouquíssimos trabalhos já foram realizados nesta área (Andreote 2013, Genuário 2010). Deste modo, o presente estudo mostra-se importante, pois permitirá a inclusão de grande número de sequências nos bancos públicos que servirão de base para trabalhos posteriores. De acordo com Zehr *et al.* (2003), apesar do grande número de sequências do gene *nifH* nos bancos públicos, a maior parte dos dados referem-se a organismos não cultivados. Em relação ao *nifD*, poucos dados estão disponíveis, mesmo quando considerado organismos cultivados.

Em suma, estes genes podem ser considerados promissores para a caracterização taxonômica em cianobactérias, possivelmente para níveis supraespecíficos, bem como para indicar o papel ecológico destes organismos como potenciais fixadores de nitrogênio.

4.14. Estudos Químicos

Durante este estudo, 17 linhagens (tabela 11) foram testadas para verificação da presença de substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase, fungitóxicas e antioxidantes, bem como para a pesquisa da cianotoxina BMAA. As massas das culturas e dos extratos liofilizados, bem como os respectivos rendimentos do processo de extração estão descritos na tabela 11.

Tabela 11. Massas das culturas liofilizadas, dos respectivos extratos e rendimentos do processo de extração.

Linhagem	Biomassa Liofilizada (g)	Extrato Liofilizado (g)	Rendimento (%)
CCIBt 3261			
Extrato em ácido acético	0,1048	0,0098	9,35
Extrato metanólico	0,1153	0,0123	10,67
CCIBt 3265			
Extrato em ácido acético	0,4871	0,1727	35,46
Extrato metanólico	0,6398	0,1875	29,31
CCIBt 3275			
Extrato em ácido acético	0,5194	0,0853	16,42
Extrato metanólico	0,5086	0,0833	16,38
CCIBt 3277			
Extrato em ácido acético	1,3076	0,1506	11,52
Extrato metanólico	0,7555	0,7770	10,28
CCIBt 3279			
Extrato em ácido acético	3,01	2,0324	67,52
Extrato metanólico	4,1214	1,5776	38,27
CCIBt 3280			
Extrato em ácido acético	0,3267	0,0609	18,64
Extrato metanólico	0,3323	0,0479	14,41
CCIBt 3281			
Extrato em ácido acético	0,6129	0,1278	20,85
Extrato metanólico	0,8398	0,1567	18,66
CCIBt 3222			
Extrato em ácido acético	0,6000	0,125	20,83
Extrato metanólico	0,7199	0,1345	18,68
CCIBt 3309			
Extrato em ácido acético	1,4831	0,5468	36,87
Extrato metanólico	2,8697	1,2476	43,47

Linhagem	Biomassa Liofilizada (g)	Extrato Liofilizado (g)	Rendimento (%)
CCIBt 3412*			
Extrato em ácido acético	0,5052	0,1485	29,39
Extrato metanólico	0,4760	0,0945	11,24
CCIBt 3446			
Extrato em ácido acético	0,7560	0,0829	10,96
Extrato metanólico	0,9860	0,1472	14,93
CCIBt 3447			
Extrato em ácido acético	0,3572	0,0221	6,19
Extrato metanólico	0,3424	0,0232	6,78
CCIBt 3448			
Extrato em ácido acético	0,8438	0,0801	9,49
Extrato metanólico	0,9940	0,1417	14,25
CCIBt 3449			
Extrato em ácido acético	0,0456	0,0102	22,37
Extrato metanólico	0,0562	0,0112	19,93
CCIBt 3465			
Extrato em ácido acético	0,0302	0,0089	29,47
Extrato metanólico	0,0365	0,0098	26,85
CCIBt 3523			
Extrato em ácido acético	0,0205	0,0092	44,87
Extrato metanólico	0,0212	0,0095	44,81
CCIBt 3524			
Extrato em ácido acético	0,0214	0,0075	35,05
Extrato metanólico	0,0224	0,0087	38,84

Atividade anticolinesterásica

Os resultados foram positivos para detecção de substâncias com atividade anticolinesterásica apenas para as linhagens CCIBt 3265 (extrato em ácido acético e metanólico) e 3412 (extrato em ácido acético), como pode ser observado na figura 32. Ressalta-se que a partir dos resultados obtidos neste estudo e em outros trabalhos desenvolvidos sob orientação da Dra. Luciana Retz de Carvalho foi publicado o artigo intitulado “Biologically active compounds from Cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects” (Anexo 2).

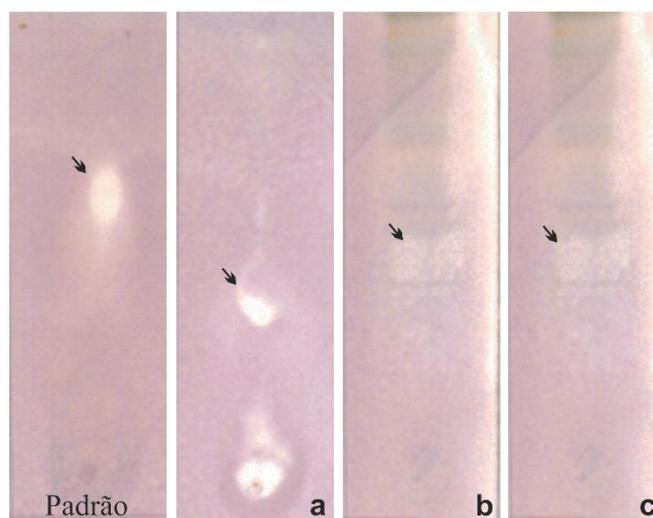


Figura 32. Resultado da pesquisa de atividade anticolinesterásica. Cromatograma em placa de gel de sílica dos extratos em ácido acético (a. CCIBt 3265, b. CCIBt 3412) e metanol (c. CCIBt 3265). Fase móvel: clorofórmio/metanol/água (64:36:8, v/v/v). Derivatização: reagentes de Elman's (DTNB). As setas indicam as manchas das substâncias ativas.

Atividade antioxidante

Em relação à prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante, o resultado foi positivo apenas para o extrato em metanol da linhagem CCIBt 3279 (Figura 33). Salientamos que substâncias antioxidantes naturais são utilizadas principalmente na prevenção de danos celulares e moleculares, causados por agentes químicos e biológicos. Neste contexto, os antioxidantes extraídos de cianobactérias têm-se mostrado efetivos reparadores (Krishnaraj *et al.* 2012).

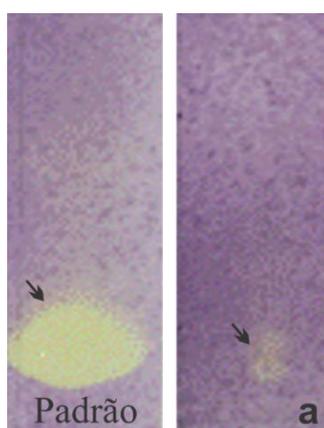


Figura 33. Resultado da pesquisa de atividade antioxidante. Cromatograma em placa de gel de sílica do extrato em metanol da cepa CCIBt 3279 (a). Fase móvel: clorofórmio/metanol/água (64:36:8, v/v/v). As setas indicam as manchas das substâncias ativas.

Atividade antifúngica

Os estudos para prospecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica, realizados pela bioautografia com o fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, apresentou resultado positivo para o extrato em ácido acético das linhagens CCIBt 3265, 3412 e CCIBt 3279 (Figura 34). Até o momento poucas substâncias com ação fungitóxica são conhecidas a partir de extratos de cianobactérias. De acordo com Skulberg (2000) a substância mais conhecida denomina-se ambiguene e foi isolada a partir de uma linhagem do gênero *Nostoc* sp.

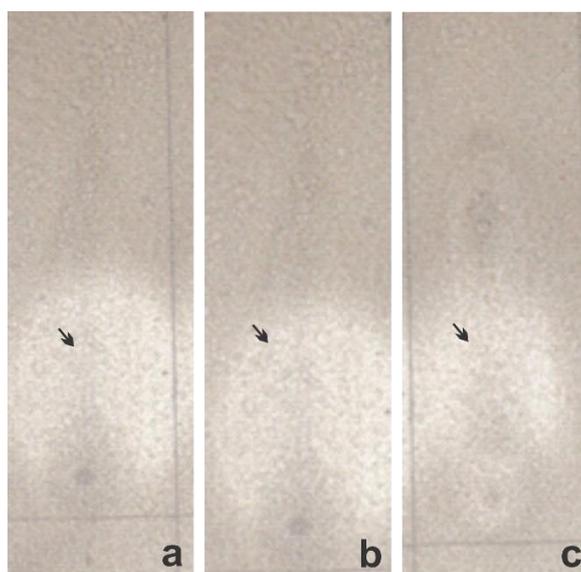


Figura 34. Resultado da pesquisa de atividade antifúngica. Cromatograma em placa de gel de sílica dos extratos em ácido acético das cepas CCIBt 3265 (a), 3279 (b) e 3412 (c). Fase móvel: clorofórmio/metanol/água (64:36:8, v/v/v). As setas indicam as substâncias ativas.

Cianotoxina β -metil-amino-alanina (BMAA).

A análise para a pesquisa da neurotoxina de efeito crônico BMAA mostrou resultado positivo para nove das 17 linhagens analisadas: CCIBt 3162, 3309, 3322, 3446, 3447, 3448, 3449, 3524 e 3465 (Figura 35). Ressalta-se que o BMAA é encontrado em grande parte das populações de cianobactérias e pode causar doenças neurodegenerativas precoces em seres humanos (Cox *et al.* 2005).

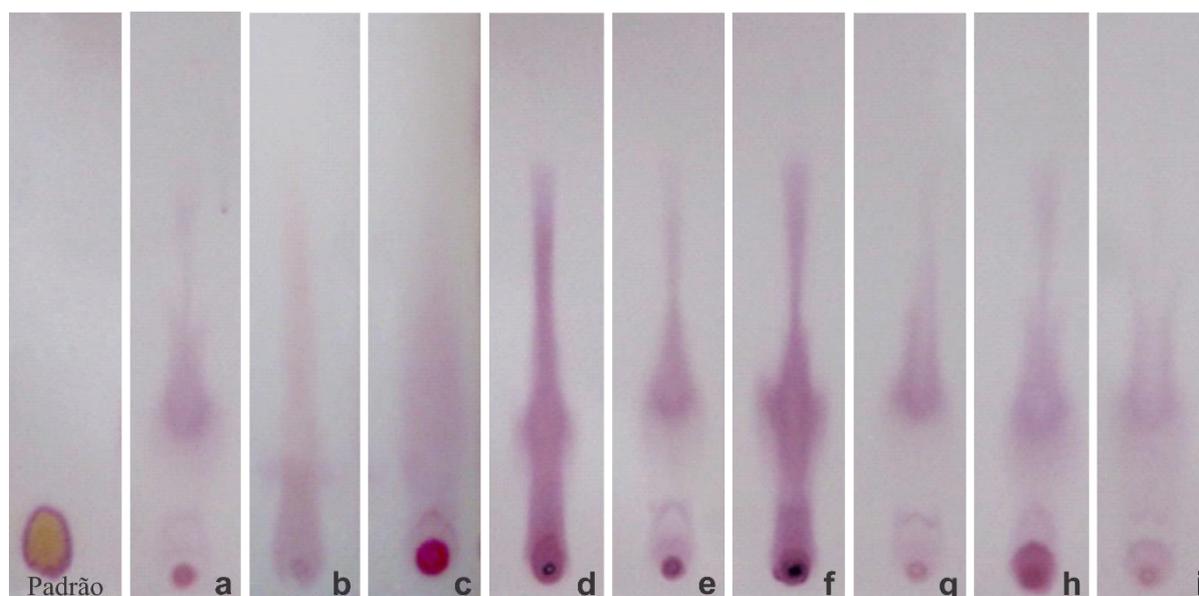


Figura 35. Resultado da pesquisa de β -metil-amino-alanina. Cromatogramas em placas de gel de sílica dos extratos em ácido acético das cepas CCIBt 3162 (a), 3322 (b), 3309 (c), 3446 (d), 3447 (e), 3448 (f), 3449 (g), 3524 (h) e 3465 (i). Fase móvel: clorofórmio/metanol/água 64:36:8. Agente derivatizante: ninidrina.

