Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero Anabaena isoladas de corpos d'água brasileiros

# **Ricardo Yukio Honda**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba 2009

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Yukio Honda Biólogo

Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero Anabaena isoladas de corpos d'água brasileiros

> Orientadora: Profa. Dra. MARLI DE FÁTIMA FIORE

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba 2009

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Honda, Ricardo Yukio

Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de corpos d'água brasileiros / Ricardo Yukio Honda. - - Piracicaba, 2009. 154 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009. Bibliografia.

1. Biologia molecular 2. Cyanophyta 3. Eutrofização 4. Meios de cultura - Isolamento e purificação 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Reservatórios 7. RNA ribossômico I. Títu

CDD 589.46 H771c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Catarina e Toshi (in memoriam),

Pelo exemplo de amor, força e moderação em todos os momentos, pelas oportunidades oferecidas, apoio e carinho que sempre demonstraram por mim,

**DEDICO.** 

Ao meu irmão Hide,

Pelo companheirismo e amizade,

OFEREÇO.

### AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação e oportunidade concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (ESALQ/USP), pela oportunidade e apoio fornecidos;

À Dra. Célia Leite Sant'Anna e ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda pela disponibilização do microscópio;

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, pelo suporte fornecido;

Ao Dr. José Maria dos Santos Vieira, pelo fornecimento de linhagens de cianobactérias;

À Dra. Adriana Sturion Lorenzi e doutoranda Janaína Rigonato, pelo auxílio na revisão e formatação da tese;

À mestranda Tânia Keiko Shishido pelo fornecimento de amostras ambientais do Ceará;

À Valentina de Fátima de Martin (CEBETEC, ESALQ/USP) pelo auxílio nas análises moleculares;

Ao Sr. Ivan Canale (SEMAE-Piracicaba), pelo fornecimento da amostra do Rio Piracicaba;

Aos membros do "Barco Escola da Natureza" de Americana, SP, especialmente ao Sr. João, Sr. José e Sra. Aline, pelo apoio e atenção recebidos;

A todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo,

**Muito obrigado!** 

"Há homens que lutam um dia e são bons. Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, há os que lutam toda a vida. Esses são os imprescindíveis".

Bertolt Brecht

# SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Florações de cianobactérias e cianotoxinas	19
2.2 Importância do gênero Anabaena	24
2.3 Taxonomia polifásica e caracteres fenotípicos	28
2.4 Sistemática molecular	41
2.5 Monitoramento e detecção de cianobactérias	46
2.6 Material e métodos	47
2.6.1 Locais de amostragens	47
2.6.2 Isolamento e cultivo de Anabaena	50
2.6.3 Análise fenotípica dos isolados	52
2.6.4 Análise genética	52
2.6.4.1 Extração de DNA genômico	52
2.6.4.2 Amplificação por PCR dos genes RNAr 16S, rpoC1, rbcL e tufA	53
2.6.4.3 Clonagem, transformação e seqüenciamento	54
2.6.4.4 Análise filogenética	56
2.6.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	57
2.7 Resultados e Discussão	60
2.7.1 Obtenção das linhagens de Anabaena	60
2.7.2 Análise morfológica	65
2.7.3 Análise de componentes principais (ACP)	79
2.7.4 Análise filogenética	92
2.7.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	101
3 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	. 113
APÊNDICE 1	131
APÊNDICE 2	151

#### **RESUMO**

# Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero Anabaena isoladas de corpos d'água brasileiros

Com o advento dos estudos moleculares evolutivos baseados nas sequências dos genes de RNAr 16S em cianobactérias, a taxonomia de Anabaena (Cyanobacteria) tem sido amplamente discutida e uma revisão deste gênero faz-se necessária. Os problemas variam desde o nível genérico, tal como o grupo Anabaena – Aphanizomenon, até níveis de diferenciação de linhagens (morfoespécies). Estudos moleculares de linhagens de Anabaena isoladas de ecossistemas brasileiros são inexistentes. A fim de se explorar a diversidade, filogenia e diversificação evolutiva de Anabaena isoladas de ambientes brasileiros, estudos fenotípicos e genotípicos foram realizados no presente estudo. Um total de 43 isolados foram obtidos de corpos d'água do Estado de São Paulo (Reservatórios Billings, Santo Grande, Rio Piracicaba e Lago da ESALQ/USP (Engenharia) e do Estado do Ceará (Lagoa do Povoado Nova Aurora e Rio Camarão). As espécies de Anabaena isoladas foram identificadas como A. aphanizomenoides Forti, A. circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault, A. crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg, A. cf. fallax Komárek et Komárková-Legnerová e A. planctonica Brunnthaler. Os meios de cultura usados no isolamento das cianobactérias foram AA/4, ASM-1 e BGN, este último também nas variantes com 50% de NaNO3 (BG50) e sem nitrato (BGS), com ou sem adição de vitamina B12. O meio ASM-1 não promoveu o crescimento de Anabaena. As espécies A. circinalis e A. crassa não cresceram no meio de culturaBGN com 17,65 mM de NaNO<sub>3</sub>, apresentando crescimento no meio BG50. A adição de vitamina B12 favoreceu o crescimento de A. circinalis. Os caracteres morfológicos analisados para 23 isolados foram o comprimento (compr) e diâmetro (diam) da célula vegetativa (V), heterócito (HT), acineto (AC), espira (ES), razões (R) comprimento/diâmetro para V, HT e AC e razão diâmetro/comprimento para ES (RES). O diâmetro da bainha (diamBA) foi também avaliado. As análises de componentes principais (ACP) confirmaram que a espira é uma característica importante para separar as morfoespécies A. circinalis, A.crassa e A. cf. fallax. RV e RHT foram diacríticos para diferenciação de A. cf. fallax. O comprimento do acineto (comprAC) foi importante para diferenciar A. aphanizomenoides de A. planctonica. A bainha diferenciou A. crassa das outras morfoespécies. As análises filogenéticas para o RNAr 16S mostraram os isolados brasileiros de A. circinalis, A. crassa, A. planctonica, A. aphanizomenoides e A. cf. fallax em agrupamentos separados, confirmando os resultados dos caracteres morfológicos. Com exceção da A. planctonica, as sequências de RNAr 16S dos isolados brasileiros não agruparam com linhagens relativas provenientes de outros países, indicando que elas são únicas. As análises filogenéticas dos genes RNAr 16S, rpoC1, rbcL, tufA concatenados corroboraram os resultados de filogenia do gene de RNAr 16S e as identificações morfológicas. A tentativa de obtenção de padrões moleculares para as espécies de Anabaena isoladas do Brasil foi feita utilizando a técnica de PCR-DGGE. Os fragmentos da região 359-781 do RNAr 16S apresentaram banda única para A. circinalis, enquanto que mais de uma banda foi verificado nas outras morfoespécies de Anabaena.

Palavras-chave: Análise concatenada, ACP, cultura, RNAr 16S, rpoC1, rbcL, tufA, PCR-DGGE

## ABSTRACT

# Morphological and molecular characterization of the cyanobacterial genus Anabaena isolated from Brazilian water bodies

The advent of molecular evolutionary studies based on 16S rRNA genes sequences of cyanobacteria, the taxonomy of Anabaena (Cyanobacteria) has been widely discussed and a revision of the genus is required. The problems range from the generic level, such as Anabaena -Aphanizomenon group, to levels of strains differentiation (morphospecies). Molecular studies of Anabaena strains isolated from Brazilian ecosystems are lacking. In order to explore the diversity, phylogeny and evolutionary diversification of Anabaena strains isolated from Brazilian environments, phenotypic and genotypic studies were performed. A total of 43 Anabaena isolates were obtained from water bodies of Sao Paulo State (Billings reservoir, Santo Grande reservoir, Piracicaba river and Engenharia pond – Esalq) and Ceara State (Povoado Nova Aurora pond and Camarao river). The isolated Anabaena species were identified as A. aphanizomenoides Forti, A. circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault, A. crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg, A. cf. fallax Lomárek et Komárková-Legnerová and A. planctonica Brunnthaler. The culture media used for cyanobacterial isolation were AA/4, ASM-1 and BGN, the latter also in the variants with NaNO3 50% (BG50) and without nitrate (BGS), with and without addition of B12 vitamin. The ASM-1 medium did not promote the growth of Anabaena. The A. circinalis and A. crassa species had not grown inBGN culture medium with NaNO<sub>3</sub> 17.65 mM, showing growth in BG50 medium. The addition of B12 vitamin favored the growth of A. circinalis. The morphological characters analyzed for 23 isolates were the length (L) and diameter (D) of vegetative cell (V), heterocyte (HT), akinete (AK), coil (CO), L/D ratio (R) for V, HT and AK, and D/L ratio for CO (RCO). The sheath diameter (SD) was also evaluated. The principal component analysis (PCA) confirmed that the coil is an important feature to separate the morphospecies A. circinalis, A.crassa and A. cf. fallax. RV and RHT were diacritical for differentiation of A. cf. fallax. The akinete length (LAK) was important to differentiate A. aphanizomenoides from A. planctonica. The sheath differentiated A. crassa from other morphospecies. Phylogenetic analyses of 16S rRNA gene placed A. circinalis and A. crassa, A. planctonica, A. aphanizomenoides and A. cf. fallax Brazilian isolates in separated clades in agreement with morphological characters. With the exception of A. planctonica, the 16S rRNA sequences of the Brazilian isolates did not cluster with relative strains originated from other countries, indicating that they are unique. The phylogenetic analysis of concatenated genes16S rRNA, rpoC1, rbcL, tufA corroborated results of 16S rRNA phylogeny and morphological identifications. The attempt to obtain molecular standards for the Anabaena species isolated from Brazil was made using the PCR-DGGE technique. The fragments of the 359-781 region of 16S rRNA showed only one DNA band for A. circinalis, while more than one band was observed in other Anabaena morphospecies.

Keywords: Concatenated analysis, PCA, Culture, 16S rRNA, rpoC1, rbcL, tufA, PCR-DGGE

# 1 INTRODUÇÃO

Anabaena Bory ex Bornet et Flahault é um gênero cosmopolita de cianobactérias filamentosas fixadoras de N2 atmosférico, encontrada em ambientes de água doce, água salobra (OLIVER; GANF, 2000; PAERL, 2000) e também hábitats terrestres (WHITTON; POTTS, 2000). Esse gênero está classificado dentro das cianobactérias filamentosas heterocitadas (subseção IV família I) (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN, 2001) e está inserido na ordem Nostocales no Sistema Botânico (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989). Aproximadamente 110 morfoespécies de Anabaena foram descritas (KOMÁREK; HAUER, 2009). Anabaena é uma importante fonte de entrada de nitrogênio nos ecossistemas, mas também uma preocupação, pois várias linhagens produzem diversas classes de substâncias, tais como, microcistinas, anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitoxinas (KAEBERNICK; NEILAN, 2001) e cilindrospermopsina (SPOOF et al., 2006). No Brasil, as morfoespécies A. circinalis, A. crassa, A. cf. smithii e A. planctonica foram observadas no Reservatório Salto Grande, Americana, SP (AGUJARO, 2007; DEBERDT, 2002, TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004). Segundo um levantamento em agosto de 2005 nesse reservatório, A. circinalis atingiu valores de 358 orgs mL<sup>-1</sup> e A. crassa 3455 orgs mL<sup>-1</sup> (AGUJARO, 2007). Recentemente, A. circinalis e A. spiroides foram detectadas em uma amostra tóxica contendo microcistinas coletadas no Reservatório de Monjolinho, São Carlos, SP (SOTERO-SANTOS et al., 2008). Em amostra tóxica contendo saxitoxina (STX), goniautoxina (GTX) e anatoxina-a(S), coletada no Reservatório Taiacupeba, São Paulo, SP, foi constatada a presença de Anabaena sp., Microcystis sp. e Cylindrospermopsis sp. (YUNES et al., 2003). Esses mesmos autores relatam que amostras provenientes dos Estados do Ceará, Paraná e Rio Grande do Sul, contendo anatoxina-a(S), apresentaram Anabaena spiroides variando de 30-7556 filamentos mL<sup>-1</sup>. Em amostra coletada na Represa São Simão (MG/GO), ocorreu dominância de Anabaena circinalis e Microcystis sp, sendo detectado a presença de microcistinas (JARDIM et al. 2001a). Em uma revisão de morfoespécies tóxicas encontradas no Brasil, A. circinalis, A. crassa, A. planctonica, A. spiroides e A. verrucosa foram relatadas como produtoras de microcistinas, anatoxina-a, anatoxina-a(S) e goniautoxina (SANT'ANNA et al., 2008). Apesar de sua importância como fixadora de nitrogênio, produtora de toxinas e, devido a sua ocorrência ubíqua e abundante nos ambientes, não existem estudos genéticos com linhagens de Anabaena provenientes de regiões brasileiras.