A bioprospecção de metabolitos secundários a partir do material analisado indicou que apenas 3 (CCIBt 3265, 3412 e 3279) das 17 linhagens apresentaram atividades anticolinesterásica, antifúngica e antioxidante, demonstrando o baixo potencial deste grupo de organismos em produzir estes compostos específicos. No entanto, outros autores (Tokuda *et al.* 1996, Papendorf *et al.* 1998) detectaram compostos isolados de diferentes linhagens de *Phormidium* com atividades antitumorais, anti-inflamatórias e antiplasmodiais. Além disso, neste estudo, constatamos que 53% das linhagens apresentam a capacidade de produzir o BMAA, que é uma cianotoxina relacionada às doenças neurodegenerativas.

Desta forma, esses resultados indicam que a prospecção de compostos biologicamente ativos no complexo *Phormidium* pode ser um caminho promissor em trabalhos futuros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo confirmamos a heterogeneidade de habitats nos quais os representantes do complexo *Phormidium* podem se desenvolver, incluindo ambientes extremos, tais como as lagoas alcalinas do Pantanal. Entretanto, neste estudo observamos claramente que estes organismos necessitam de um ambiente úmido para sobreviverem. Este fato foi constatado a partir da análise de quase 300 amostras coletadas nos biomas Mata Atlântica e Pantanal. Como citado anteriormente, apenas 32 amostras dentre todo o material coletado (17 aquático e 13 terrestre) continham morfoespécies do complexo *Phormidium*. As amostras terrestres que continham os organismos de interesse caracterizaram-se na maioria das vezes por solos úmidos a encharcados, ou mesmo em concretos com umidade. As linhagens isoladas a partir de ambientes muito seco (CCIBt 3412 e 3469) foram consideradas como a flora potencial do ambiente, uma vez que as populações ocorreram em amostras da natureza. Deste modo, é possível considerar que morfoespécies pertencentes a *Phormidium sensu lato* apresentam maior afinidade a ambientes úmidos e este fato poderá nortear futuras pesquisas que visem o isolamento deste grupo de organismos.

A partir da reconstrução filogenética do gene 16S RNAr, neste estudo foi possível confirmar a heterogeneidade do gênero *Phormidium*. Dentre as 30 linhagens analisadas, apenas três foram caracterizadas como *Phormidium sensu stricto*, juntamente com *Phormidium cf. irrigum* CCALA 759, que é um representante do grupo taxonômico ao qual a espécie-tipo do gênero (*Phormidium lucidum*) está inserida. Dez linhagens analisadas foram identificadas como pertencentes a gêneros já descritos em literatura: *Microcoleus*, *Wilmottia* e *Desertifilum*. Entretanto, 43% do material analisado foram considerados como novos táxons para a ciência, e cerca de 6 novos gêneros poderão ser descritos futuramente. Como exemplo podemos citar o novo gênero *Trichocapitatum*, que incluiu duas espécies: *T. komarekianum* e *T. lacustre*. Deste modo, é evidente a ampla diversidade do complexo *Phormidium* em ambientes tropicais e subtropicais, bem como o pouco conhecimento sobre a biodiversidade destes ambientes.

As linhagens isoladas a partir de amostras coletadas no Pantanal e na Mata Atlântica apresentaram-se morfologicamente distintas, o que foi corroborado a partir da análise filogenética do gene 16S RNAr realizada no presente estudo. Neste contexto, com exceção do gênero *Microcoleus* (grupo A), as linhagens de ambas as regiões de estudo apresentaram-se distribuídas em clados filogenéticos distintos (Figura 7). Entretanto, apesar de algumas

linhagens do Pantanal (CCIBt 3412 e 3447) e da Mata Atlântica (CCIBt 3446, 3448 e 3446) terem sido consideradas como pertencentes ao gênero *Microcoleus*, vale ressaltar que tratam-se de espécies distintas, tanto em termos morfológicos quanto filogenéticos (16S RNAr, *rpoC1* e *rbcLX*). Deste modo, foi possível evidenciar neste estudo que a especificidade de habitats de ambas as regiões de estudo pode refletir diretamente a diversidade biológica.

Neste cenário, vale ressaltar que os aspectos morfológicos diagnósticos do complexo *Phormidium*, tal como a região apical do tricoma, devem ser muito bem caracterizados, uma vez que estes dados apresentaram-se congruentes com os resultados filogenéticos observados a partir do gene 16S RNAr. Como exemplo, podemos citar o gênero *Trichocapitatum*, presentemente descrito, que apresentou como característica morfológica diagnóstica “tricomas com células apicais leve a fortemente capitadas”. Além disso, é importante ressaltar que análise do ciclo de vida neste gênero foi essencial para caracterização detalhada das diferentes populações estudadas. Outro exemplo que pudemos evidenciar claramente foi a inclusão das linhagens *Phormidium autumnale sensu lato* no gênero *Microcoleus*. Por este motivo, neste estudo o desenvolvimento da célula apical foi detalhadamente analisado e ilustrado. Neste sentido, concluímos que a caracterização morfológica errônea do organismo pode conduzir a má interpretação dos resultados filogenéticos em níveis genéricos.

No que se refere às relações interespecíficas, a análise molecular a partir dos marcadores moleculares *rbcLX*, *rpoC1* e do espaçador intergênico 16S-23S RNAr (filogenia e estrutura secundária) mostraram-se promissores para a determinação das espécies. Entretanto, o número reduzido de sequências referentes a estes marcadores nos bancos públicos impossibilitou muitas vezes a comparação entre táxons filogeneticamente relacionados. No caso do novo gênero *Trichocapitatum*, esta abordagem possibilitou a delimitação de três espécies (*T. komarekianum* e *T. lacustre*). Como evidenciado ao longo deste trabalho, a utilização de diferentes marcadores moleculares para a caracterização infragenérica de cianobactéria deve ser considerada para os estudos taxonômicos, uma vez que o gene 16S RNAr não possibilita tal delimitação. Neste aspecto, este estudo contribuiu significativamente, uma vez que será incluído nos bancos públicos cerca de 90 sequências do complexo *Phormidium* referentes a estes marcadores.

A análise molecular dos genes *nifH* e *nifD* permitiu indicar potenciais linhagens diazotróficas, demonstrando o possível papel ecológico destas espécies. Além disso, as análises filogenéticas baseadas em ambos os genes corroboraram os resultados obtidos a partir do gene 16S RNA. Deste modo, estes genes podem ser considerados como promissores para a caracterização taxonômica em cianobactérias, possivelmente para níveis supraespecíficos. Além disso, as sequências geradas a partir deste estudo serão de grande valia para trabalhos

posteriores, uma vez que são oriundas de organismos cultivados. A maioria das sequências referentes ao *nifH* nos bancos públicos referem-se a organismos não cultivados. Em relação ao *nifD*, o número de sequências ainda é reduzido, mesmo quando considerado organismos cultivados.

A bioprospecção de metabólitos secundários a partir do material analisado indicou que apenas 3 (CCIBt 3265, 3412 e 3279) das 17 linhagens apresentaram atividades anticolinesterásica, antifúngica e antioxidante, demonstrando o baixo potencial deste grupo de organismos em produzir estes compostos específicos. No entanto, outros autores detectaram compostos isolados de diferentes linhagens de *Phormidium* com atividades antitumorais, anti-inflamatórias e antiplasmodiais. Além disso, constatamos que 53% das linhagens apresentaram a capacidade de produzir o BMAA, que é uma cianotoxina relacionada às doenças neurodegenerativas. Desta forma, esses resultados indicam que a prospecção de compostos biologicamente ativos no complexo *Phormidium* pode ser um caminho promissor em trabalhos futuros.

Em suma, o presente trabalho demonstrou a ampla diversidade de prováveis espécies novas para a ciência nos ambientes tropicais e subtropicais, o papel ecológico destes organismos como potenciais fixadores de nitrogênio, bem como o uso de diferentes marcadores moleculares para auxiliar na definição de espécies no complexo *Phormidium*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alho, C.J.R. & Gonçalves, H.C. 2005.** Biodiversidade do Pantanal: ecologia & conservação. UNIDERP, Campo Grande.
- Alho, C.J.R., Campos, Z.M.S. & Cardoso, H.C. 1987.** Ecologia de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*, Rodentia) do Pantanal: habitats, densidades e tamanho de grupo. *Revista Brasileira de Biologia* 47: 87-97.
- Allem, A.C. & Valls, J.F.M. 1987.** Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense. Documento 8. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Recursos Genéticos, Brasília.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. 1988.** Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Algological Studies* 50-53: 327-472.
- Andreote, A.P.D. 2013.** Filósofera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotróficas. Tese de doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Andreote, A.P.D., Vaz, M.G.M.V., Genuário, D.B., Barbiero, L., Rezende-Filho, A.T. & Fiore, M.F. 2014.** Non-heterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology*. doi: 10.1111/jpy.12192
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I. & Stockinger, H. 2012.** ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Research* 40(W1): W597-W603.
- Baker, P.D., Stevensen, D.A., Humpage, A.R., Nicholson, B.C., Falconer, I.R., Lanthois, B., Fergusson, K.M. & Saint, C.P. 2001.** Preliminary evidence of toxicity associated with the bentic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia. *Environmental Toxicology* 16: 506-511.
- Barker, G.L.A., Hayes, P.K., O'Mahony, S.L, Vacharapiyasophon, P. & Walsby, A.E. 1999.** A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 35: 931-937.