A taxonomia de Anabaena, a qual ainda é baseada principalmente nas características morfológicas, não é consensual com problemas em níveis genéricos e infragenéricos (GUGGER et al., 2002; ITEMAN et al., 2002; PAN et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005; RUDI et al., 1997, RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998; WILLAME et al., 2006). Infelizmente os caracteres morfológicos não refletem relações evolutivas e sequências do gene de RNAr 16S existentes, não suportam muitas das morfoespécies descritas. O problema surge com os caracteres instáveis analisados para definir morfoespécies, tais como espira, acineto, heterócitos e células vegetativas, os quais podem variar de acordo com as condições ambientais e longos cultivos (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007; ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008). É esperado que divisões adicionais e novos rearranjos surjam à medida que mais estudos moleculares e populacionais sejam realizados. Recentemente, uma tentativa para resolver o problema taxonômico do gênero Anabaena teve início com uma identificação morfológica detalhada de várias morfoespécies temperadas (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, provenientes de regiões 2007. 2008; ZAPOMĚLOVÁ et al., 2007), juntamente com caracterização fisiológica, ecológica e molecular (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008).

A maioria das análises filogenéticas de linhagens de *Anabaena* foi realizada usando um único gene, como, por exemplo, o do RNAr 16S (GILL, 2006; LYRA et al., 2001; PAN et al., 2008; RUDI et al., 1997; WILLAME et al., 2006;), *nifH* (BEN-PORATH; ZEHR, 1994; TAMAS; SVIRCEV; ANDERSSON, 2000), *nifD* (HENSON; WATSON; BARNUM, 2002; 2005), *hetR* (JANSON; GRANÉLI, 2002), *rpoC1* (FERGUSSON; SAINT, 2000). Poucos estudos foram realizados usando um ou mais genes (BELTRAN; NEILAN, 2000; GUGGER et al., 2002; HALINEN et al., 2008; ITEMAN et al., 2002; RAJANIEMI et al., 2005; RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998; SEO; YOKOTA, 2003) e somente um relata a análise combinada de múltiplos genes (FEWER et al., 2007). Ademais, em todos esses estudos os isolados de *Anabaena* analisados foram provenientes de região temperada. A análise filogenética, usando seqüencias de genes constitutivos concatenados, para a tipagem de linhagens, tem sido proposta como uma abordagem que garante variabilidade adequada, tal que uma linhagem pode ser distinguida das outras mais proximamente relacionadas, e ainda é capaz de rastrear a história global das linhagens com a maior precisão possível (FEWER et al., 2007; SÁNCHEZ-BARACALDO et al., 2005; TANABE; KASAI; WATANABE, 2007). Este estudo teve como objetivo investigar a variação morfológica e genética de linhagens de *Anabaena* isoladas de diferentes corpos d'água de regiões brasileiras, visando descrever de forma mais precisa possível as espécies desse gênero que colonizam os ambientes brasileiros e também contribuir com novas informações buscando aperfeiçoar a taxonomia das espécies de *Anabaena*. Dessa forma, linhagens de *Anabaena* foram isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo e Ceará e análises da morfometria dos isolados foram realizadas de acordo com critérios taxonômicos disponíveis. A caracterização filogenética das linhagens de *Anabaena* foram realizadas com base nas sequências concatenadas dos genes de RNAr 16S, *rpoC1, rbcL* e *tufA* e também somente usando o gene de RNAr 16S. A tentativa de desenvolver um marcador molecular para os isolados brasileiros de *Anabaena* foi conduzida usando a metodologia da PCR-DGGE.

### **2 DESENVOLVIMENTO**

## 2.1 Florações de cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias são organismos fotossintetizantes oxigênicos com longa história evolutiva na Terra. De acordo com evidências fósseis elas surgiram há 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 2000) e contribuíram de forma decisiva na oxigenação atmosférica por meio da fotossíntese (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). O filo Cyanobacteria também possui representantes diazotróficos que desempenham um papel importante como fonte de entrada de nitrogênio nos ecossistemas (FIORE; HONDA, 2008). Esses organismos apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica e metabólica (CODD, 1995) e ocupam diversos ambientes como rochas calcáreas, cavernas (*Gloeocapsa, Gloeothece*), fontes termais (*Synechococcus lividus, Mastigocladus laminosus*), pântanos salgados (*Rivularia, Calothrix*) e lagos alcalinos hipersalinos (*Arthrospira platensis*). Além disso, as cianobactérias colonizam ambientes aquáticos como oceanos (*Trichodesmium*) e de água doce (*Aphanizomenon, Microcystis, Planktothrix*), e podem formar associações simbióticas como *Nostoc-Gunnera* e *Anabaena-Azolla* (BERGMAN; RAI; RASMUSSEN, 2007).

Apesar de sua importância ecológica como fixadoras de carbono e nitrogênio (GRAHAM; WILCOX, 1999), as cianobactérias têm causado graves problemas por formarem florações, que podem ser definidas como um grande aumento da biomassa, com domínio de uma ou duas espécies, e valores de clorofila-*a* de 10 mg m<sup>-3</sup> ou cerca de 2,0 x 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup> (OLIVER; GANF, 2000). As florações resultam do enriquecimento artificial dos corpos d'água (eutrofização), principalmente por nitrogênio e fósforo (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005), e são facilitadas por vantagens adaptativas das cianobactérias planctônicas, como a capacidade de crescer em ambientes com alta turbidez, controle da flutuabilidade na coluna d'água (aerótopos), alta capacidade para armazenamento de fósforo (CHORUS; BARTRAM, 1999) e assimilação do nitrogênio atmosférico (SEVRIN-REYSSAC; PLETIKOSIC, 1990). Com as florações de cianobactérias, metabólitos como geosmina e metilisoborneol (MIB) podem ocasionar odor e sabor desagradáveis na água (CYBIS et al., 2006; ZAGATTO et al., 1997). Porém, o maior problema resultante dessas florações é a produção de toxinas.

Florações tóxicas de cianobactérias já foram relatadas em diversos países como: Austrália (BAKER; HUMPAGE, 1994), Canadá (PARK et al., 2001), Chile (NEUMANN et al., 2000), China (UENO et al., 1996), Estados Unidos (YOO et al., 1995), Itália (GIOVANNARDI et al., 1999), Japão (PARK; WATANABE, 1996) e Portugal (VASCONCELOS; ARAÚJO, 1994; VASCONCELOS et al., 1996), dentre outros. No Brasil, cianobactérias tóxicas foram relatadas para diversos Estados (HONDA et al., 2006). Em São Paulo, os gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* foram comumente encontrados nas florações que apresentavam cianotoxinas do tipo anatoxina-a(S), saxitoxina, goniautoxina e microcistina (MCYST) (Tabela 1). Além disso, isolados brasileiros também são conhecidos por produzirem essas toxinas como, por exemplo, *Microcystis aeruginosa* NPJB-1 que sintetiza a MCYST-LR/LF (AZEVEDO et al., 1994) e *Cylindrospermopsis raciborskii* T1, T2 e T3 produtora das neurotoxinas saxitoxina e goniautoxina (LAGOS et al., 1999).

As cianotoxinas (Tabela 2) podem ser classificadas principalmente de acordo com seu modo de ação em: neurotoxinas; hepatotoxinas e dermatotoxinas (SIVONEN; JONES, 1999), ou ainda, de acordo com sua estrutura química como: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (CHORUS; BARTRAM, 1999). As neurotoxinas (alcalóides) inibem as transmissões neuromusculares e são principalmente representadas pelas anatoxinas, saxitoxinas, neo-saxitoxinas, C-toxinas e goniautoxinas (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Já as hepatotoxinas são peptídeos cíclicos conhecidos por inibirem as proteínas fosfatases do tipo 1 e 2A, causar desnaturação no fígado (DOW; SWOBODA, 2000) e promover o aparecimento de tumores (CHORUS; BARTRAM, 1999; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). As nodularinas e microcistinas, os dois grupos mais comum de hepatotoxinas (CHRISTOFFERSEN, 1996), podem estar relacionados ao aumento na incidência de câncer primário de fígado na China (UENO et al., 1996). Além dessas toxinas, a cilindrospermopsina é um alcalóide citotóxico que atua inibindo a síntese protéica, causando danos desde o fígado até rins e tecido linfóide (CHORUS; BARTRAM, 1999). Os lipopolissacarídeos (LPS), produtos condensados de açúcar (hexose) e lipídio (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> hidroxi ácido graxo), foram caracterizados inicialmente em "Anacystis nidulans" (WEISE et al., 1970) e descritos, posteriormente, para várias outras cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1999).

As microcistinas foram descobertas após observações realizadas durante um bioensaio com células de cianobactérias, onde sérios danos no fígado de camundongos foram associados à

Tabela 1 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas no Estado de São Paulo (modificado de HONDA et al., 2006)

(continua)

Amostra examinada	Número de amostras (% tóxica) <sup>(1)</sup>	Método de análise	Toxina encontrada	Valor detectado	Observação	Referência
Lago Porto Feliz, Lago Chácara Bela Vista, Lago Indaiatuba	5 (60%)	Bioensaio <sup>(2),</sup> (3)	-	-	Morte de peixes e patos esteve associada às amostras analisadas/Lyngbya sp., Microcystis sp., Oscillatoria princeps e Raphidiopsis sp. estiveram presentes nas amostras tóxicas	Beyruth et al. (1992)
Linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPJB-1 isolada do Lago das Garças	-	HPLC, FABMS	MCYST- LR/LF	DL <sub>100</sub> =31 mg kg <sup>-1</sup>	Primeiro relato de microcistinas para o Brasil	Azevedo et al. (1994)
Diversas linhagens	16 (75%)	Bioensaio	-	DL <sub>mín.</sub> =9,09-577,00 mg kg <sup>-1</sup>	Linhagens tóxicas de Microcystis aeruginosa, Oscillatoria sp., O. quadripunctulata, Synechococcus elongatus, Synechocystis sp. e S. aquatilis	Costa e Azevedo (1994)

# Tabela 1 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas no Estado de São Paulo (modificado de HONDA et al., 2006)