- Berman-Frank, I., Lundgren, P. & Falkowski, P. 2003.** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in Cyanobacteria. *Research in Microbiology* 154: 157-164.
- Berrini, C.C., Appolonia, F., Valle, L.D, Komárek, J. Andreoli, C. 2004.** Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from the Euganean termal spring (Padua, Italy). *Algological Studies* 113(5): 73-85.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1518.
- Boison, G., Steingen, C., Stal, L.J. & Bothe, H. 2006.** The rice field Cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase. *Archive of Microbiology* 186: 367–376.
- Boyer, S.L., Flechtner, V.R., Johansen, J.R. 2001.** Is the ITS 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for the use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 1057-1069.
- Boyer, S.L., Johansen, J.R., Flechtner, V.R. 2002.** Phylogeny and genetic variance in terrestrial Microcoleus (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S - 23S ITS region. *Journal of Phycology* 38: 1222–1235.
- Branco L.H.Z., Sant'Anna, C.L., Azevedo M.T.P. & Sormus L. 1997.** Cyanophyte Flora From Cardoso Island Mangroves, Sao Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. *Algological Studies* 84: 39-52.
- Branco, C.C.Z. & Necchi, O. 1996.** Survey of stream macroalgae of eastern Atlantic Rainforest of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 80: 35-57.
- Branco, L.H.Z., Hoffmann, L., Teixeira, J.P., Ferreira, V. & Morais-Filho, J.C. 2009.** Aerophytic cyanoprokaryotes from Atlantic rainforest region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. *Cryptogamie Algologie* 30: 135-152.
- Branco, L.H.Z., Necchi, O. & Branco, C.C.Z. 1999.** Cyanophyceae from lotic acosystems of São Paulo State, southeastern Brazil. *Algological Studies* 94: 63-87.
- Brum, P.A.R. & Sousa, J.C. 1985.** Níveis de nutrientes para gado, em lagoas (“bacias” e “salinas”) no Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 20: 1451- 1454.
- Calheiros, D.F. & Oliveira, M.D. 1999.** Pesquisa limnológica no Pantanal: uma revisão. In *Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. EMBRAPA Pantanal, Corumbá. p. 115-125.

- Callegari-Jacques, S.M. 2003.** Bioestatística: princípios e aplicações. Artmed, Porto Alegre, 256p.
- Castenholz, R.W. 2001.** Oxygenic photosynthetic bacteria. *In*: D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Springer-Verlag, New York, pp. 473-600.
- Ceschi-Berrini, C., De Appolonia, F., Valle, L.D., Komárek, J. & Andreoli, C. 2004.** Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from Euganean thermal springs (Padua, Italy). *Algological Studies* 113: 73-85.
- Chatchawan, T., Komárek, J., Strunecký, O., Šmarda, J. & Peerapornpisal, Y. 2012.** Oxynema, a new genus separated from the genus Phormidium (Cyanophyta). *Cryptogamie, Algologie* 33(1): 41-59.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., MORRISON, L.F., Codd, G.A. & Bergman, B. 2005.** Diverse taxa of cyanobacteria produce β -methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(14): 5074-5078.
- Cusack, D.F., Silver, W. & McDowell, W.H. 2009.** Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystemlevel patterns and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems* 12: 1299-1315.
- Da Silva, M.P., Mauro, R., Mourão, G & Coutinho, M. 2000.** Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 143-152.
- Dadheech, P.K., Raeid, M.M.A., Huda, M. Mohan, M.K., Krienitz, L. 2012.** Polyphasic characterization of cyanobacteria isolated from desert crusts, and the description of *Desertifilum tharense* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales). *Phycologia* 51 (3): 260-270.
- Dicastro, F. & Younès, T. 1994.** Diversities: yesterday, today and a path towards the future. *Biology International* 29: 3-23.
- 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.
- Drouet, F. 1938.** The Brazilian Myxophyceae II. *American Journal of Botany* 25: 657-666.
- Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. 1997.** Plano de utilização da fazenda Nhumirim. B.M.A. Soriano, D.H. Oliveira, J.B. Catto, J.A. Comastri Filho, S. Galdino & S.M. Salis (orgs.). EMBRAPA Pantanal, Documentos 21: 1-72.

- Ewing, B. & Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Fernandes, E. 2007.** Organização espacial dos componentes da baixa Nhecolândia – Pantanal do Mato Grosso do Sul. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, USP, São Paulo.
- Fiore, M.F. & Honda, R.Y. 2008.** Fixação do N₂ por cianobactérias. *In*: M.V.B. Figueiredo, H.A. Burity, N.P. Stamford & C.E.R.S. Santos (eds). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Agrolivros, Guaíba, pp. 69-95.
- Fox, G.E., Wisotzkey, K.D. & Jurtschuk, P.J. 1992.** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be suficiente to guarantee species identity. *Journal of Systematic Bacteriology* 42: 166-170.
- Fundação Florestal do Estado de São Paulo.** <http://www.fflorestal.sp.gov.br> (Acessado em 20 de janeiro de 2014).
- Gademann, K. & Portmann, C. 2008.** Secondary metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry* 12: 326-341.
- Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Hoffmann, L., Tits, M. & Angenot, L. 2000.** Inhibition of croton oil-induced oedema in mice ear skin by capsular polysaccharides from cyanobacteria. *Naunyn-Schmiedeberg's Archive Pharmacology* 361: 460-464.
- Garcia-Pichel F., Nübel, U., Muyzer, G. 1998.** The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169: 469-482.
- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortez, A. & Nubel, U. 2001.** Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil deserts crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4): 1902-1910.
- Geitler, L. (1942).** Schizophyta: Klasse Schizophyceae. *In*: A. Engler & K. Prantl (eds). *Die natürlichen Pflanzenfamilien, Sweite Auflage. vol. 1b.* Leipzig, Wilhelm Engelmann, pp. 1-232.
- Genuário, D.B. 2010.** Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética. Dissertação de Mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Ghazoul, J. & Sheil, D. 2010.** *Tropical Rain Forest: Ecology, Diversity, and Conservation.* Oxford University Press, New York.

- Glowacka, J., Szeffel-Markowska, M., Waleron, M., Lojkowska, E. & Waleron, K. 2011.** Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies. *Acta Biochimica Polonica* 58(3): 321-331.
- Golubic, S. & Seong-Joo, L. 1999.** Early cyanobacterial fossil record: preservation, paleoenvironments and identification. *European Journal Phycology* 34: 339-348.
- Gomont, M.M. 1982.** Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocytées). *Annales Sciences Nataturalles, Bot. sér. 7. Librairie de L'Academie de Medecine, Paris* 15: 263-368; 16: 91-264.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. 1998.** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195-202.
- Gorham, P.R., McClachlan, J., Hammer, U.T. & Kim, W.K. 1964.** Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 15: 796-804.
- Graham, L.E. & Wilcox, L.W. 2000.** *Algae*. Prentice Hall, New Jersey.
- Harel, Y., Ohad, I., Kaplan, A. 2004.** Activation of photosynthesis and resistance to photo-inhibition in Cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiology* 136: 3070-3079.
- Harrigan, G.G. & Goetzl, G. 2002.** Symbiotic and dietary marine microalgae as a source of bioactive molecules—experience from natural products research. *Journal of Applied Phycology* 14(2): 103-108.
- Hartmann, P.A., Hartmann, M.T. & Martins, M. 2009.** Ecology and natural history of a snake ssemblage at Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 9(3): 173-184.
- Hašler, P., Dvorak, P., Johansen, J.R., Kitner, M., Ondrej, V., Poulickova, A. 2012.** Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). *Fottea* 12(2): 341-356.
- Hirota, M.M. 2003.** Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. *In: C. Galindo-Leal, I.G. Câmara* (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends and outlook*. Island Press, Washington, p. 60-65.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kastovsky, J. 2005.** System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) – state in 2004. *Algological Studies* 117: 95-115.
- Homans, A. L. & Fuchs, A. 1970.** Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* 51: 327-329.

- Honda, R.Y. 2009.** Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de corpos d'água brasileiros. Tese de Doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Hostettmann, K., Queiroz, E.F. & Vieira, P.C. 2003.** Princípios ativos de plantas superiores. UFSCar, São Carlos, v.4, 152p.
- Ishida, T., Watanabe, M.M., Sugiyama, J. & Yokota, A. 2001.** Evidence for polyphyletic origin of the members the orders Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters* 201: 79-82.
- Jacinavicius, F.R., Gama-Junior, W.A., Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L. 2012.** Manual para cultivo de Cianobactérias. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. 28p.
- Johansen J.R, Kovacik L., Casamatta D.A, Fučíková K. & Kaštovský J. 2011.** Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). *Nova Hedwigia* 92 (3–4): 283–302.
- Junk, W.J. & Cunha, C.N. 2005.** Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. *Ecological Engineering* 24: 391-401.
- Junk, W.J., Brown, M., Campbell, I.C., Finlayson, M., Gopal, B., Ramberg, L. & Warner, B.G. 2006.** The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: a synthesis. *Aquatic Sciences* 68: 400-414.
- Kling, H.J., Laughinghouse IV, H.D, Smarda, J., Komárek, J., Acreman, J., Bruun, K., Watson, S.B & Cheng, F. 2012.** A new red colonial *Pseudanabaena* (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) from North American large lakes. *Fottea* 12(2): 327–339.
- Komárek, J. 2005.** The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies* 34(3): 5-17.
- Komárek, J. 2006.** Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21(4): 349-376.
- Komárek, J. 2010.** Recent changes (2008) in Cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639: 245-259.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005.** Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales. *In*: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 19/2. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp.1-759.

- Komárek, J. & Kaštovský, J. 2003.** Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of Cyanobacteria. *Algological Studies* 109: 305-325.
- Komárek, J. & Komárková-Legnerová, J. 2002.** Contribution to the Knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia* 74: 207-233.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Ventura, S., Turicchia, S. & Šmarda, J. 2009.** The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. *Algological Studies* 129: 41-59.
- Krishnaraj, K.N., Babu, S.V., Ashokkumar, B. Malliga, P. & Varalakshmi, P. 2012.** Antioxidant property of fresh and marine water cyanobacterial extracts in Swiss mice. *Journal of Biopesticides* 5: 250-254.
- Lakshmana Rao, P.V., Bhattacharya, R., Gupta, N., Parida, M.M., Bhaskar, A.S.B. & Dubey, R. 2002.** Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. *Archives of Toxicology* 76: 227-235.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing.** In: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, Wiley.
- Latysheva, N., Junker, V.L., Palmer, W.J., Codd, G.A. & Barker, D. 2012.** The evolution of nitrogen fixation in Cyanobacteria. *Bioinformatics* 28 (5): 603-606.
- Lee, W.J. & Bae, K.S. 2001.** The phylogenetic relationship of several oscillatorian Cyanobacteria, forming bloom at Daechong reservoirs, based on partial 16S rRNA gene sequences. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1: 504-507.
- Leitão-Filho, H.F. 1994.** Diversity of arboreal species in Atlantic Rainforest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 66: 91-96.
- Litvaitis, M.K. 2002.** A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468: 135-145.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2000.** *Brock biology of microorganisms* Upper Saddle River, Prentice Hall, New Jersey.
- Malone, C.F.S. 2010.** Biodiversidade de algas e cianobactérias de duas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Malone, C.F.S., Santos, K.R.S., Sant'Anna, C.L. 2012.** Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal brasileiro. *Oecologia australis* 16(4): 745-755.
- Marquardt, J. & Palinska, K.A. 2007.** Genotypic and phenotypic diversity of Cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology* 187: 397-413

- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K. 2002.** A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- Martins, M.D. 2014.** Estudos polifásicos de populações de Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.
- McGregor, G.B. 2007.** Freshwater Cyanoprokaryota of North-Eastern Australia I: Oscillatoriales. *Flora of Australia Supplementary Series*, Australian Biological Resources Study, Canberra.
- Merck, E. 1971.** Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany, 118p.
- Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D.F. & Wright, F. 2008.** Topali v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25 (1): 126-127.
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Miyachi, S., Chihara & M. 2003.** *Acaryochloris marina* gen. et sp. nov (Cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing Chl d as a major pigment. *Journal of Phycology* 39: 1247-1253.
- Mourão, G.M., Ishii I.H. & Campos, Z.M.S. 1988.** Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de baías e salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Acta Limnológica Brasiliensia* 2: 181-198.
- Murakami, M., Makabe, K., Okada, S., Yamaguchi, K. & Konosu, S. 1988.** Screening of biological active compounds in microalgae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(6): 1035-1039.
- Murunová, M. & Kastovský, J. 2007.** Aerické sinice oblasti Ubatuba, Mata Atlantica, Brazílie. Tese de Licenciatura. Biologická fakulta Jihočeské univerzity České Budějovice Katedra botaniky, Republika Tchecha. 52p.
- Myers, N., Mittermier, R.A., Mittermier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000.** Biodiversity hotspot for conservation priorities. *Nature* 403: 845-853.
- Nagasathya, A. & Thajuddin, N. 2008.** Antioxidant property of hypersaline Cyanobacteria, *Phormidium tenue* (KMD33). *International Journal of Pharmacology*.
- Necchi Jr. O., Pascoaloto D., Branco C.C.Z. & Branco L.H.Z. 1997.** Stream macroalgal flora from the northwest region of São Paulo State, southeastern Brazil. *Algological Studies* 84: 91-112.

- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 693-697.
- Nübel, U., Garcia-Pichel F. & Muyzer, G. 2000. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov. sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1265-1277.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(3): 3327-3332.
- Oliveira-filho, A.T. & Fontes, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil, and the influence of Climate. *Biotropica*. 32: 793-810.
- Olson, J.B., Steppe, T.F., Litaker, R.W. & Paerl, H.W. 1998. N₂-Fixing Microbial Consortia Associated with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* 36: 231-238.
- Padgurschi, M.C.G., Pereira, L.P., Tamashiro, J.Y. & Joly, C.A. 2011. Floristic composition and similaritie between areas of Montane Atlantic Rainforest, São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica* 11(2): 139-152.
- Palińska, K.A. & Marquardt, J. 2008. Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Archives of Microbiology* 189: 325:335.
- Pamplona, C.S.S., Genuário, D.B.G., Vaz, M.G.M.V. & Fiore, M.F. 2014. Phylogeny of culturable Cyanobacteria from Brazilian mangroves. *Systematic and Applied Microbiology*. doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.003
- Papendorf, O., König, G.M. & Wright, A.D. 1998. Hierridin B and 2,4-dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium *Phormidium ectocarpi* with antiplasmodial activity. *Phytochemistry* 49: 2383-2386.
- Por, F.D. 1995. The Pantanal of Mato Grosso (Brazil). *World's Largest Wetlands. Biological Monographs*, 122 p.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.4: MCMC trace analyses tool. Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rantala, A., Fewer, D.P, Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitoma, J., Börner, T. & Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(2): 568-573.

- Rejmankova, E., Komárek, J. & Komárková, J. 2004.** Cyanobacteria - a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). *Diversity and Distributions* 10: 189–199.
- Reshef, V., Mizrachi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A. & Carmeli, S., 1997.** New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV- 1. *Journal Natural Products* 60: 1251-1260.
- Rezende-Filho, A.T. 2003.** Variabilidade de salinidade de uma área em uma baía/vazante na fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia: estudo de um método cartográfico. Monografia de Especialização, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS.
- Rhee, K., Meent, M. Van De, Ingkaninan, K. & Veerporte, R. 2001.** Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* 915: 217- 223.
- Rippka, R. 1979.** Isolation and purification of Cyanobacteria. *In: L. Pacher & A.N. Glazer* (eds.). *Cyanobacteria Methods in Enzymology*. Blackwell 167: 3-27.
- Roeselers, G., Stal, L.J., Van Loosdrecht, M.C.M. & Muyzer G. 2007.** Development of a PCR for the detection and identification of cyanobacterial *nifD* genes. *Journal of Microbiological Methods* 70: 550-556.
- Roggy, J.C., Prevost, M.F., Garbaye, J. & Domenach, A.M. 1999.** Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using delta N-15. *Journal of Tropical Ecology* 15: 1–22.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics Application Notes* 19: 1572-1574.
- Rudi, K., Skulberg, O.M. & Jakobsen, K.S. 1998.** Evolution of Cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. *Journal of Bacteriology* 180 (3): 3453–3461
- Rudi, K., Skulberg, O.M., Skulberg, R. & Jakobsen, K.S. 2000.** Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4004-4011.

- Sakamoto, A.Y., Queiroz-Neto, J.P., Fernandes, E., Lucati, H.M. & Capellari, B. 1999.** Topografia de lagoas salinas e seus entornos no Pantanal da Nhecolândia. In: Anais do II simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Manejo e conservação. Corumbá, Embrapa Pantanal 2: 127-135.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sant'Anna C.L. & Azevedo M.T.P. 1995.** Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia* 60 (1-2): 19-58.
- Sant'Anna, C.L., Branco, L.H.Z., Gama-Júnior, W.A. & Werner, V. 2011.** Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. *Biota Neotropica* 11(1): 455-495.
- Santos, K.R.S. & Sant'Anna, C.L. 2010.** Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (salina, salitrada e baía) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33(1): 61-83.
- São Paulo (ESTADO). Secretaria do Meio Ambiente. 1998.** Planos de manejo das unidades de conservação: Parque Estadual da Ilha do Cardoso – Plano de Gestão Ambiental, fase I. São Paulo: SMA, vol. 4, 164p.
- Schmidt, E.C., Scariot, L.A., Rover, T. & Bouzon, Z.L. 2009.** Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860–869.
- Schopf, J.W. & Water, M.R. 1982.** Origin and early evolution of Cyanobacteria: the geological evidence. In: N.G. Carr & B.A. Whitton (eds.). *The biology of Cyanobacteria*. Blackwell, Oxford, pp. 543-564.
- Schopf, J.W. 1996.** Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. *Nova Hedwigia* 112: 13-32.
- Sciuto K., Andreoli C., Rascio N., La Rocca N. & Moro, I. 2011.** Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics* 1: 1–18.
- Seckbach, J. (ed.). 2007.** Algae and cyanobacteria in extreme environments. Hamburg, Germany, Springer. 814 pp.
- Siegesmund, M.A., Johansen, J.R., Karsten, U. & Friedl, T. 2008.** *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *Journal of Phycology* 44: 1572–85.
- Silva, C.J. 2002.** Políticas e programas de conservação para o Pantanal. In: E.L. Araújo, A.N. Moura, E.V.S.B. Sampaio, L.M.S. Gustinari & J.M.T. Carneiro (eds.). *Biodiversidade, conservação e uso sustentado da flora do Brasil*. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, pp. 68-70.

- Silva, C.J., Wantzen, J.M., Cunha, C.N. & Machado, F.A. 2001.** Biodiversity in the Pantanal Wetland, Brazil. *In*: B. Gopal, W.J. Junk & J.A. Davis (eds.). Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation. Backhuys Publishers, Leiden, vol. 2, pp. 187-215.
- Silva, J.S.V. & Abdon, M.M. 1998.** Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 1703-1711.
- Skulberg, O.M. 2000.** Microalgae as a source of bioactive molecules – Experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12: 341-348.
- Soriano, B.M.A. 1999.** Caracterização climática da sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS. *In* Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. EMBRAPA Pantanal, Corumbá, p. 151-158.
- SOS Mata Atlântica & INPE. 2013.** Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2011-2012. Relatório Técnico. São Paulo, 61 p.
- Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V.Y.A., Santos, E. & Pietro, R.C.L.R. 2007.** Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Strophnodendron adstrigens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28(2): 221-226.
- Spurr, A.R. 1969:** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Stackebrand, 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 Systematic and Evolution Microbiology* 44: 846–849.
- Strunecký, O., Komárek, J. & Elster, J. 2012a.** Biogeography of *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) in western and central parts of Spitsbergen. *Polish Polar Research* 33: 369-382.
- Strunecký, O., Elster, J., Komárek, J. 2012b.** Molecular clock evidence for survival of Antarctic Cyanobacteria (Oscillatoriales, *Phormidium autumnale*) from Paleozoic times. *FEMS Microbiology Ecology* 82:482–90.
- Strunecký, O., Elster, J. & Komárek, J. 2011.** Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium *Phormidium murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea* 11(1): 57-71.
- Strunecký, O., Elster, J. & Komárek, J. 2010.** Phylogenetic relationship between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biology* 33: 1419-1428.

- Strunecký, O., Komárek, J., Johansen J., Lukešová A. & Elster, J. 2013.** Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 49: 1167-1180.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. 2003.** Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5157-5169.
- Teneva, I, Dzhabazov, B., Kovala, L. & Mladenov, K.S. 2005.** Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota). *Toxicon* 45: 711-725.
- Tokuda, H., Nishino, H., Shirahashi, H., Murakami, N., Nagatsu, A. & Sakakibara, J. 1996.** Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted mouse skin papilloma by digalactosyl diacylglycerols from the fresh water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Cancer Letters* 104:91-95.
- Turner, S. 1997.** Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *In*: D. Bhattacharya (ed). *The origin of the algae and their plastids*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Wilmotte, A. & Golubic, S. 1991.** Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Algological Studies* 64: 1-24.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. 1990.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576-4579.
- Wolk, C.P., Ernst, A. & Elhai, J. 2001. 1994.** Heterocysts metabolism and development. *In*: D.A. Bryant (ed.). *Molecular biology of the Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, pp. 769-823.
- Xia, X. & Xie, Z., 2001.** DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. 4.0.36. <http://web.hku.hk/xxia/software/software.htm>.
- Zagatto, P.A. & Aragão, M.A. 1992.** Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 23p.

- Zehr, J.P. & Turner, P.J. 2001.** Nitrogen fixation: nitrogenase genes and gene expression. *In*: J.H. Paul (ed.). *Methods in Marine Microbiology*. Academic Press, New York, pp. 271-286.
- Zehr, J.P., Carpenter, E.J. & Villareal, T.A. 2000.** New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. *Trends in Microbiology* 8: 68-73.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. & Steward, G.F. 2003.** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5: 539-554.
- Zehr, J.P., Mellon, M., Braun, S., Litaker, W., Steppe, T. & Paerl, H.W. 1995.** Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Applied Environmental Microbiology*. 61, 2527–2532.
- Zuker, M. 2003.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. – *Nucleic Acids Research* 31: 3406–3415.

7. ANEXO 1

SP400.852 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Ponta (18°59'00"S e 56°39'35"W) col. *K.R.S. Santos*, 04.V.2007. Amostra de cultura (CCIBt 3280).

SP400.857 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Ponta (18°59'00"S e 56°39'35"W) col. *C.F.S. Malone*, 22.IV.2008. Amostra de cultura (CCIBt 3275).

SP400.862 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Reserva (18°57'42"S e 56°37'26"W) col. *C.F.S. Malone*, 22.IV.2008. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3277.

SP400.869 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Ponta (18°59'00"S e 56°39'35"W) col. *C.F.S. Malone*, 30.X.2008. Amostra de cultura (CCIBt 3309).

SP400.889 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Reserva (18°57'42"S e 56°37'26"W) col. *C.F.S. Malone*, 30.X.2008. Amostra de cultura (CCIBt 3281).

SP427.778 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Ponta (18°59'00"S e 56°39'35"W) col. *K.R.S. Santos*, 04.V.2007. Amostra de cultura (CCIBt 3265).

SP427.779 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Nhumirim, Salina da Reserva (18°57'42"S e 56°37'26"W) col. *C.F.S. Malone*, 22.IV.2008. Amostra de cultura (CCIBt 3277).

SP427.780 – BRASIL. São Paulo: São Paulo, Aquário de água doce (23°32'51" S e 46°38'10" W) col. *S.M.P.B. Guimarães*, 2009. Amostra de cultura (CCIBt 3279).

SP427.781 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Firme, Salina Rondon (19°13'29"S e 56°57'14"W) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3322).

SP427.782 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Firme, Salina Rondon ($19^{\circ}13'29''S$ e $56^{\circ}57'14''W$) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3322.

SP427.783 – BRASIL. São Paulo: São Luís do Paraitinga, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia ($23^{\circ}20'12''S$ e $45^{\circ}08'44''W$) col. *W.A. Gama-Jr.*, 22.II.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3412).

SP427.784 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ($19^{\circ}34'S$ e $57^{\circ}01'W$) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3446).

SP427.785 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ($19^{\circ}34'S$ e $57^{\circ}01'W$) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3446.

SP427.786 – BRASIL. São Paulo: São Luís do Paraitinga, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia ($23^{\circ}20'12''S$ e $45^{\circ}08'44''W$) col. *W.A. Gama-Jr.*, 22.II.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3447).

SP427.787 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ($19^{\circ}34'S$ e $57^{\circ}01'W$) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3448).

SP 427.788 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ($19^{\circ}34'S$ e $57^{\circ}01'W$) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3448.

SP427.789 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê ($25^{\circ}04'08''S$ e $47^{\circ}55'88''W$) col. *W.A. Gama-Jr.* & *C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3449).

SP427.883 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê ($25^{\circ}04'08''S$ e $47^{\circ}55'88''W$) col. *W.A. Gama-Jr.* & *C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3524).

SP427.790 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê (25°04'08"S e 47°55'88"W) col. *W.A. Gama-Jr. & C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3465).

SP427.791 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê (25°04'08"S e 47°55'88"W) col. *W.A. Gama-Jr. & C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3465.

SP427.792 – BRASIL. São Paulo: São Paulo, Aquário de água doce (23°32'51" S e 46°38'10" W) col. *B. Pellegrini*, 2009. Amostra de cultura (CCIBt 3523).

SP427.930 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (19°34'S e 57°01'W) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3466).

SP427.931 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, **Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul** (19°34'S e 57°01'W) col. *C.F.S. Malone*, 10.X.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3468).

SP427.932 – BRASIL. São Paulo: São Paulo, Aquário de água doce (23°32'51" S e 46°38'10" W) col. *B. Pellegrini*, 2009. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3523.

SP428.678 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê (25°04'08"S e 47°55'88"W) col. *W.A. Gama-Jr. & C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra da natureza correspondente a linhagem CCIBt 3524.

SP428.679 - BRASIL. São Paulo: Peruíbe, Estação Ecológica Juréia-Itatins (24° 24.146'S e 47° 03.648'W) col. *W.A. Gama-Jr., G.S. Hentschke, C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna*, 145, 15.VIII.2011. Amostra de cultura (CCIBt 3570).

SP428.680 - BRASIL. São Paulo: Peruíbe, Estação Ecológica Juréia-Itatins (24° 24.146'S e 47° 03.648'W) col. *W.A. Gama-Jr., G.S. Hentschke, C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna*, 145, 15.VIII.2011. Amostra de cultura (CCIBt 3571).

SP428.681 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (19°34'S e 57°01'W) col. *C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna*, 06.V.2012. Amostra de cultura (CCIBt 3572).

SP428.682 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (19°34'S e 57°01'W) col. *C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna*, 06.V.2012. Amostra de cultura (CCIBt 3573).

SP428.683 – BRASIL. Mato Grosso: Corumbá, Pantanal do Miranda, Base de Estudos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (19°34'S e 57°01'W) col. *C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna*, 06.V.2012. Amostra de cultura (CCIBt 3595).

SP428.684 – BRASIL. Mato Grosso: Pantanal da Nhecolândia, Fazenda Guanandi, **Lagoa Salitrada** (19°01'27"S e 55°55'28"W) col. *K.R.S. Santos*, 25.X.2011. Amostra de cultura (CCMA-UFSCAR 374).

SP428.685 – BRASIL. São Paulo: São Paulo, Represa Billings (23°47' S e 46°40'W) col. *C.L. Sant'Anna*, 16.IV.2000. Amostra de cultura (CCIBt 3162).

SP428.686 – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Jardim Botânico, Coletor Vera Regina Werner (30°03'06.07" S e 51°10'37.95"W) col. *V.R. Werner*, 17.IV.2007. Amostra de cultura (CCIBt 3261).

SP428.687 - BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê (25°04'08"S e 47°55'88"W) col. *W.A. Gama-Jr. & C.F.S. Malone*, 29.VI.2010. Amostra de cultura (CCIBt 3469).

8. ANEXO 2

Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects

Luciana R. Carvalho,¹ Adriana Costa-Neves,² Geanne A. A. Conserva,¹ Rafael L. Brunetti,³ Guilherme S. Hentschke,¹ Camila F. S. Malone,¹ Luce M. B. Torres,¹ Célia L. Sant'Anna,¹ Marisa Rangel³

¹Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia, SP, Brazil,

²Instituto Butantan, Laboratório de Biologia Celular, Brazil,

³Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia, Brazil.

Abstract: An investigation was directed towards the antiacetylcholinesterase activity of the acid aqueous and methanolic extracts of five cyanobacterial taxa, which encompasses an enzymatic inhibition assay and the evaluation of the physiological responses of mice to cyanobacterial extracts along with toxicological observations. The strains *Calothrix* sp. CCIBt 3320, *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321, *Phormidium* cf. *amoenum* CCIBt 3412, *Phormidium* sp. CCIBt 3265, and *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223 were from the São Paulo Botanical Institute Cyanobacterial Culture Collection and all of them showed inhibitory effect on acetylcholinesterase activity (*in vitro*) and caused systemic effects similar to those described for anticholinesterase drugs (*in vivo*). With the exception of *G. splendidum* and *Tolypothrix* sp. strains, all extracts produced reversible antiacetylcholinesterase effects in mice. Complementary histopathological studies were carried out on tissues from animals administered with *Phormidium* sp. and *P. cf. amoenum*.

Introduction

Cyanobacteria are common members of microscopic populations of freshwater lakes and reservoirs worldwide. They are capable of forming blooms and producing potent toxins, which can present serious human and animal health problems (Van Apeldoorn et al., 2007; Pearson et al., 2010). Besides cyanotoxins, these organisms have the ability to synthesize considerable amounts of structurally distinct compounds that can be used as food and feed, fuel, dyes, sunscreen agents, as well as therapeutic drugs (Abed et al., 2009).

In scientific literature there is an appreciable amount of studies on the potential use of cyanobacterial compounds as medication, along with cyanotoxin poisoning cases in humans by ingesting contaminated water and food or by accidental administration during dialysis treatment. Some of these compounds are already being employed in anal fissures and common fistula treatment, as well as anti-HIV drugs (Botos & Swlodawer, 2003; Garrido et al., 2007), however, one of the most interesting set of activities displayed by cyanobacterial metabolites is their inhibitory action on certain enzymes

(Grainger et al., 1989; Chen et al., 2007; Zelik et al., 2009). The cyanotoxins microcystins and anatoxin-a(S) have anti-phosphatase and anticholinesterase effects, respectively (Van Apeldoorn et al., 2007). However, there are other antienzymatic activities described for compounds synthesized by these organisms (Radau, 2000; Sisay et al., 2009; Matthew et al., 2010).

Compounds bearing antiacetylcholinesterase action play a very important role in the search for potential drug candidates against Alzheimer disease (AD); this neurodegenerative condition is associated with brain neurotransmitter deficits and its symptomatic treatment is the restoration of cholinergic function by inhibiting acetylcholinesterase (Francis et al., 1999; Trevisan et al., 2003).

Therefore, the effect of an antiacetylcholinesterase drug is a long-lasting and more effective stimulation of the cholinergic system, which results in responses from autonomic effector organs, autonomic ganglia, as well as skeletal muscles, and from cholinergic receptors in the Central Nervous System. According to its molecular structure, each antiacetylcholinesterase compound

Revista Brasileira de Farmacognosia
Brazilian Journal of Pharmacognosy
23(3): 471-480, May/June 2013



Article

Received 26 Nov 2012
Accepted 16 Apr 2013
Available online 14 May 2013

Keywords:

acetylcholinesterase activity
Calothrix sp.
Geitlerinema splendidum
Phormidium cf. *amoenum*
Phormidium sp.
Tolypothrix sp.

ISSN 0102-695X
DOI: 10.1590/S0102-695X2013005000037

has its own chemical characteristics that determine its reactivity. As a consequence, the binding between the antiacetylcholinesterase compound and the enzyme shall be either a short, medium (reversible), or long-term (irreversible) association, being considered as potential therapeutic drugs only the ones which form reversible bonds (Nair et al., 2004).

There is an ongoing search for new bioactive compounds in cyanobacterial extracts from the São Paulo Institute of Botany Cyanobacterial Culture Collection strains, where some caused similar physiological responses in the mouse bioassays, which relate to responses demonstrated by antiacetylcholinesterase compounds. Such extracts were evaluated for AChE inhibition and short-term toxicity to mammals; a first step for further studies.

Materials and Methods

The organisms and extract preparation

Five different cyanobacterial strains were studied: *Calothrix* sp. CCIBt 3320, *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321, and *Phormidium* cf. *amoenum* CCIBt 3412, isolated from soil samples in the Atlantic Rainforest, State Park of the Serra do Mar, SP (23°24' S and 45°11'06" W); *Phormidium* sp. CCIBt 3265, isolated

from an alkaline lake from the Pantanal, MS (18°57'42" and 56°37'26"); and *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223, from Guarapiranga Reservoir waters, SP (23°43' S and 46°32') (Figure 1). The strains were cultured under the following conditions: ASM-1 medium, temperature 23±1 °C, and continuous irradiance 40-50 Mmol/m² s⁻¹ (Azevedo & Sant'Anna, 2003).