/ ··	~ \
(contin	1100001
UUUIIIIII	uacaor
(••••••••	

Amostra examinada	Número de amostras (% tóxica) <sup>(1)</sup>	Método de análise	Toxina encontrada	Valor detectado	Observação	Referência
Linhagens <i>C. raciborskii</i> T1,T2 e T3 isoladas do Reservatório Billings e Amparo	-	Bioensaio, HPLC- ESIMS	neoSTX, STX, GTX2, GTX3	3,3 UC mg <sup>-1</sup> (cepa T1), 1,5 UC mg <sup>-1</sup> (cepa T2), 0,35 nmol neoSTX/STX mg <sup>-1</sup> (cepa T1), 2,45 nmol STX/GTX2/GTX3 mg <sup>-1</sup> (cepa T2)	Primeira citação de produção de PSTs por <i>Cylindrospermopsis</i> raciborskii	Lagos et al. (1999)
Linhagens isoladas do Lago das Garças, Reservatório Sistema Cantareira e Barra Bonita	21 (57,1%)	ELISA	MCYST	-	Linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i> sp., <i>M. aeruginosa</i> e <i>M.</i> cf. <i>panniformis</i>	Bittencourt- Oliveira, Oliveira, Yunes (2001)
Reservatório Billings	-	HPLC, inibição da AChE	STX, neoSTX, GTX2, GTX3, anatoxina-a(S)	0,01 μg STX L <sup>-1</sup> ; 0,03 μg neoSTX L <sup>-1</sup> ; 0,02 μg GTX2 L <sup>-1</sup> ; 0,03 μg GTX3 L <sup>-1</sup> ; 10,28% de inibição da AChE <sup>(4)</sup>	Anabaena sp. (13.000 orgs mL <sup>-1</sup> ), Microcystis sp. (1.005 orgs mL <sup>-1</sup> ) e Cylindrospermopsis sp. (5.400 orgs mL <sup>-1</sup> )	Yunes et al. (2003)
Reservatório Monjolinho	-	Bioensaio <sup>(5)</sup>	MCYST	$DL_{50}$ =94-406 mg kg <sup>-1</sup> (cladócero), 297-445 mg kg <sup>-1</sup> (camundongo)	Anabaena circinalis e A. spiroides dominaram floração	Sotero-Santos et al. (2008)

Tabela 1 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas no Estado de São Paulo (modificado de HONDA et al., 2006)

(conclusão)

Amostra examinada	Número de amostras (% tóxica) <sup>(1)</sup>	Método de análise	Toxina encontrada	Valor detectado	Observação	Referência
Linhagem <i>Fischerella</i> sp.	-	ELISA,	MCYST-LR	33,6 µg g <sup>-1</sup>	Primeira confirmação da produção de	Fiore et al.
d'água em Piracicaba		Q-TOFMS			gene mcyD	(2009)
C					0	

Nota: AChE: acetilcolinesterase; DL: dose letal; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; eq: equivalente; ESIMS: electron spray ionization mass spectrometry; FABMS: fast atom bombardment mass spectrometry; GTX: goniautoxina; HPLC: high performance liquid chromatography; MCYST: microcistina; Q-TOFMS: quadrupole time-of-flight mass spectrometry; PSTs: paralytic shellfish toxins; STX: saxitoxina; UC: unidade de camundongo.

<sup>(1)</sup> Apenas para levantamentos quantitativos

<sup>(2)</sup> Realizado com camundongo.

<sup>(3)</sup> Realizado também com *Daphnia similis*.
 <sup>(4)</sup> Inibição total (100%) da AChE foi encontrada na amostra Rio Grande – RS de 5/11/1995 com 500.000 orgs mL<sup>-1</sup> de *Anabaena spiroides*.

<sup>(5)</sup> Realizado também com *Ceriodaphnia dubia* e *C. silvestrii*.

*M. aeruginosa* (HUGHES; GORHAM; ZEHNDER, 1958). Após confirmação da origem peptídica dessa hepatotoxina (BISHOP; ANET; GORHAM, 1959), ela foi nomeada de microcistina (CARMICHAEL et al., 1988; KONST et al., 1965) e caracterizada estruturalmente (BOTES et al., 1984, 1985). As microcistinas, heptapeptídeos cíclicos, são compostas por três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos variáveis e dois aminoácidos não usuais denominados N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,-trimetildeca-4,6-ácido dienóico, este último conhecido como Adda (LUUKKAINEN et al., 1994; NAKANO et al., 1991). Essas moléculas diferem primariamente nos dois L-aminoácidos variáveis, e secundariamente, na presença ou ausência de grupos metil no  $\beta$ -Me-Asp e/ou Mdha: microcistina-LR (leucina e arginina); -RR (arginina e arginina); -YR (tirosina e arginina) (CARMICHAEL et al., 1988; CARMICHAEL, 1992). Atualmente já foram descritas 65 variantes de microcistinas (PARK et al., 2001), sendo -LR a mais comum (SIVONEN; JONES, 1999). Ainda dentro do grupo dos cianopeptídeos, outros compostos bioativos além das microcistinas têm sido descritos para as cianobactérias (Tabela 3).

# 2.2 Importância do gênero Anabaena

Dentre os gêneros de cianobactérias, *Anabaena* representa aquele cujas linhagens tóxicas produzem a maior diversidade de classe de toxinas como anatoxina-a, anatoxina-a(s) (SIVONEN; JONES, 1999), cilindrospermopsina (SPOOF et al., 2006), microcistinas (FEWER et al., 2008; HALINEN et al., 2007) e saxitoxinas (Tabela 2) (HUMPAGE et al., 1994; KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Recentemente, *Anabaena lapponica* foi descrita por produzir o alcalóide cilindrospermopsina (SPOOF et al., 2006). Cianopeptídeos bioativos como cianopeptolinas também têm sido relatados para *Anabaena* (Tabela 3). Apesar dessa diversidade de tipos químicos, apenas a via biossintética da toxina microcistina foi descrita para *Anabaena* 90 (ROUHIAINEN et al., 2004), sendo que seu operon difere na organização dos genes em comparação com os de outros três gêneros: *Microcystis, Planktothrix e Anabaena* (FIORE et al., 2005). Vários estudos dos genes envolvidos na produção de microcistina têm sido feitos em *Microcystis, Planktothrix e Anabaena*. Recentemente, verificou-se que há congruência dos genes constitutivos (RNAr 16S, *rpoC1, rpoB, tufA e rbcL*) com os relacionados à produção de microcistina em linhagens de *Anabaena* (FEWER et al., 2007). Além disso, estudos do operon da microcistina em Anabaena mostraram que linhagens desse gênero apresentam deleção no

Toxina	ToxinaDL50Efeito		Origem	
			Populações naturais (gênero dominante)	Linhagens
Anatoxina-a	250	Liga-se irreversivelmente aos receptores de acetilcolina	Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon, Cylindrospermum, Planktothrix	Anabaena, Oscillatoria, Planktothrix
Homoanatoxina-a	250		Planktothrix	Planktothrix
Anatoxina-a(S)	40	Inibe atividade da Acetilcolinesterase	Anabaena	Anabaena
Saxitoxinas	10 - 30	Liga e bloqueia os canais de sódio nas células neurais	Aphanizomenon, Planktothrix, Anabaena, Cylindrospermopsis, Lyngbya	Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Planktothrix
Microcistinas	25 - 1000	Inibe proteínas fosfatases (PP1 e PP2A)	Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Anabaenopsis, Hapalosiphon	Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Hapalosiphon
Nodularinas	30 - 50		Nodularia	Nodularia
Cilindrospermopsina	200 - 2100	Inibidor da biossíntese protéica, dano citogenético (DNA)	Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Raphidiopsis, Umezakia	Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Raphidiopsis, Anabaena
Lipopolissacarídeo	-	Potente irritante, efeito em qualquer tecido exposto	Cianobactéria em geral	-

Tabela 2 – Toxinas produzidas por cianobactérias com respectivas características (modificado de CODD; MORRISON; METCALF, 2005; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005)

<sup>(1)</sup> Dose Letal (DL) expressa em  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> camundongo (i.p. – intraperitonial).

domínio de *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcyA* e são capazes de produzir diferentes isoformas de microcistinas (FEWER et al., 2008). Linhagens de *A. circinalis* foram identificadas como produtoras de saxitoxina, uma proteína transportadora dependente de sódio (POMATI, BURNS, NEILAN, 2004). O gene encontrado nessas linhagens, similar ao gene *mrpF* de *Bacillus*, é responsável pelo fluxo de Na<sup>+</sup> na célula e controle homeostático. Assim, dada a sua importância como gênero tóxico, *Anabaena* tem sido estudada quanto aos aspectos fisiológicos e moleculares da síntese de toxinas.

No Brasil, florações com Anabaena já foram citadas para alguns Estados brasileiros, tais como Goiás, Minas Gerais (JARDIM et al., 2001a,b), Ceará, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (BARROS; MONSERRAT; YUNES, 2004; YUNES et al., 2003). A. circinalis e A. spiroides foram relatadas no Paraná e Rio Grande do Sul, sendo que A. spiroides atingiu valores de 500.000 orgs mL<sup>-1</sup> em amostra do Rio Grande, RS (BARROS; MONSERRAT; YUNES, 2004). Já na Represa São Simão, MG/GO, ocorreu dominância de A. circinalis e Microcystis sp. com presença de microcistinas (JARDIM et al., 2001a). Nos Estados do Ceará, Paraná e Rio Grande do Sul foram observadas amostras de água com 30-7556 orgs mL<sup>-1</sup> de Anabaena spiroides produtora de anatoxina-a(S) (YUNES et al., 2003). Em São Paulo, os mesmos autores verificaram a presença de Anabaena sp., Microcystis sp. e Cylindrospermopsis sp. em amostra do Reservatório Taiaçupeba que continha as neurotoxinas tipo saxitoxina (STX), goniautoxina (GTX) e anatoxina-a(S). Além disso, A. circinalis, A. crassa, A. cf. smithii e A. planctonica foram observadas no Reservatório Salto Grande (Americana, São Paulo) (AGUJARO, 2007; DEBERDT, 2002; TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004). Segundo levantamento mais recente realizado nesse reservatório (Praia dos Namorados), A. circinalis atingiu valores de 358 orgs mL<sup>-</sup> <sup>1</sup> e A. crassa 3455 orgs mL-1 (AGUJARO, 2007). A mesma autora sugere que a mortandade de peixes ocorrida em agosto de 2005 no Iate Clube, localizado nas margens do Reservatório Salto Grande, possa estar relacionada com a produção de neurotoxinas produzidas por A. crassa, espécie dominante e que atingiu densidade de 2889 orgs mL<sup>-1</sup>. No entanto, a falta de oxigênio na água não pode ser descartada como possível causa das mortes. Recentemente, as morfoespécies A. circinalis, A. crassa, A. planctonica, A. spiroides e A. verrucosa, encontradas no Brasil, foram relatadas por produzirem microcistina, anatoxina-a, anatoxina-a(S) e goniautoxina (SANT'ANNA et al., 2008). Uma floração no Reservatório Monjolinho (São Carlos, SP) composta por A. circinalis e A. spiroides mostrou ser tóxica para cladóceros e camundongos (SOTERO-SANTOS et al., 2008). A presença de microcistina foi verificada por ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") nas amostras da natureza (28-45  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e células liofilizadas (138-223  $\mu$ g g<sup>-1</sup>), porém neurotoxinas não foram detectadas por HPLC. Assim, espécies de *Anabaena* têm sido relacionadas com as florações tóxicas no Brasil em amostras da natureza (Tabela 1), entretanto, a confirmação de isolados brasileiros deste gênero como produtores de cianotoxinas ainda não foi obtida.