For each strain, the biomass obtained was freeze-dried, divided into two halves: one of them subjected to ultrasound-assisted extraction (5x, 30 s, 100 W) with 0.1 M aqueous acetic acid (AAE) and the other, with methanol 100% (ME). After centrifugation (1,750 x g, 50 min), the aqueous supernatants were lyophilized and the methanolic ones were dried via speed-vac centrifugation. The dried samples were stored in hermetically sealed vials, at -20 °C, until analysis (Conserva et al., 2011).

In vitro assay: qualitative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity

This *in vitro* assay was accomplished following Rhee et al. (2001) TLC autographic protocol: aliquots of 100 µg of each dried extract were dissolved and spotted on a pre-coated plate (Silica gel 60 F₂₅₄, 10x 10 cm, layer thickness 0.2 mm, E. Merck, Germany). The chromatogram was developed with mobile phase CHCl₃: MeOH:H₂O (64:36:8, v/v/v), dried and sprayed with the enzyme

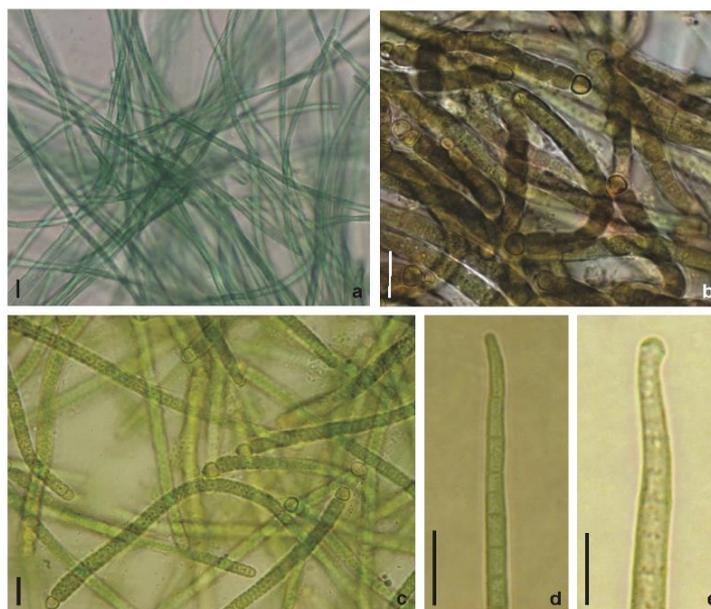


Figure 1. a. *G. splendidum* CCIBt 3223; b. *Calothrix* sp. CCIBt 3320; c. *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321; d. *Phormidium* sp. CCIBt 3265; e. CCIBt 3412 *Phormidium* cf. *amoenum*.

solution (6,66 U mL), thoroughly dried and incubated in a humid atmosphere, at 37 °C, for 20 min. Subsequently, the plate was sprayed with a 0.25% 1-naphthylacetate in ethanol plus 0.25% aqueous Fast Blue B salt solution. The spots corresponding to potential acetylcholinesterase inhibitors were unambiguously identified as clear zones against a purple background. The Electric eel AChE type V (Product no C 2888, 1000 U) was purchased from Sigma as well all analytical grade reagents.

The retention factors (R_f) of the compounds that positively reacted against the enzyme were also calculated.

In vivo assay: acute toxicity study (i.p.)

Toxicological assays were performed in triplicate on each crude extract by using mice of the same sex, which simultaneously allowed the achievement of reliable data and the use of a minimum number of animals (Rangel et al., 2012). The procedures were carried out according to the WHO guidelines (Harada et al., 1999) and a single dose of 1,000 mg dried cells/kg body weight was used, which enabled extracts to be ranked as low toxicity, if animal death was caused (Lawton et al., 1994). Ethical clearance was obtained from the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute - Protocol No. 385/07.

Male Swiss mice (19-21 g, 50 days) were intraperitoneally (*i.p.*) treated with dried aqueous acetic acid or methanolic cyanobacterial extracts dissolved in Milli-Q water; the control animals received only the vehicle (Milli-Q water), according to WHO protocol. Any changes in the skin, fur, eyes and respiratory, autonomic and central nervous system, somamotor activity and behavior pattern were observed, and signs of tremors, convulsions, salivation, diarrhea and lethargy and coma were noted as well. The animals were observed for 8

days following administration because, after an extended observation time, notable findings on tissue lesions can be observed (Rangel et al., 2012). Surviving animals were euthanized with CO₂, necropsy findings were recorded and tissue samples were taken.

Results and Discussion

Extract preparation and qualitative evaluation of AChE inhibitory activity

The freeze-dried cyanobacterial biomass and the dried extract weights are displayed in Table 1, along with the qualitative results of the antiacetylcholinesterase bioautographic assay (Figure 2) and the R_f (retention factors) of spots corresponding to antiacetylcholinesterase compounds.

All extracts were previously analyzed for the presence of microcystins (Conserva et al., 2011).

In vivo assays: acute toxicity study (i.p.)

In acute toxicity testing, among the treated animals, the ones that received the AAE *G. splendidum* CCIBt 3223 and only one administered with AAE *Tolypothrix* CCIBt 3321 died, while all the others showed mild and transient physiological effects, which can be associated with the intrinsic side effects induced by anti-AChE drugs (McGleenon et al., 1999; Xavier et al., 2007; 2008).

The physiological responses, time to death, and gross changes seen post-mortem are compiled in Chart 1.

Similar responses were observed in animals treated with extracts of all studied strains, which are also very similar to those observed in the mouse studies on anti-AChE drugs (McGleenon et al., 1999; Xavier, 2008) and such responses are related to muscarinic and nicotinic

Table 1. Biomass and extract dry weights, qualitative anticholinesterase assay results and R_f of the AntiAChE compounds.

Extract strains	Freeze-dried biomasses (g)	Dried extracts (g)	AntiAChE activity	R_f of antiAChE compounds
AAE <i>G. splendidum</i> CCIBt 3223	0.7847	0.3941	+	0.28; 0.66
ME <i>G. splendidum</i> CCIBt 3223	0.6675	0.2308	+	0.26; 0.58
AAE <i>Calotrix</i> sp. CCIBt 3320	0.4937	0.1888	+	0.64
EM <i>Calotrix</i> sp. CCIBt 3320	0.2242	0.1135	+	0.37
AAE <i>Tolypothrix</i> sp. CCIBt 3321	0.4050	0.1868	+	0.62
EM <i>Tolypothrix</i> sp. CCIBt 3321	0.3813	0.1144	+	0.38
AAE <i>Phormidium</i> sp. CCIBt 3265	0.4871	0.1727	+	0.66
EM <i>Phormidium</i> sp. CCIBt 3265	0.6398	0.1875	+	0.45; 0.59; 0.66; 0.73
AAE <i>Phormidium</i> cf. <i>amoenum</i> CCIBt 3412	0.5052	0.1485	+	0.66
EM <i>Phormidium</i> cf. <i>amoenum</i> CCIBt 3412	0.8941	0.2129	+	0.55; 0.59; 0.58

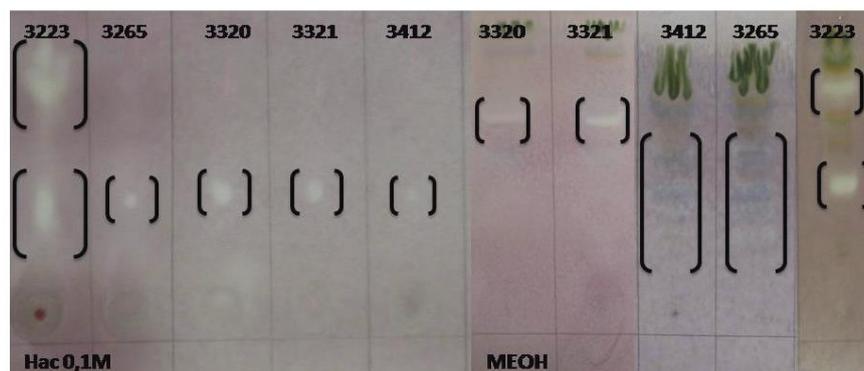


Figure 2. AE CCIBt 3223, 3265, 3320 and 3421 TLC qualitative antiacetylcholinesterase assay (a, b, c, d and e); ME CCIBt 3223, 3265, 3320 and 3421 TLC qualitative antiacetylcholinesterase assay (f, g, h, i, and j). Brackets indicate the anticholinesterase compounds.

Chat 1. Physiological responses, observation time or time to death, and macroscopic lesions observed *post-mortem*.

Strains/extract	Physiological responses	Observation time	Main necropsy findings
AAE- <i>G. splendidum</i> CCIBt 3223	Dyspnea, loss of reflexes, and prostration	Deaths two hours after extract administration	With no apparent macroscopic changes
ME- <i>G. splendidum</i> CCIBt 3223	Abdominal contractions, loss of reflexes, and agitation	Euthanasia seven days after administration	Hemorrhagic lungs
AAE- <i>Calotrix</i> sp. CCIBt 3320	Piloerection, dyspnea, abdominal contractions, eyebrow ptosis, loss of reflexes and transitory paralysis	Euthanasia seven days after administration	White spots on the liver; liver adhered to the intestines.
ME- <i>Calotrix</i> sp. CCIBt 3320	Loss of reflexes, transitory paralysis, intense abdominal contractions, dyspnea and eyebrow ptosis	Euthanasia seven days after administration	Black spots located between the liver lobes (N=1)
AAE- <i>Tolypothrix</i> sp. CCIBt 3321	Transitory paralysis, abdominal contractions, piloerection, dyspnea, and diarrhea	Death four days after administration (N=1); euthanasia seven days after administration (N=2)	Diminished liver size, fusion of lobes and white spots on the liver. (N=1)
ME- <i>Tolypothrix</i> sp. CCIBt 3321	Agitation, itch, scrotal edema, and abdominal contractions.	Euthanasia seven days after administration	With no apparent macroscopic changes
AAE- <i>Phormidium</i> sp. CCIBt 3265	Dyspnea, abdominal contractions, and loss of reflexes.	Euthanasia seven days after administration	Hemorrhagic lungs, white spots on the liver; abnormalities in gallbladder morphology
ME- <i>Phormidium</i> sp. CCIBt 3265	Abdominal contractions, piloerection, prostration, eyebrow ptosis transitory paralysis, and dyspnea	Euthanasia seven days after administration	Hemorrhagic lungs (N=2), and degraded lungs (N=1); green spot on the stomach
AAE- <i>Phormidium</i> cf. <i>amoenum</i> CCIBt 3412	Prostration, piloerection abdominal contractions, and loss of reflexes	Euthanasia seven days after administration	Hemorrhagic lungs (N=1); fusion of liver lobes; increased peritoneal thickness, with hemorrhagic area (N=1)
ME- <i>Phormidium</i> cf. <i>amoenum</i> CCIBt 3412	Muscle spasms, abdominal contractions, eyebrow ptosis, dyspnea, and loss of reflexes	Euthanasia 7 days after administration	Hemorrhagic lungs; diminished liver size and presence of black spots; bubble on the left kidney (N=2); green spot on the stomach

actions as well as on the central nervous system.