Classe	Sinônimos	Gênero produtor
Aeruginosina	Microcina, espumigina	Microcystis, Planktothrix, Nodularia
Microginina	Cianostatina, oscilaginina, nostoginina	Microcystis, Planktothrix, Nostoc
Cianopeptolina	Aeruginopeptina, anabaenopeptilida, hofmannolina, microcistilida, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscilapeptilida, somamida, tasipeptina	Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema, Symploca
Microviridina	-	Microcystis, Planktothrix, Nostoc
Ciclamida	Dendroamida, microciclamida, nostociclamida, raociclamida, ulongamida, westielamida	Lyngbya, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Stigonema, Westiellopsis

Tabela 3 - Principais classes de peptídeos de cianobactérias (modificado de WELKER; VON DÖHREN, 2006)

## 2.3 Taxonomia polifásica e caracteres fenotípicos

A identificação de cianobactérias tem sido feita tradicionalmente de acordo com os caracteres morfológicos seguindo levantamentos botânicos de diversidade (BOURRELLY, 1970; DESIKACHARY, 1959; FRÉMY, 1930; GEITLER, 1932) e os sistemas de classificação botânico (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985; 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; 1999; 2005) e bacteriológico (BOONE; CASTENHOLZ; 2001; RIPPKA et al., 1979). Baseado no estudo de 178 linhagens de cianobactérias, foi proposto um sistema de classificação composto por 22 gêneros dentro de 5 seções (RIPPKA et al., 1979). Como caracteres morfológicos foram utilizados a organização celular (unicelular ou tricoma), o tipo de reprodução (divisão celular) e a capacidade de formar células diferenciadas (heterócito e acineto). Posteriormente, esse sistema foi adotado pelo Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Tabela 4). De modo similar, o sistema de classificação botânica baseou-se também nesses caracteres morfológicos para separação das cianobactérias em 4 ordens: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985). Com o advento da biologia molecular e sequenciamento do gene de RNAr 16S, a sistemática de cianobactérias começa a adotar a filogenia como base da taxonomia, além de incorporar também caracteres bioquímicos/fisiológicos e ultraestruturais (organização dos tilacóides). Assim, sequências de RNAr 16S estão sendo usadas como base para definição dos gêneros de cianobactérias e tentativas de mudança do sistema de classificação em níveis supragenéricos também estão KAŠTOVSKÝ. KOMÁREK. surgindo (HOFFMANN; KOMÁREK; 2005: 2005a: HOFFMANN, 2007). De acordo com esse novo sistema de classificação, a organização dos tilacóides (radial ou paralelo à superfície celular), o tipo de reprodução e diferentes morfologias do talo, aliados às sequências do RNAr 16S, formam a base para essa diferenciação (Tabela 4). Quanto aos gêneros, muitos mostraram ser monofiléticos como Microcystis, Planktothrix, Arthrospira, Tychonema, Trichodesmium, Spirulina e Cylindrospermum, outros porém, i.e. Anabaena e Aphanizomenon foram definidos com gênero-forma e necessitam de uma revisão (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005).

Tabela 4 – Classificação das cianobactérias de acordo com os sistemas bacteriológico e botânico (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)

(continua)

Classificação pelo Manual de	Classificação por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis e	Classificação por Hoffmann, Komárek e Kaštovský
Bacteriologia Sistemática de	Komárek ,1985, 1990; Komárek e Anagnostidis, 1989; 1999;	(Hoffmann, Komárek e Kastovský, 2005) <sup>(1, 2)</sup>
Bergey (Boone e Castenholz, 2001)	2005)	
Subseção I (Chroococcales):	Chroococcales: unicelular ou colonial	Gloeobacterales <sup>(3)</sup> : cocóide, sem tilacóides
unicelular ou colonial, divisão por		Família Gloeobacteraceae
fissão binária em 1 a 3 planos ou	Família Gloeobacteraceae	Gloeobacter
por <i>budding</i>	Gloeobacter	
	Família Synechococcaceae	Synechococcales <sup>(4)</sup> : tilacóides paralelos à superfície da célula,
Gênero-Forma Chamaesiphon,	Subfamília Aphanothecoideae	unicelular ou colonial
Choococcus, Cyanobacterium,	Aphanothece, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanocatena,	Famílias Synechococcaceae
Cyanobium, Cyanothece,	Cyanodictyon, Cyanothece, Epigloeosphaera, Gloeothece,	Aphanotece-células pequenas, Bacularia, Cyanocatena,
Dactylococcopsis, Gloeobacter,	Hormothece, Lemmermanniella, Radiocystis	Cyanobium, Cyanodictyon, Cyanothamnos,
Gloeocapsa, Gloeothece,	Subfamília Synechococcoideae	Epigloeosphaera, Lemmermanniella, Pannus,
Microcystis, Prochlorococcus,	Bacularia, Cyanothamnos, Dzensia, Johannesbaptistia,	Prochlorococcus, Rhabdoderma, Rhabdogloea,
Prochloron, Synechococcus,	Myxobaktron, Rhabdoderma, Rhabdogloea,	Synechococcus, Thermosynechococcus, Wolskyella,
Synechocystis	Synechococcus, Wolskyella	Família Acaryochloridaceae
	Família Merismopediaceae	Acaryochloris
	Subfamília Merismopedioideae	Família Merismopediaceae
	Aphanocapsa, Coccopedia, Cyanotetras, Merismopedia,	Aphanocapsa-células pequenas, Chroococcus subg.
	Microcrocis, Pannus, Synechocystis	Limnococcus, Coccopedia, Coelomoron, Coelosphaerium,
	Subfamília Gomphosphaerioideae	Coelosphaeropsis, Cyanotetras, Eucapsis, Merismopedia-
	Coelomoron, Coelosphaerium, Coelosphaeriopsis,	células pequenas, Siphonosphaera, Synechocystis-células
	Gomphosphaeria, Snowella, Siphonosphaera,	pequenas
	Woronichinia	Família Chamaesiphonaceae
	Família Microcystaceae	Chamaesiphon subg. Euchamaesiphon, Clastidium,
	Chondrocystis, Eucapsis, Gloeocapsa, Microcystis	Geitleribactron
	Família Chroococcaceae	
Subseção II (Pleurocapsales):	Asterocapsa, Chroococcus, Cyanokybus, Cyanosarcina,	Chroococcales <sup>(5)</sup> : arranjo radial dos tilacóides, unicelular ou
unicelular ou colonial, divisão por	Cyanostylon, Gloeocapsopsis, Pseudocapsa	colonial
fissão múltipla ou em conjunto com	Família Entophysalidaceae	Família Cyanobacteriaceae
fissão binária	Subfamília Entophysalidoideae	Aphanothece-tipo stagnina, Cyanobacterium, Cyanothece,
	Chlorogloea, Cyanoarbor, Entophysalis, Lithocapsa,	Gloeothece, Hormothece, Microcrocis, Myxobaktron-sob
SubgrupoI	Paracapsa	nome inválido Dactylococcopsis
Gênero-Forma Cyanocystis,	Subfamília Siphononematoideae	Família Microcystaceae
Dermocarpella, Stanieria,	Siphononema	Aphanocapsa-células grandes, Chondrocystis, Gloeocapsa,
Xenococcus	Família Hydrococcaceae	Microcystis, Radiocystis, Sphaerocavum, Synechocystis-
	Cyanodermatium, Hydrococcus, Myxohyella, Tryponema	células grandes

Tabela 4 - Classificação das cianobactérias de acordo com os sistemas bacteriológico e botânico (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)

(continuação)

Classificação pelo Manual de	Classificação por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis	Classificação por Hoffmann, Komárek e Kaštovský
Bacteriologia Sistemática de	e Komárek ,1985, 1990; Komárek e Anagnostidis, 1989;	(Hoffmann, Komárek e Kastovský, 2005) <sup>(1, 2)</sup>
Bergey (Boone e Castenholz, 2001)	1999; 2005)	
Subgrupo II	Família Chamaesiphonaceae	Família Gomphosphaeriaceae
Gênero-Forma	Chamaesiphon, Cyanophanon, Geitleribactron,	Gomphosphaeria, Snowella, Woronichinia
Chroococcidiopsis	Stichosiphon	Família Prochloraceae
Myxosarcina, grupo-	Família Dermocarpellaceae	Prochloron
Pleurocapsa (Pleurocapsa,	Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria	Família Chroococcaceae
Hyella, Solentia)	Família Xenococcaceae	Asterocapsa, Chroococcus, Cyanosarcina, Gloeocapsopsis,
	Chroococcidium, Chroococcidiopsis, Chroococcopsis,	Merismopedia-células grandes, Pseudocapsa
	Myxosarcina, Xenococcus	Família Entophysalidaceae
	Família Hyellaceae	Chlorogloea, Cyanoarbor, Cyanodermatium, Cyanostylon,
	Subfamília Podocapsoideae	Dzensia, Entophysalis, Johannesbaptistis, Tryponema
	Cyanosaccus, Ercegovicia, Podocapsa	Família Stichosiphonaceae
	Subfamília Hyelloideae	Chamaesiphon subg. Godlewskia, Stichosiphon
	Cyanoderma, Hyella, Pleurocapsa, Solentia	Família Dermocarpellaceae
		Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria
		Família Xenococcaceae
		Chroococcidiopsis, Chroococcopsis, Xenococcus
		Família Hydrococcaceae
		Chroococcidium, Cyanoderma, Hydrococcus, Hyella,
		Pleurocapsa, Podocapsa, Solentia
		Família <b>Spirulinaceae</b>
		Glaucospira, Halospirulina, Spirulina
Subseção III (Oscillatoriales):	Oscillatoriales: filamentoso, não heterocitado	<b>Oscillatoriales</b> <sup>(5)</sup> : arranjo radial dos tilacóides, filamentos largos
filamentoso, não heterocitado	Família Pseudanabaenaceae	Família Borziaceae
Gênero-Forma Arthrospira,	Subfamília Pseudanabaenoideae	Borzia, Komvophoron, Yonedaella
Borzia, Crinalium,	Arthronema, Geitlerinema, Jaaginema, Limnothrix,	Família Phormidiaceae
Geitlerinema, Leptolyngbya,	Pseudanabaena	Arthrospira, Dasygloea, Haliarachne, Hydrocoleum,
Limnothrix, Lyngbya,	Subfamília Spirulinoideae	Katagnymene, Leibleinia, Lyngbyopsis, Microcoleus,
Microcoleus, Oscillatoria,	Glaucospira, Spirulina	Phormidium, Planktothrix, Planktothricoides,
Planktothrix, Prochlorothrix,	Subfamília Leptolyngbyoideae	Porphyrosiphon, Pseudophormidium, Sirocoleum, Symploca,
Pseudanabaena, Spirulina,	Leibleinia, Leptolyngbya, Planktolyngbya	Symplocastrum, Trichodesmium, Tychonema
Starria, Symploca,	Subfamília Heteroleibleinioideae	
Trichodesmium, Tychonema	Heteroleibleinia, Tapinothrix	

Tabela 4 - Classificação das cianobactérias de acordo com os sistemas bacteriológico e botânico (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)