Among the muscarinic manifestations are dyspnea, abdominal cramps and diarrhea; among those resulting from overstimulation of the nicotinic receptors are muscle cramps, motor weakness, paralysis, tachycardia, and piloerection, and among those due to Central Nervous System are tremors, ataxia, and walking difficulty. The extent, the progression and the persistence of clinical observations depend on administration route, bioactive compound structure, and exposure magnitude (Andrade Filho & Romano, 2001). The compound structure defines the bond nature to the enzyme, which can be reversible, or irreversible, being the intermediate compound short, medium (reversible), or long acting (irreversible), respectively. The long acting intermediates are considered to be toxic (Nair et al., 2004).

The clinical signs complete regression ranged between two to three hours in three out of five groups of mice tested; that is, AAE *G. splendidum* CCIBt 3223 caused acute intoxication and only one animal that received AAE *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321 died after four days from administration.

The results also showed that the AAE of the strain *G. splendidum* CCIBt 3223 possessed a lethal anti-AChE activity, most likely by the presence of long acting inhibitory substances to the enzyme (Nair et al., 2004), but there is insufficient information on the AE *Tolypothrix* sp. effects.

Anatoxin-a(S), anticholinesterase with potent lethal effect, is the only organophosphate produced by Cyanobacteria (Van Apeldoorn et al., 2007); meanwhile, great part of the compounds considered highly toxic are synthetic, such as carbamate Aldicarb (Cazenave et al., 2005) and of the organophosphate Parathion (Bardin et al., 1994).

Our results of the *in vitro* anti-AChE assay and clinical observations indicate that the methanolic and aqueous extracts of *Calothrix* sp. CCIBt 3320, *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321, *Phormidium* sp. CCIBt 3265, *Phormidium* cf. *amoenum* CCIBt 3412, and *G. splendidum* CCIBt 3223 contain compounds which inhibit the enzyme acetylcholinesterase in a transient or reversible way.

Compounds which act as transient anticholinesterase drugs should be evaluated as potential therapeutic drugs because the current cholinesterase inhibitors prescribed for the treatment of AD are tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine, and serine which present several adverse side-effects such as hepatotoxicity, gastrointestinal disturbance and depression (Yoon et al., 2008). Due to these limiting factors for their use, new anticholinesterase drugs will be well received.

Aside from allowing a detailed observation of the biological responses to active compounds, an important outcome of the mouse bioassay is to determine the nature and extent of the adverse effects to a single

dose or an overdose of a toxic or a therapeutic compound (Xavier, 2008). In our studies, with the exception of the acetic acid extract from *G. splendidum* CCIBt 3223 and *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321, all other extracts are not lethal and caused physiological responses associated with the pharmacological actions of antiacetylcholinesterase compounds.

Complementary histopathological studies were carried out on liver, kidney, and lung tissues of animals intoxicated with extracts of *Phormidium* sp. CCIBt 3265 and *P. cf. amoenum* CCIBt 3412.

Previous studies have described and illustrated the microscopic lesions caused by CCIBt strain 3223 (Rangel et al., 2012). The mice lungs were severely affected, presenting hemorrhage foci, edema, alveolar collapse, and hyperplasia, due to an increase in the number of immune system cells (macrophages). Disorganization of the hepatic parenchyma, necrosis, loss of vein endothelium, and presence of giant multinuclear cells and polymorphonuclear cells in the liver were observed. Finally, the kidneys of mice intoxicated with AAE CCIBt 3223 (*G. splendidum*) presented alterations in the convoluted tubules and necrotic areas (Rangel et al., 2012).

Histological sections from control animal are shown in Figure 3. The main alterations observed in the organs of animals tested with AAE CCIBt 3265 were: in the lungs, edema, hemorrhage, and alveolar collapse; and in the liver, areas of necrosis and steatosis (Figure 4).

In the animals that received ME CCIBt 3265, necrosis, steatosis, damage in endothelial cells of central lobular veins, enlarged sinusoids, inflammatory infiltrate close to bile duct, and giant multinuclear cells were observed in the liver; in the lungs, hemorrhage and alveolar collapse; and in the kidneys, the interstitial space between tubules was greater than normal and there was increase in light of convoluted tubules (Figure 5).

The microscopic lesions provoked by AAE CCIBt 3412 were shown in the Figure 6: granulomatous foci, hemorrhage, and alveolar collapse were seen in the lungs, large amounts of inflammatory infiltration close or not to bile duct cells were seen in the liver, and enlarged convoluted tubules were seen in the kidneys.

In the only study concerning antiacetylcholinesterase effects on mice, the microscopic lesions observed were: in the lungs, hemorrhage, edema and congestion; in the liver, vacuolar degeneration and in the kidneys, hemorrhage, congestion and tubular degeneration (Xavier, 2008). Comparison between the findings on AAE and ME CCIBt 3265 microscopic lesions showed similarity with the results obtained by Xavier (2008). Other histological findings could be attributed to unknown substances in the extracts.

In conclusion, the present study identifies *G. splendidum* CCIBt 3223 as a producer of a toxin, which administered as a single dose of 1,000 mg dried cells/kg

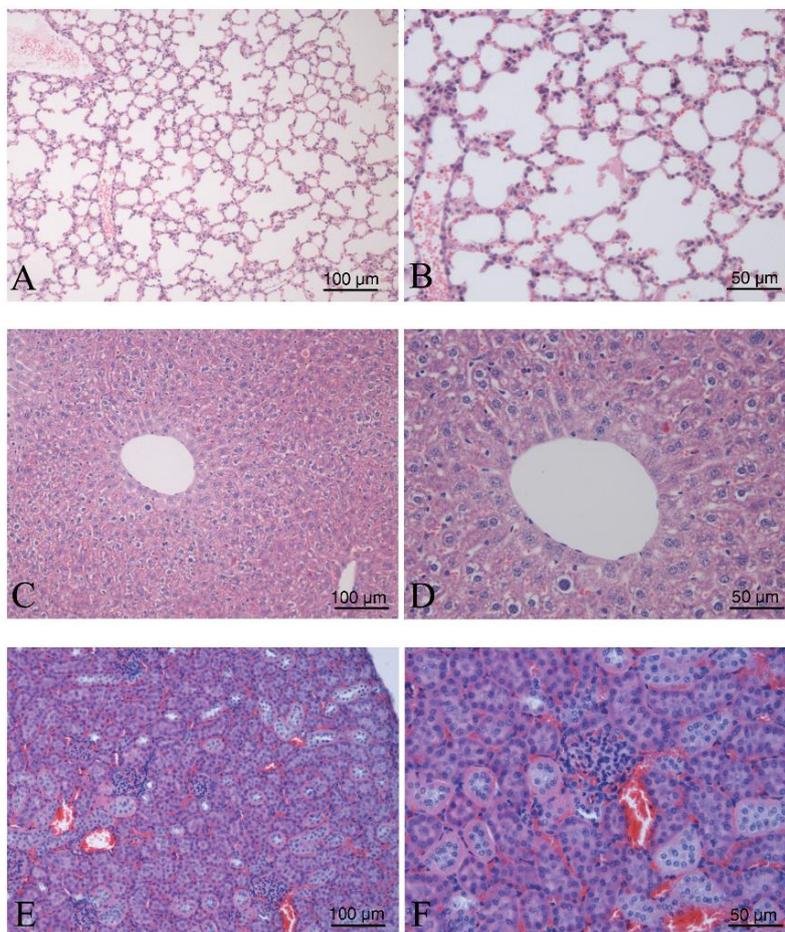


Figure 3. Histological sections from control animals (HE). A and B: Lung (100x, 200x). C and D: Liver (100x, 200x). E and F: Kidney (100x, 200x).

body weight, causes animal death within 2 h and indicates ME- *Tolypothrix* sp. CCIBt 3321 as a candidate for further studies for potential anticholinesterase drugs.

Acknowledgments

The authors thank the Instituto Nacional em Ciência e Tecnologia em Toxinas; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Author's contributions

LRC designed the study, supervised the laboratory work, contributed to analysis of the data and drafted the paper and wrote the final manuscript; ACN contributed to histological studies and to critical reading of the manuscript; GAAC contributed in running the laboratory work and to chemical and biological studies; RLB contributed to toxicological analysis; GSH and CFMS contributed to cyanobacterial collection, identification and culture. LMBT contributed to biological analysis and to

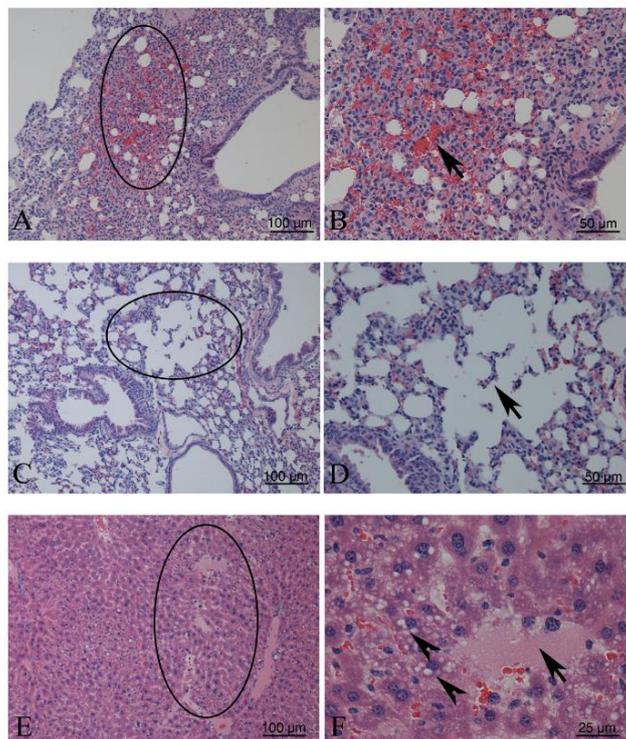


Figure 4. Histological alterations observed in the organs of animals tested with AAE CCIBt 3265 (HE). A, B, C and D: Lung. A: Hemorrhagic area and alveolar collapse (circle) (100x). B: Erythrocytes extravasation (arrow) (200x). C: Edema (circle) (100 x). D: Disruption the wall of a pulmonary alveolus (200x). E and F: Liver. A: Areas of necrosis and steatosis (100x). B: Necrotic area (arrow), steatotic cells (arrow heads) (400x).

critical reading of the manuscript; CLS contributed to cyanobacterial identification and to critical reading of the manuscript and MR contributed to toxicological studies and to critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approve the submission.