	<	~ \
- 1	contini	19090)
١.	COntinu	JacaOJ

Classificação pelo Manual de	Classificação por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis e	Classificação por Hoffmann, Komárek e Kaštovský
Bacteriologia Sistemática de Bergey	Komárek ,1985, 1990; Komárek e Anagnostidis, 1989; 1999;	(Hoffmann, Komárek e Kastovský, 2005) <sup>(1, 2)</sup>
(Boone e Castenholz, 2001)	2005)	
	<ul> <li>Família Schizotrichaceae <i>Trichocoleus, Schizothrix</i></li> <li>Família Borziaceae <i>Borzia, Komvophoron, Sinaiella</i></li> <li>Família Phormidiaceae</li> <li>Subfamília Ammatoideoideae <i>Ammatoidea, Phormidiochaete, Pseudoscytonema</i></li> <li>Subfamília Phormidioideae <i>Arthrospira, Phormidium, Planktothrix, Planktothricoides,</i> <i>Pseudophormidium, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i></li> <li>Subfamília Microcoleoideae <i>Dasygloea, Hydroccoleum, Lyngbyopsis, Microcoleus</i></li> <li>Família Gomontiellaceae</li> <li>Subfamília Hormoscilloideae <i>Hormoscilla, Katagnymene</i></li> <li>Subfamília Starrioideae</li> <li><i>Starria</i></li> <li>Família Oscillatorioideae</li> <li><i>Subfamília Ioscillatorioideae</i></li> <li><i>Subfamília Hormoeotrichoideae</i></li> <li><i>Blennothrix, Lyngbya, Oscillatoria, Plectonema</i></li> <li>Subfamília Homoeotrichoideae</li> <li><i>Homoeothrix</i></li> </ul>	<ul> <li>Família Ammatoideaceae <ul> <li>Ammatoidea, Pseudoscytonema</li> </ul> </li> <li>Família Oscillatoriaceae <ul> <li>Blennothrix, Hormoscilla, Lyngbya, Oscillatoria, Plectonema, Polychlamydum</li> </ul> </li> <li>Família Gomontiellaceae <ul> <li>Crinalium, Gomontiella, Starria</li> </ul> </li> <li>Pseudoanabaenales <sup>(4)</sup>: tilacóides paralelos à superfície da célula, filamentos finos</li> <li>Família Pseudanabaenaceae <ul> <li>Arthronema, Geitlerinema, Heteroleibleinia, Jaaginema, Leibleinia-tipo fino, Leptolyngbya, Limnothrix, Planktolyngbya, Pseudadanabaena, Prochlorothrix, Romeria, Tapinothrix</li> <li>Família Schizotrichaceae <ul> <li>Inactis, Schizothrix, Trichocoleus</li> </ul> </li> </ul></li></ul>
Subseção IV (Nostocales): filamentoso, heterocitado, não ramificado SubgrupoI Gênero-Forma Anabaena,, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema	Nostocales: filamentoso, heterocitado, acinetos, ramificação falsa Família Scytonemataceae <i>Kyrtuthrix, Scytonema, Scytonematopsis</i> Família Microchaetaceae Subfamília Tolypotrichoide <i>Coleodesmium, Petalonema, Tolypothrix</i> Subfamília Microchaetoideae <i>Camptylonemopsis, Fortiea, Microchaete</i> Família Rivulariaceae <i>Calothrix, Dichothrix, Gloeotrichia, Isacystis, Rivularia</i>	Nostocales <sup>(6)</sup> : filamentoso, heterocitado Família Scytonemataceae <i>Kyrtuthrix, Scytonema, Scytonematopsis</i> Família <b>Symphyonemataceae</b> <i>Adrianema, Brachytrichia, Iyengariella,</i> <i>Mastigocladopsis, Symphyonemopsis, Symphyonema,</i> <i>Umezakia</i> Família Borzinemataceae <i>Borzinema, Schmidleinema, Seguenzaea</i> Família Rivulariaceae <i>Calothrix, Dichothrix, Gloeotrichia, Rivularia</i>

Tabela 4 - Classificaçã o das cianobactérias de acordo com os sistemas bacteriológico e botânico (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)  $\frac{3}{2}$ 

1	1~\
LCONC	1116301
(COIIC)	iusao)

Classificação pelo Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Boone e Castenholz, 2001)	Classificação por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis e Komárek ,1985, 1990; Komárek e Anagnostidis, 1989; 1999; 2005)	<b>Classificação por Hoffmann, Komárek e</b> <b>Kaštovský</b> (Hoffmann, Komárek e Kastovský, 2005) <sup>(1, 2)</sup>
Subgrupo II	Família Nostocaceae	Família Microchaetaceae
Gênero-Forma Calothrix,	Subfamília Anabaenoideae	Camptylonemopsis, Coleodesmiopsis,
Gloeotrichia, Microchaete,	Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis,	Coleodesmium, Fortiea, Hassallia,
Rivularia, Tolypothrix	Cylindrospermum, Raphidiopsis,	Microchaete, Petalonema, Tolypothrix
	Subfamília Nostocoideae	Família Nostocaceae
Subseção V (Stigonematales):	Aulosira, Isocystis, Nodularia, Nostoc, Trichormus	Anabaena-
filamentoso, heterocitado, ramificado		planctônica=Dolichospermum,
	Stigonematales: filamentoso. heterocitado, acinetos, ramificação verdadeira	Anabaena-bentônico, Anabaenopsis,
Gênero-Forma Chlorogloeopsis,	Família Chlorogloeopsaceae	Cyanospira, Aphanizomenon,
Doliocatella, Fischerella, Geitleria,	Chlorogloeopsis, Heterocyanococcus	Cylindrospermopsis,
Iyengariella, Loriella,	Família Capsosiraceae	Cylindrospermum, Hydrocoryne,
Mastigocladopsis, Mastogocoleus,	Capsosira, Hyphomorpha, Stauromatonema	Isocystis, Nodularia, Nostoc,
Nostochopsis, Stigonema, Westiella	Família Stigonemataceae	Raphidiopsis, Richelia, Trichormus,
	Homoeoptyche, Pulvinularia, Stigonema	Wollea
	Família Fischerellaceae	Família Chlorogloeopsidaceae
	Doliocatella, Fischerella, Fischerellopsis, Parthasaranthiella, Westiellopsis	Chlorogloeopsis
	Família Borzinemataceae	Família Hapalosiphonaceae
	Borzinema, Handeliella, Schmidleinema	Fischerella, Hapalosiphon,
	Família Loriellaceae	Mastigocladus, Mastigocoleopsis,
	Albrightia, Brachytrichiopsis, Colteronema, Geitleria, Loriella,	Mastigogoleus, Nostochopsis,
	Mastigocoleopsis, Matteia	Westiella, Westiellopsis
	Família Nostochopsaceae	Família Loriellaceae
	Mastigocladopsis, Mastigocoleus, Nostochopsis	Colteronema, Geitleria, Loriella
	Família Mastigocladaceae	Família Stigonemataceae
	Subfamília Mastigocladoideae	Capsosira, Cyanobotrys, Doliocatella,
	Hapalosiphon, Mastigocladus, Umezakia, Westiella	Nematoplaca, Pulvinularia,
	Subfamília Brachytrichioideae	Stauromatonema, Stigonema
	Brachytrichia, Iyengariella, Symphyonemopsis	
<sup>(1)</sup> As ordens pertencem a 4 subclasses que não estão na mesma sequência da publicação.		
<sup>(2)</sup> Em negrito estão os táxons não válidos. As ordens não validadas estão sublinhadas.		
<sup>(3)</sup> Ordem Gloeobacterales está dentro da subclasse Gloeobacterophycidae.		
<sup>(4)</sup> Ordens Synechococcales e Pseudanabaenales formam a subclasse Synechococcophycidae.		
<sup>(5)</sup> Ordens Chroococcales e Oscillatoriales formam a subclasse Oscillatoriophycidae.		

<sup>(6)</sup> Ordem Nostocales está dentro da subclasse Nostocophycidae.

Desse modo, o novo sistema de classificação de cianobactérias (Tabela 4) segue os preceitos da sistemática multidisciplinar ou polifásica (CASTENHOLZ, 2001; GILLIS et al., 2001; VANDAMME et al., 1996), cuja caracterização dos organismos deve utilizar o maior número de informações possíveis, compreendendo caracteres fenotípicos (morfologia, fisiologia, ácidos graxos, exopolissacarídeos etc.) e genotípicos (hibridização DNA-DNA, sequenciamento gênico, composição GC, etc.) (GILLIS et al., 2001). Ainda, deve ocorrer congruência entre esses caracteres (VANDAMME et al., 1996), levando sempre em consideração a história evolutiva dos organismos.

Verifica-se a importância da morfologia na taxonomia de cianobactérias, bem como os estudos de material em cultura como fonte de informações para uma abordagem multidisciplinar. Historicamente, a complementaridade dos estudos de populações naturais e linhagens na caracterização dos táxons de cianobactérias, e a utilização de informações morfológicas, biológicas, fisiológicas, bioquímicas e ecológicas na determinação das espécies foi discutida por Anagnostidis e Komárek (1985). Dada a importância dos caracteres morfológicos para identificação das cianobactérias nos níveis genérico e específico ("morfoespécies"), problemas surgem devido à grande maioria dos trabalhos botânicos basearem-se apenas em material preservado da natureza e nos dados ecológicos. Assim, variações populacionais são de difícil delimitação, podendo ocasionar identificações erradas. Por outro lado, as condições em cultura podem representar situação de estresse e a caracterização morfológica deve ser feita de modo criterioso para não se incorrer em erros de identificação (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Da mesma forma, Zehnder (1985) também relata que os estudos em cultura são indispensáveis para a solução de problemas taxonômicos de cianobactérias, desde que baseados em linhagens identificadas corretamente. Portanto, a taxonomia de cianobactérias em geral é complexa devido ao grande número de espécies descritas de acordo com material preservado da natureza.

De acordo com as descrições baseadas nos caracteres morfológicos das espécies de *Anabaena*, trabalhos botânicos reportam diferentes táxons para vários países (CRONBERG; KOMÁREK, 2004; KOMÁREK, 2005b; NGUYEN et al., 2007; WOOD et al., 2005). Duas espécies de *Anabaena* (*A. recta* Geitler et Ruttner e *A. viguieri* Denis et Frémy) e cinco novas espécies (*Anabaena austro-africana*, *A. carmichaelii*, *A. bituri*, *A. maxima* e *A. nygaardii*) foram relatadas para ambientes lênticos da África (CRONBERG; KOMÁREK, 2004). Em levantamento

realizado em Cuba, foram descritas *A. austro-africana* Cronberg et Komárek, *A. fuellebornii* Schmidle, *A. iyengarii* Bharadwaja, *A. manguinii* (Bourrelly) Komárek, *A. oblonga* De Wildeman, *A. orientalis* S. C. Dixit, *A. portoricensis* N. L. Gardner, *A. torques-reginae* Komárek, *A. turkestanica* (A. Kiselev) Komárek, *A. unispora* N. L. Gardner e *A. volzii* Lemmermann, incluindo as novas espécies *A. hatueyi* e *A. jeejiae* (KOMÁREK, 2005b). Dentre novas ocorrências de cianobactérias planctônicas na Nova Zelândia, *A. minderi* Huber-Pestalozzi, *A. planktonica* Brunnthaher e *A. smithii* (Komárek) M. Watanabe foram relatadas (WOOD et al., 2005). Em Thuathien-Hue (Vietnã), *A. laxa* A. Braun ex Bornet et Flahault e *A. viguieri* Denis et Frémy foram reportadas (NGUYEN et al., 2007). Ainda, com base na revisão das morfoespécies descritas em trabalhos botânicos, *Anabaena* com tricomas espiralados foram classificadas dentro de um novo subgênero: *Dolichospermum* Thwaites ex Wittrock et Nordstedt , cuja espécie tipo é *A. flos-aquae* (Lyngbye) Brébisson ex Bornet et Flauhault (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007).

No Brasil, levantamento da biodiversidade de *Anabaena* no Rio Grande do Sul revelou as seguintes espécies: *A. circinalis* Rabenhorst ex Bornet et Flahault, *A. crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg, *A.* cf. *inaequalis* (Kützing) Bornet et Flahault, *A. mucosa* Komárková-Legnerová et Eloranta, *A. solitaria* Klebahn, *A. spiroides* Klebahn e *A. vigueri* Denis et Frémy (WERNER, 2002). Em ambientes lênticos da região do alto Rio Paraná (Porto Rico, Paraná), amostras de cianobactérias perifíticas das Lagoas Clara e das Garças revelaram a presença das espécies *A. affinis* Lemmermann , *A. cylindrica* Lemmermann e *A. sphaerica* Bornet et Flahault (FONSECA; RODRIGUES, 2005). Nos reservatórios Billings, Guarapiranga, Jundiaí e Taiaçupeba (São Paulo) foram relatadas as espécies: *A. circinalis* Rabenhorst, *A. crassa* (Lemmermann) Komárkova-Legnerová et Cronberg, *A. planctonica* Brunnthaler, *A. solitaria* Klebahn e *A. spiroides* Klebahn (SANT'ANNA et al., 2007).
				(continua)
Metodologia e região gênica <sup>(1)</sup>	Objetivo	Origem <sup>(2)</sup> e linhagens de <i>Anabaena</i> <sup>(3)</sup>	Principais resultados/conclusões <sup>(4)</sup>	Referência
Seqüenciamento nifH (359 pb)	Diferenciação de cianobactérias e caracterização de populações diazotróficas	Anabaena sp. CA (ATCC33047)	<i>NifH</i> diferencia cianobactérias heterocitadas de não heterocitadas.	Ben-Porath; Zehr (1994)
RFLP da PC-IGS (~ 700pb)	Método molecular para identificação de cianobactérias	Austrália, Inglaterra, Japão – A. affinis NIES40, A. circinalis (AWT001, - 002, - 006, NIES41), A. cylindrica NIES19, A. flos-aquae NIES73, A. solitaria NIES80, A. spiroides (NIES76, - 78)	<i>Anabaena</i> é polifilético, p.e., <i>A. spiroides</i> NIES76 e <i>A. solitaria</i> NIES80 tiveram mesmo padrão de digestão (RFLP), enquanto <i>A. spiroides</i> NIES76 e <i>A. spiroides</i> NIES78 diferiram	Neilan, Jacobs e Goodman (1995)
Seqüenciamento regiões V6, V7 e V8 do RNAr 16S (479pb)	Filogenia de cianobactérias	Noruega - A. lemmermannii (NIVA-CYA281/1, - 83/1, - 266/1), Anabaena sp. NIVA-CYA 267/4	Anabaena e Aphanizomenon agruparam-se em clado único	Rudi et al. (1997)
Seqüenciamento RNAr 16S (479pb), <i>rbcLX</i> (787-808pb)	Filogenia e evolução de genes	Noruega - A. lemmermannii (N-C281/1, - 83/1, - 266/1), Anabaena sp. N-C267/4	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> agruparam-se em clado único RNAr 16S e <i>rbcLX</i> provavelmente tenham padrão evolutivo distintos	Rudi,, Skulberg, Jakobsen (1998)
HIP1-PCR e RFLP da região intergênica RNAr 16S-23S	Diferenciar linhagens de Anabaena flos- aquae e Nostoc ellipsosporum	Estados Unidos, Inglaterra – A. cylindrica CCAP1403/2a, A. flos-aquae (CCAP1403/13A, /13B, /13d - /13H), Anabaena sp. CCAP1446/1C, Anabaena sp. ATCC27892, Anabaena sp. PCC7120	Linhagens de <i>A. flos-aquae</i> são menos diversas que as de <i>N.</i> <i>ellipsosporum</i> .	Smith et al. (1998)
RNAr 16S (1300- 1450pb), PC-IGS (680pb)	Filogenia e detecção de <i>A. circinalis</i> no meio ambiente	Austrália, Canadá, Japão - A. affinis NIES40, A. circinalis (AWQC118C, -131C, -134C, -150A, -173A, - 271C, -279B, - 306A, -307C, -310F, -323B, -331C, - 332H, -344B, AWT001, -204A, -205B, -02, NIES21, - 41), A. cylindrica NIES19, A. flos-aquae (AWQC112D, NRC44-1, NRC525-17), A. solitaria NIES80, A. variabilis NIES23	<i>A. circinalis</i> é monofilética Iniciadores ACB1F, ACB2F e AC510R conseguiram detectar <i>A.</i> <i>circinalis</i> tóxica de não tóxica na natureza	Beltran e Neilan (2000)

				(continuação)
Metodologia e região gênica <sup>(1)</sup>	Objetivo	Origem <sup>(2)</sup> e linhagens de <i>Anabaena</i> <sup>(3)</sup>	Principais resultados/conclusões <sup>(4)</sup>	Referência
Seqüenciamento rpoCl (612pb)	Filogenia e detecção de <i>A. circinalis</i> no meio ambiente	Austrália - A. aphanizomenoides, A. circinalis, A. flos- aquae, A. pertubarta f. tumida, A. solitaria, A. spiroides f. spiroides, A. spiroides f. minima, Anabaena sp.	<i>A. pertubarta</i> f. <i>tumida</i> é uma nova espécie. Iniciadores Ana-2, Ana-4 e Ana-ICF conseguiram detectar <i>A. circinalis</i> na natureza	Fergusson e Saint (2000)
Seqüenciamento nifH (-345pb)	Filogenia de Anabaena e Nostoc	A. azollae 1a, A. oscillarioides, A. variabilis ATCC29413, Anabaena sp. (CA, A2, L31)	<i>Anabaena</i> e <i>Nostoc</i> são gêneros muito próximos geneticamente e poderiam formar um único gênero	Tamas, Svircev e Andersson (2000)
Seqüenciamento RNAr 16S (1442- 1482pb) RFLP RNAr 16S (1500pb) <i>Fingerprinting</i> REP/ERIC-PCR	Caracterização molecular de Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis e Planktothrix	Espanha, Finlândia, Holanda, Inglaterra, Japão, Noruega - <i>A. circinalis</i> NIES41, <i>A. cylindrica</i> PCC7122, <i>A. flos- aquae</i> (NIVA-CYA83/1, NIES73), <i>A. spiroides</i> NIES79, <i>Anabaena</i> sp. (14, 37, 54, 86, 123, 130, 66A, 66B, 90, 202A1, 2002A1/35, 202A2, 277, PCC6309, PCC7108, PCC73105, PCC9208)	Características morfológicas (Anabaena e Aphanizomenon) e toxicidade ou distribuição geográfica não refletem filogenia a partir do RNAr 16S	Lyra et al. (2001)
Seqüenciamento RNAr 16S (1465pb), <i>rbcLX</i> ( <i>ca.</i> 783pb) Polimorfismo do ITS1 (S 450- 500pb, L 660- 730pb)	Filogenia de <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	Dinamarca, Estados Unidos, Finlândia, França, Noruega - A. circinalis (86, 123, 90), A. compacta (PH118, PH189), A. crassa PH215, A. cf. cylindrica (PH133, PMC9705), A. flos-aquae (14, 37, 202A1), A. lemmermannii (NC83/1, 66A, 202A2, PH256), A. cf. lemmermannii PH262, A. macrospora PMC9301, A. mendotae PH57, A. planctonica PH71, A. solitaria 82, A. spiroides (PMC9403, PMC9702), Anabaena sp. (PMC9701, 277, 299, IC-1)	RNAr 16S, ITS1-S e <i>rbcLX</i> resultaram em árvores similares <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> não são monofiléticos	Gugger et al. (2002)
Seqüenciamento <i>nif</i> D (1503pb)	Filogenia de Anabaena e Nostoc	Estados Unidos, Inglaterra – A. cylindrica PCC7122, Anabaena sp. (ATCC33047, PCC7108)	Anabaena e Nostoc são gêneros diferentes	Henson, Watson e Barnum (2002)

36

				(continuação)
Metodologia e região gênica <sup>(1)</sup>	Objetivo	Origem <sup>(2)</sup> e linhagens de <i>Anabaena</i> <sup>(3)</sup>	Principais resultados/conclusões <sup>(4)</sup>	Referência
Seqüenciamento RNAr 16S ( <i>rrnS</i> ) 1434pb, ITS RNAr 16-23S (569pb) RFLP RNAr 16S (1450pb)	Filogenia de cianobactérias heterocitadas	Canadá, Inglaterra – <i>A. flos-aquae</i> (PCC9302, PCC9332, PCC9349)	Anabaena e Aphanizomenon formam um agrupamento único pelas análises de RFLP do RNRr 16S A. <i>flos-aquae</i> pode apresentar até 5 cópias do operon <i>rrn</i>	Iteman et al. (2002)
Seqüenciamento hetR (448pb), PC- IGS (499pb)	Filogenia de cianobactérias heterocitadas	Suécia – A. lemmermannii KAC16, Anabaena sp. (st8, M14-2, M14-4)	Anabaena e Aphanizomenon são gêneros muito próximos A região PC-IGS pode sofrer seleção ou recombinação	Janson e Granéli (2002)
Composição de bases do DNA (GC)	Caracterização GC de linhagens de Anabaena	China, Japão - A. affinis, A. circinalis, A. crassa, A. compacta, A. curva, A. danica, A. eucompacta, A. ellipsoides, A. flos-aquae, A. kisseleviana, A. lemmermannii, A. mucosa, A. mendotae, A. oumiana, A. planctonica, A. solitaria, A. smithii, A. ucrainica, A. vigueri e Anabaena sp1/sp2	<i>A. eucompacta</i> possui composição GC (45,5%mol) diferente de <i>A. compacta</i> (39,5%mol GC) e representa espécie diferente	Li e Watanabe (2002)
Seqüenciamento RNAr 16S, gyrB (1188pb), rpoC1 (885pb), rpoD1 (564pb)	Filogenia de cianobactérias	A. cylindrica IAMM-253 A. variabilis (IAMM-204, - 3)	Nostocales e Stigonematales formam grupo monofilético Nostocales é monofilético pelas sequências de aminoácidos do gyrB	Seo e Yokota (2003)
Seqüenciamento nifD (1503pb)	Filogenia de cianobactérias heterocitadas (Subsecões IV e V)	Estados Unidos, Inglaterra – A. cylindrica PCC7122, Anabaena sp. (ATCC33047, PCC7108)	Cianobactérias heterocitadas são monofiléticas, porém as subseções IV e V não são suportadas pelo gene <i>nifD</i>	Henson et al. (2004)
Seqüenciamento RNAr 16S (1393pb), <i>rpoB</i> (451pb), <i>rbcLX</i> (606pb)	Caracterização genética e fenotípica de Anabaena, Aphanizomenon, Trichormus e Nostoc	Alemanha, Canadá, Finlândia – A. augstumalis, A. circinalis, A. cf. circinalis var. macrospora, A. cf. crassa, A. cf. cylindrica, A. compacta, A. flos-aquae, A. lemmermannii, A. mucosa, A. oscillatorioides, A. planctonica, A. sigmoidea, A. smithii, A. spiroides, Anabaena sp.	Anabaena e Aphanizomenon não são monofiléticos Forma e tamanho do acineto é bom character para separar morfoespécies	Rajaniemi et al. (2005)

				(continuação)
Metodologia e região gênica <sup>(1)</sup>	Objetivo	Origem <sup>(2)</sup> e linhagens de <i>Anabaena</i> <sup>(3)</sup>	Principais resultados/conclusões <sup>(4)</sup>	Referência
Seqüenciamento RNAr 16S ( <i>ca.</i> 1203pb) e DGGE parte da região hipervariável V3 do RNAr 16S (357FC/518R) 161pb	Diversidade genética de cianobactérias produtoras de geosmina no Lago Ontário	Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, Manitoba – A. cylindrica, A. flos-aquae (UTEXLB2383, UTCC64), A. lemmermannii (AL4, AL5, AL7, LONT2, LONT5, GIOL8), A. planctonica, A. spiroides, A. vigueri, Anabaena sp. LOW	Dentre as linhagens de <i>Anabaena</i> , apenas <i>A. cylindrica</i> , <i>A. flos-</i> <i>aquae</i> e <i>A. lemmermannii</i> puderam ser diferenciadas pelo DGGE	Gill (2006)
Seqüenciamento RNAr 16S (~ 500pb)	Morfologia e filogenia de cianobactérias	Bélgica, França, Luxemburgo - A. crassa (1ES33S1), A. macrospora (PMC9301), A. oscillarioides (0RO34S1), A. planctonica (1ES36S2, 1MS33S1), A. sigmoidea (7RO28S1, 9BU29S1, 9BU29S2, 0FO34S1), A. spiroides (7RO37S1, PMC9702), Anabaena sp. (7VI37S1, PMC9701)	Formas heterocitadas (Nostocales) agruparam-se em dois clados: I.A. espécies planctônicas de <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> , e I.B. formas bentônicas/perifíticas de <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Trichormus</i> com formas planctônicas de <i>Anabaenopsis</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Cyanospira</i>	Willame et al. (2006)
<i>Fingerprinting</i> de regiões repetitivas (LTRR, STRR, Hip)	Diferenciação morfológica, bioquímica e molecular de <i>Anabaena</i>	Índia – <i>Anabaena</i> sp. CCC35/36/39/59/70/96/111/162/172/179/183/225/230/3 59/441/508/509 Linhagens tipo: <i>Anabaena</i> sp. (PCC7120, ATCC29413/29414)	Caracteres morfológicos (forma do tricoma, diâmetro da célula vegetativa, posição/forma/tamanho do heterócito e forma da célula terminal) e bioquímicos/fisiológicos (PBS – ficobiliproteínas totais, nitrogenase, GS e atividade de excreção da amônia) são	Prasanna et al. (2006)

importantes para diferenciar

linhagens

Tabela 5 -	- Principais	trabalhos de	e sistemática	molecular	envolvendo	genes	constitutivos	e func	cionais	em linhagens	de A	nabaena
	1					$\mathcal{O}$				0		