References

- Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol* 106: 1-12.
- Andrade Filho A, Romano C 2001. Anticolinesterásicos. In: Andrade Filho A, Campolina D, Dias MB (eds.) *Toxicologia na Prática Clínica*. Belo Horizonte: Editora Folium, p 53-60.
- Azevedo MTP, Sant'Anna CL 2003. *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algol Stud* 109: 79-92.
- Bardin PG, Van Eeden SF, Moolman JA, Foden AP, Joubert JR 1994. Organophosphate and carbamate poisoning. *Arch Intern Med* 154: 1433-1441.
- Botos I, Swlodawer A 2003. Cyanoviridin-N: a sugar-binding antiviral protein with a new twist. *Cell Mol Life Sci* 60: 277-287.
- Cazenave SOS, Itho SF, Lanaro R, Chasin AAM 2005. Aldicarb: uma possibilidade de análise com finalidade forense. *Rev Bras Toxicol* 18: 105-111.
- Chen S, Zhang X, Li L, Le W 2007. Current experimental therapy for Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 5: 127-134.
- Conserva GAA, Sant'Anna CL, Cambui CCN, Brunetti RL, Rangel M, Torres LMB, Young MCM, Carvalho LR 2011. Prospecção de atividades toxicológicas e farmacológicas em cepas de cianobactérias da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica. <http://www.raibt.net.br/cdraibt2011/Busca.html>.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK 1999. The

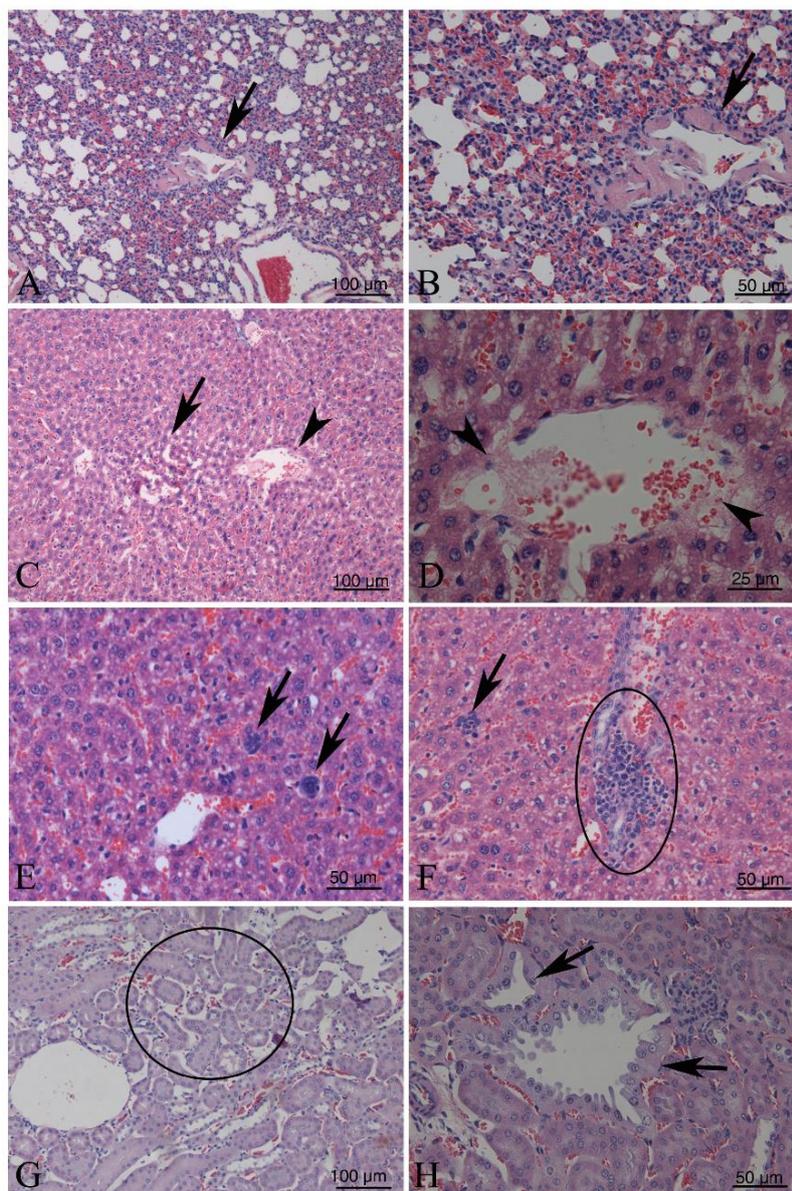


Figure 5. Histological alterations observed in the organs of animals tested with ME CCIBt 3265. A and B: Lungs. Hemorrhage and alveolar collapse. Collapse of an artery. (arrow) (100x, 200x). C, D, E and F: Liver. C and D: Enlarged sinusoids (arrow) and damage in endothelial cells of central lobular veins (arrow head) (100x, 400x). E: Giant multinuclear cells (200x). F: Mononuclear inflammatory infiltrate (arrow) inflammatory infiltrate close to bile duct (circle) (200X). G and H: Kidney. G: Interstitial space between tubules was greater than normal (circle) (100x). H) Increase in light of convolute tubules (arrow) (200x).

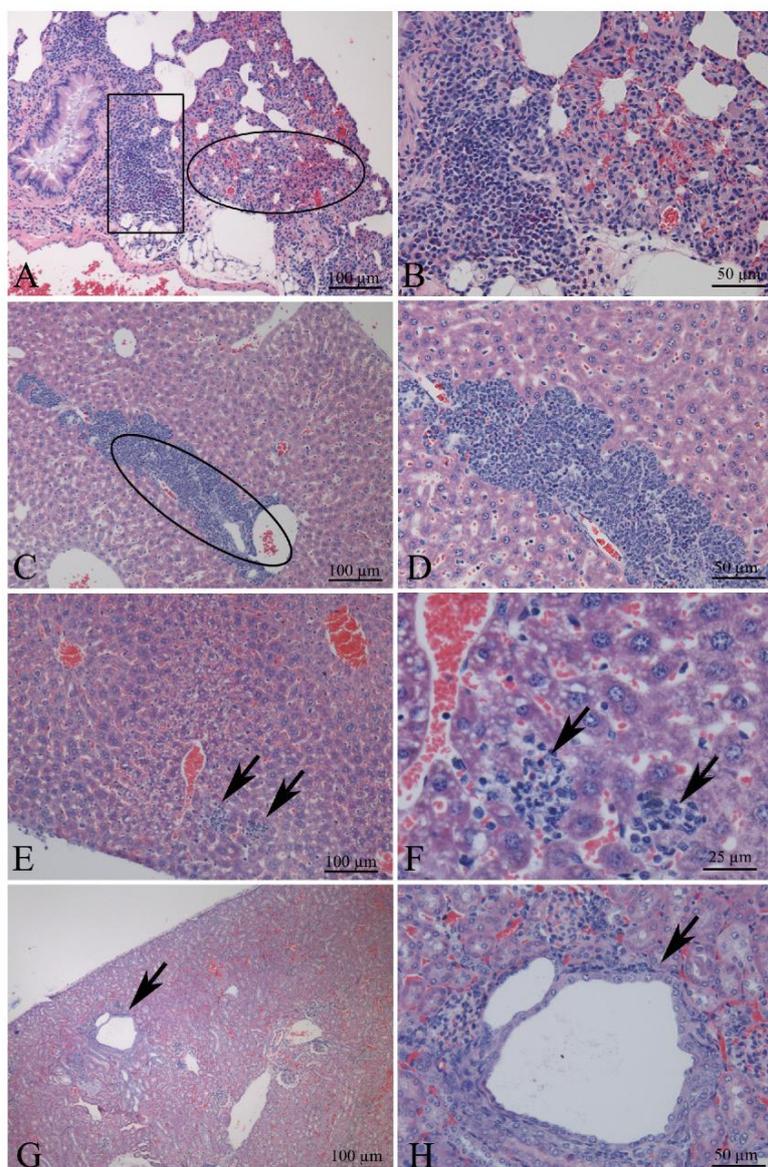


Figure 6. Histological alterations observed in the organs of animals tested with AE CCIBt 3412. A and B: Lungs. Granulomatous foci (rectangle), hemorrhage and alveolar collapse (circle) (100x, 200x), C, D, E and F: Liver. C and D) Large amounts of inflammatory infiltration close to bile duct (100X, 200X). E and F) Mononuclear inflammatory infiltrate (arrows) (100X, 400X). G and H) Kidney. Enlarged convoluted tubules (arrow) (100X, 200X).

- cholinergic hypothesis of Alzheimer disease; a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.
- Garrido R, Lagos N, Lagos M, Rodriguez-Navarro AJ, Garcia C, Truan D, Henriquez A 2007. Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *Colorect Dis* 9: 619-624.
- Grainger SL, Peat A, Tiwari DN, Whitton BA. 1989. Phosphomonoesterase activity of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. *Microbios* 59: 7-17.
- Harada KI, Kondo F, Lawton L 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Chorus I & Bartram J (org.) *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. New York: E & FN SPON, p 369-405.
- Lawton LA, Beattie KA, Hawser SP, Campbell DL, Codd GA 1994. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (org) *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, Special Publication No 149.
- Matthew S, Ratnayake R, Becerro MA, Ritson-Williams R, Paul VJ, Luesch H. 2010. Intramolecular modulation of serino-protease inhibitor activity in a marine cyanobacterium with antifeedant properties. *Mar Drugs* 8: 1803-1816.
- McGleeson BM, Dynan KB, Passmore AP 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 48: 471-480.
- Nair VP, Hunter JM 2004. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Cont Edu Anaest Crit Care Pain* 4: 164-168.
- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindropemopsin. *Mar Drugs* 8: 1650-1680.
- Radau G 2000. Serino proteases inhibiting cyanopeptides. *Pharmazie* 55: 555-560.
- Rangel M, Brunetti RL, Garcia AN, Cambui CCN, Conserva GAA, Neves AC, Sant'Anna CL, Carvalho LR 2012. Acute effects of three *Geitlerinema* spp. (Cyanobacteria) extracts administrated in mice: symptoms and histopathological aspects. *Phytochem Rev* DOI 10.1007/s11101-012-9240-x.
- Rhee K, Meent M, Ingkaninan K, Veerpoorte R 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 915: 217-223.
- Sisay MT, Hautmann S, Mehner C, König GM, Bajorath J, Gustschow M 2009. Inhibition of human leukocyte elastase by brunsvicamides A-C: cyanobacterial cyclic peptides. *J Med Chem* 4: 1425-1429.
- Trevisan MTS, Macedo FVV, Meent MV, Rhee IK, Verpoorte R 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinérgica para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim Nova* 26: 301-304.
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI 2007. Review - Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 51: 1-60.
- Xavier FG, Righi DA, Spinosa, HS 2007. Toxicologia do praguicida Aldicarb ("chumbinho"): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. *Cienc Rural* 37: 1206-1211.
- Xavier FG 2008. Intoxicação por Aldicarb ("chumbinho"): I. Estudo das alterações "post-mortem" microscópicas em cães e gatos. II. Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos. São Paulo, 201 p. PhD Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Zelik P, Lukesova A, Voloshko LN, Stys D, Kopecky J. 2009. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *J Enzym Inhib Med Ch* 24: 531-536.
- Yoon NI, Chung HY, Kim HR, Choi JS 2008. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish Sci* 74: 200-207.

***Correspondence**

Luciana Retz de Carvalho
 Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia
 Av. Dr. Miguel Stéfano, 3689, Água Funda, 04301-902 São Paulo-SP, Brasil
 lretz@ibot.sp.gov.br
 Tel. 55 11 5067 6119
 Fax: 55 11 5073 6378