				(conclusão)
Metodologia e região gênica (1)	Objetivo	Origem (2) e linhagens de Anabaena (3)	Principais resultados/conclusões (4)	Referência
Seqüenciamento RNAr 16S, <i>rpoC1, rpoB,</i> <i>tufA, rbcL</i> (3586pb) <sup>(5)</sup> Genes da microcistina sintetase <i>mcyD,</i> <i>mcyE, mcyG,</i> <i>mcyB, mcyC</i>	Evolução dos genes constitutivos e de produção de microcistina	Finlândia - <i>Anabaena</i> sp. (90, 18B6, 66A)	Existe congruência dos genes constitutivos e dos produtores de microcistina Domínios de adenilação dos genes <i>mcyB1</i> e <i>mcyC</i> são regiões de recombinação das sintetases de microcistina e evoluem independentemente dos domínios de condensação	Fewer et al. (2007)
Seqüenciamento RNAr 16S (1294pb), <i>rpoC1</i> (762pb), <i>rbcL</i> (693pb)	Diversidade genética de linhagens planctônica e bentônicas de <i>Anabaena</i>	Golfo da Finlândia - <i>Anabaena</i> sp. (diversas linhagens com designações BECID, BIR, XP e XS)	Filogenia não separa linhagens bentônicas das planctônicas	Halinen et al. (2008)
Seqüenciamento RNAr 16S (1277- 1295pb)	Filogenia de espécies de <i>Anabaena</i>	Lago Dianchi e Erhai (China) - <i>A. circinalis</i> (EH-2, EH- 3 e EH-4), <i>A. cylindrica</i> (DC-3) e <i>A. flos-aquae</i> (DC-1, DC-2 e EH-1)	As morfoespécies têm fundamento filogenético <i>A. circinalis</i> e <i>A. crassa</i> formam clado único (revisão?) <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i> precisam ser revistos	Pan et al. (2008)

<sup>(1)</sup> Tamanho somente relacionado às sequências de Anabaena obtidas pelos autores. Quando não citado no texto, o tamanho é referente àquele citado no NCBI para <sup>(2)</sup> Quando não disponível, a origem de algumas linhagens foi obtida nas páginas das Coleções de Cultura (http://www.atcc.org/ e http://www.ccap.ac.uk/).
 <sup>(3)</sup> Quando em grande número, foram apresentadas apenas as morfoespécies utilizadas.
 <sup>(4)</sup> Referente ao gênero Anabaena e correlatos.
 <sup>(5)</sup> Dados concatenados dos diferentes genes.

40

Apesar da grande maioria dos estudos taxonômicos de cianobactérias terem sido baseados em amostras ambientais, atualmente, o cultivo desses organismos tem contribuído na delimitação dos táxons e é condição primordial na validação de linhagens pelo Código Bacteriológico. A identificação morfológica de espécies de Anabaena utilizando material em cultivo tem sido documentada para isolados de países de clima temperado (GUGGER et al., 2002; LI; WATANABE; WATANABE, 2000; LI; WATANABE, 2002; PAN et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005; RAJANIEMI-WACKLIN, 2006; WILLAME et al., 2006). Dentre 50 linhagens do Japão e China, 20 morfoespécies planctônicas foram descritas: Anabaena affinis, A. circinalis, A. crassa, A. compacta, A. curva, A. danica, A. eucompacta, A. ellipsoides, A. flos-aquae, A. kisseleviana, A. lemmermannii, A. mucosa, A. mendotae, A. oumiana, A. planctonica, A. solitaria, A. smithii, A. spiroides, A. ucrainica e A. vigueri (LI; WATANABE; WATANABE, 2000). Assim, com base nas características morfológicas, como dimensões da espira e tipos celulares (vegetativo, heterócito e acineto), uma espécie nova foi descrita: Anabaena eucompacta Li et Watanabe. Apesar da maioria das linhagens formarem acinetos e serem identificadas em nível específico, três linhagens nunca formaram acinetos e foram designadas como Anabaena sp-1(Ana Ku-3 e Ana Ku-5) e Anabaena sp-2 (CCAP 1403/13F). Variações morfológicas foram relatadas em linhagens de diferentes espécies de Anabaena em cultura, como A. spiroides que perdeu a regularidade da espira e A. lemmermannii que perdeu os acinetos agregados no centro do tricoma (GUGGER et al., 2002). De modo similar, diâmetro do tricoma e tipo de espira de A. circinalis e A. crassa apresentaram variação após experimento de gradiente-cruzado luz/temperatura e concentrações de nitrogênio e fósforo (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008). Diferentes espécies de Anabaena puderam ser identificadas de acordo com suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas como, por exemplo, na diferenciação de A. viguieri TAC433 de A. affinis NIES40/Inba3, cujo conteúdo GC variou de 7,9 - 8,1 mol% (LI; WATANABE, 2002). Nos estudos conduzidos por Rajaniemi et al. (2005), 13 espécies foram caracterizadas de um total de 34 linhagens de Anabaena,: A. augstumalis, A. circinalis, A. crassa, A. flos-aquae, A. lemmermannii, A. mucosa, A. oscillarioides, A. planctonica, A. sigmoidea, A. smithii A. spiroides, A. cf. circinalis var. macrospora e A. cf. cylindrica. A importância de alguns caracteres morfológicos (tricoma reto/espiralado, dimensão/forma das células vegetativa, heterócito e acineto) foi estudada em 13 linhagens de Anabaena pertencentes às espécies A. crassa, A. macrospora, A. oscillarioides, A. planctonica, A. sigmoidea e A. spiroides, isoladas da Bélgica e Luxemburgo (WILLAME et al., 2006). Pan et al. (2008) analisaram linhagens isoladas dos Lagos Dianchi e Erhai (China) e identificaram as espécies *A. circinalis* (linhagens EH-2, EH-3 e EH-4), *A. cylindrica* (linhagem DC-3) e *A. flos-aquae* (linhagens DC-1, DC-2 e EH-1). De acordo com esses mesmos autores, o tipo de espira (regular/irregular), largura da célula vegetativa e heterócito, assim como presença ou ausência de aerótopos mostraram-se caracteres importantes na identificação desses morfotipos.

No Brasil, alguns estudos utilizaram cultivo de cianobactérias para avaliação de diversidade (OLIVEIRA et al., 1980) ou de bactérias associadas à cápsula de *Anabaena* (BAGATINI, 2008). Linhagens heterocitadas presentes em solos de plantação de arroz e milho (Piracicaba, São Paulo), como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Hapalosiphon*, *Microchaete* e *Nostoc*, foram obtidas utilizando meio de cultura isento de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 1980). Recentemente, *Anabaena spiroides* BB007 (Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil), isolada do Reservatório de Barra Bonita, foi objeto para estudo de bactérias associadas à sua cápsula de polissacarídeo (BAGATINI, 2008). Por meio da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foi verificada a sucessão de Acidobacteria e Alphaproteobacteria na fase exponencial de crescimento por Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria e Bacilli (Firmicutes) na fase de senescência da *A. spiroides* BB007 (BAGATINI, 2008). Assim, estudos envolvendo a sistemática molecular de isolados brasileiros de *Anabaena*, sob condições controladas de cultivo, ainda são inexistentes.

### 2.4 Sistemática molecular

A definição de espécie na Microbiologia segue tradicionalmente o nível de hibridização DNA-DNA (DDH) entre duas linhagens que, para serem consideradas de uma mesma espécie, devem ter valor  $\geq 70\%$  e  $\Delta$ Tm (temperatura de anelamento)  $\leq 5^{\circ}$ C (GEVERS et al., 2005; WAYNE et al., 1987). Porém, as técnicas de DDH apresentam vários problemas, pois dependem de parâmetros físico-químicos, são trabalhosas e necessitam de grandes quantidades de DNA, além da falta de padronização das condições de análise entre os laboratórios (VANDAMME et al., 1996). Assim, incongruências entre dados de DDH e características fenotípicas podem ocorrer (WAYNE et al., 1987), como nas espécies de *Bordetella (B. pertussis, B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*) que são facilmente identificadas pelos caracteres morfológicos, bioquímicos e

quimiotaxonômicos (VANDAMME et al., 1996), mas apresentam mais de 80% de associação DNA-DNA (KLOOS et al., 1981; VANDAMME et al., 1995; WEYANT et al., 1995). Portanto, a definição de espécies baseada apenas na técnica de DDH não é consensual. Recentemente, foi sugerido que os microbiologistas adotem o conceito abstrato de espécies, definidas por linhagens metapopulacionais, com critério evolutivo de especiação e livre de metodologias direcionadas ao organismo alvo (DDH e RNAr 16S) (ACHTMAN; WAGNER, 2008). Como exemplificado pelos autores, o valor de referência de 70 % para DDH para definir espécies foi estipulado há 20 anos e não apresenta nenhuma justificativa teórica. Como pré-requisito, as espécies devem evoluir separadamente de outras linhagens por forças coesivas e não necessitam, por exemplo, serem distintas fenotipicamente, monofiléticas ou ecologicamente separadas. Os ecotipos de Prochlorococcus MED4 e MIT9312 diferem apenas em 0,8% nas suas sequências de RNAr 16S, porém a identidade média dos genes em comum é de apenas 78% (COLEMAN et al., 2006). Assim, se esses diferentes ecotipos estiverem ligados por forças coesivas como recombinação, estas populações poderiam representar uma única espécie (ACHTMAN; WAGNER, 2008). Esse novo conceito apresenta como vantagem o fato de que organismos não cultiváveis poderiam constituir novas espécies com base na estrutura de suas populações. Porém, as técnicas para aplicação do conceito de metapopulação não foram definidas e até que os estudos de genética de população sejam aprofundados, deve-se continuar utilizando as técnicas disponíveis (ACHTMAN; WAGNER, 2008).

Assim, a bacteriologia tem utilizado a região do RNAr 16S para a maioria dos estudos de inferências filogenéticas, sendo que similaridade acima de 97% entre fragmentos indica que as linhagens pertencem a uma mesma espécie (VANDAMME et al., 1996). Contudo esse valor não é definitivo. Outros genes constitutivos também são recomendados e utilizados para filogenia, pois são também conservados e poucos sujeitos à transferência lateral, inserção/deleção ou recombinação. Em cianobactérias, mais especificamente em *Anabaena*, os genes que têm sido utilizados para análises filogenéticas são: *cpcBA*, *gyrB*, *hetR*, *rbcLX*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoD1* e *tufA* (Tabela 5), além do RNAr 16S.

Os genes que codificam as RNA polimerases dependentes de DNA têm sido muito usados nas inferências filogenéticas de bactérias por serem ubíquos, extremamente conservados, e transcreverem macromoléculas (PÜHLER et al., 1989). Estudos sorológicos mostraram que as cianobactérias possuem todas as subunidades da RNA polimerase ( $\beta$ ',  $\beta$  e 2 $\alpha$ ) como em

*Escherichia coli* mais a subunidade  $\gamma$  (SCHNEIDER; HASELKORN, 1988). Posteriormente, foi verificado que os genes rpoB, rpoC1 e rpoC2, análogos ao operon rpoBC de E. coli, codificavam as subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\beta$ ' da polimerase de Anabaena sp. PCC7120 (BERGSLAND; HASELKORN, 1991). Portanto, o gene rpoC1, equivalente ao gene rpoC de Escherichia coli, é codificador da subunidade  $\gamma$  da RNA polimerase e específico para as cianobactérias (BERGSLAND; HASELKORN, 1991). Outra região constitutiva importante nas cianobactérias é aquela relacionada à transcrição da enzima D-ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO) responsável pela fixação do CO<sub>2</sub> na fotossíntese. A RubisCO mais comum na natureza (forma I) está presente em plantas terrestres e marinhas, algas, cianobactérias, e na maioria das protobactérias fototróficas e quimiolitoautotróficas (TABITA et al., 2007). Em Anabaena, a região dos genes rbcLX tem sido a mais utilizada (FEWER et al., 2007; GUGGER et al., 2002; HALINEN et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005; RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998) para estudos filogenéticos (Tabela 5). Essa região é caracterizada por uma fração mais conservada, o gene rbcL, cujo final 3' codifica para subunidade maior da RubisCO, e duas partes mais variáveis, uma região intergênica e o gene *rbcX*, que apresenta atividade similar a uma chaperonina (RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998).

O gene *tuf* é responsável pela transcrição do fator de elongação EF-Tu e tem sido utilizado para filogenia de bactérias (DELWICHE; KUHSEL; PALMER, 1995; SELA et al., 1989). Em bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias, foram verificadas duas cópias desse gene (SELA et al., 1989), porém em *E. coli* elas diferem na posição de apenas 13 dentre 1200 nucleotídeos (YOKOTA et al., 1980). Portanto, o gene *tufA* é considerado conservado, ubíquo e, devido a sua importante função, dificilmente retém mutações neutras (DELWICHE; KUHSEL; PALMER,1995), o que o caracteriza como um bom elemento para inferências filogenéticas.

Quanto à sistemática molecular de *Anabaena* (Tabela 5), as sequências de RNAr 16S são as mais comumente usadas, com ampla aplicação em estudos de níveis mais altos (Ordens/Seções) até diferenciação interespecífica. A maioria dos estudos baseados no seqüenciamento do RNAr 16S, envolvendo o gênero *Anabaena*, refere-se à diferenciação e filogenia desse grupo com *Aphanizomenon* (Tabela 5). Os gêneros *Anabaena* e *Aphanizomenon* não são monofiléticos, conforme demonstrado pelas árvores obtidas com as sequências do RNAr 16S (GUGGER et al., 2002; ITEMAN et al., 2002; PAN et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005; RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998; WILLAME et al., 2006). Da mesma forma, análises dos genes de RNAr 16S, *rpoC1* e *rbcLX* para os gêneros *Anabaena* e *Aphanizomenon* mostraram que esses dois gêneros formaram um agrupamento único, indicando que eles não são suportados pelas análises filogenéticas. (RAJANIEMI et al. 2005). Corroborando com esses dados, outro estudo de filogenia usando sequências do RNAr 16S e da região do espaço intergênico ITS-16/23S RNAr mostraram que os gêneros *Anabaena* e *Aphanizomenon* formaram um clado monofilético (ITEMAN et al. 2002). Diante dessa problemática, foi sugerido que *Anabaena* e *Aphanizomenon* devem permanecer separados e considerados como gênero-forma, até que seja feita uma revisão detalhada desse grupo de cianobactérias heterocitadas (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005).

Quanto à variação interespecífica, resultados contraditórios foram observados para duas morfoespécies, *A. circinalis* e *A. crassa*. Inicialmente, *A. circinalis* mostrou-se uma espécie monofilética com base nas sequências do RNAr 16S (BELTRAN; NEILAN, 2000). Porém, posteriormente, verificou-se a necessidade de revisar a estabilidade dessa espécie, pois linhagens de *A. circinalis* agruparam-se com as de *A. crassa* de material isolado dos lagos Dianchi e Erhai – China (PAN et al., 2008). Apesar do RNAr 16S ser utilizado para delineamento de espécies (GEVERS et al., 2005), ele não possui resolução suficiente para defini-las, sendo mais indicado na comparação entre gêneros, famílias ou em níveis mais altos (VANDAMME et al., 1996). Além do mais, o RNAr 16S possui várias cópias no genoma como, por exemplo, a *Nostoc punctiforme* PCC73102 que apresenta duas cópias do RNAr 16S (Tabela 6).

Como alternativa, é cada vez mais comum o uso de diversos genes para caracterizar bactérias, como as técnicas de tipificação e análise de sequências por multilocos (MLST – "multilocus sequence typing" e MLSA – "multilocus sequence analysis"). A MLST é uma técnica de abordagem universal desenvolvida por microbiologistas clínicos e epidemiologistas, cujo objetivo foi caracterizar bactérias patogênicas em nível molecular (GEVERS et al., 2005), tendo como primeiro exemplo a *Neisseria meningitidis* (MAIDEN, 2006). Essa metodologia só foi possível após o aumento no conhecimento da evolução bacteriana, da biologia de populações, da maior disponibilidade e diminuição dos custos de sequenciamento e dos avanços da bioinformática (MAIDEN, 2006). A proposta inicial do uso de 12 genes constitutivos nas análises de MLST foi substituída por 7 genes (MAIDEN, 2006) e esse número, supõe-se, tende a minimizar os problemas de diferentes trajetórias evolutivas dos genes e da não evolução clonal nas populações (TABOADA et al., 2008). A principal diferença entre as técnicas é que na MLST

Tabela 6 - Número de cópias de sequências do RNAr 16S e divergências em cianobactéria (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)

Organismo	No. de cópias	No. de cópias diferentes	Divergência entre cópias %	Tamanho do genoma <sup>(1)</sup>	Número de acesso	Referência/Fonte
Cianobactéria heterocitada						
Anabaena variabilis ATCC29413	4	1	0	6,37	NC_007413	DOE Joint Genome Inst <sup>(2)</sup>
Nostoc punctiforme	4	2	0,1	8,23	NC_010628	DOE Joint Genome Inst.
PCC73102/ATCC29133						
Nostoc sp. PCC7120	4	2	0,07	6,41	NC_003272	ACINAS et al., 2004
Cianobactéria não heterocitada						
Synechococcus sp. JA-3-3Ab	2	1	0	2,93	NC_007775	TIGR (JCVI) <sup>(3)</sup>
Synechococcus sp. JA-2-3B'a(2-13)	2	1	0	3,05	NC_007776	TIGR (JCVI)
Gloeobacter violaceus PCC7421	1	1	-	4,66	NC_005125	Kazusa <sup>(4)</sup>
Prochlorococcus marinus MIT9312	1	1	-	1,71	NC_007577	DOE Joint Genome Inst.
Prochlorococcus marinus MIT9313	2	1	0	2,41	NC_005071	DOE Joint Genome Inst.
Prochlorococcus marinus NATL2A	1	1	-	1,84	NC_007335	DOE Joint Genome Inst.
Prochlorococcus marinus CCMP1375	1	1	-	1,75	NC_005042	CNRS <sup>(5)</sup>
Prochlorococcus marinus CCMP1986	2	1	0	1,66	NC_005072	DOE Joint Genome Inst.
Synechococcus elongatus PCC6301	2	1	0	2,7	NC_006576	Univ. Nagoya, Japão <sup>(6)</sup>
Synechococcus elongatus PCC7942	2	1	0	2,7	NC_007604	DOE Joint Genome Inst.
Synechococcus sp. CC9605	2	1	0	2,51	NC_007516	DOE Joint Genome Inst.
Synechococcus sp. CC9902	2	1	0	2,23	NC_007513	DOE Joint Genome Inst.
Synechococcus sp. WH8102	2	1	0	2,43	NC_005070	DOE Joint Genome Inst.
Synechocystis sp. PCC6803	2	1	0	3,57	NC_000911	ACINAS et al., 2004
Thermosynechococcus elongatus BP-1	1	1	-	2,59	NC_004113	Kazusa
<ul> <li><sup>(1)</sup> Tamanho do genoma obtido do banco de data</li> <li><sup>(2)</sup> Http://www.jgi.doe.gov/.</li> <li><sup>(3)</sup> Http://www.jcvi.org/.</li> <li><sup>(4)</sup> Http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/.</li> <li><sup>(5)</sup> Http://www.cnrs.fr/index.php.</li> <li><sup>(6)</sup> Http://www.nagoya-u.ac.jp/en/.</li> </ul>	dos NCBI (h	ttp://www.ncbi.n	lm.nih.gov/pubmec	l/).		

46

o objetivo é caracterizar microrganismos em nível infraespecífico pelas incongruências nos padrões alélicos de genes constitutivos, enquanto que na MLSA as sequências destes genes são concatenadas e utilizadas para diferenciação em níveis genéricos ou supra-genéricos (GEVERS et al., 2005). O primeiro trabalho envolvendo MLST em cianobactérias utilizou 7 genes constitutivos (ftsZ, glnA, gltX, gyrB, pgi, recA e tpi) para caracterizar linhagens tóxicas e não tóxicas de Microcystis aeruginosa (TANABE; KASAI; WATANABE, 2007). A técnica MLST mostrou alta diversidade gênica em M. aeruginosa que pode ser explicada pela ocorrência de ecotipos e por forças evolutivas como recombinação, com estrutura populacional clonal. Os padrões de MLST revelaram grupos distintos para linhagens produtoras de microcistina das não produtoras, mostrando ser uma técnica sensível e discriminatória. Análise concatenada do RNAr 16S, rpoCl, rpoB, tufA e rbcL de Anabaena sp. (3586 pb) (Tabela 5) revelou que o gênero é estável, com a formação de um ramo separado de Nostoc sp. (FEWER et al., 2007). Contudo, o número restrito de linhagens limitou um pouco essa análise filogenética. As técnicas de análise em multilocos (MLST/MLSA) representam ferramentas importantes para diferenciação de bactérias, desde variação infraespecífica (linhagens) até os níveis mais altos como espécies e gêneros. Além disso, informações geradas no sequenciamento de genomas, ecologia, estrutura populacional, taxas de recombinação e transferência lateral de genes auxiliarão em futuro próximo na delimitação das espécies bacterianas.

## 2.5 Monitoramento e detecção de cianobactérias

Após a edição da Portaria MS 518/2004 (BRASIL, 2004), o monitoramento de cianobactérias tornou-se obrigatório no ponto de captação de água no reservatório, com frequência mensal se o número de células de cianobactérias não exceder 10.000 células mL<sup>-1</sup> (1 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> de biovolume) ou semanal se ele ultrapassar esse valor. A utilização de produtos químicos para controle das florações não pode ser feita quando a densidade exceder 20.000 células mL<sup>-1</sup> (2 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> de biovolume) e ensaios toxicológicos com camundongo devem ser realizados. Além disso, foi determinado o valor máximo de 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de microcistina na água de consumo e recomendados 15  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de cilindrospermopsina e 3  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de equivalente saxitoxina. Portanto, o monitoramento das cianobactérias em reservatórios é o primeiro passo para certificação da qualidade de água consumida. Esse monitoramento é feito por contagem de células seguindo a técnica de Utermöhl (APHA, 1998) e a identificação por microscopia. Esses

métodos são demorados e imprecisos (LORENZI, 2008), principalmente devido à alta qualificação do especialista apto a identificar e quantificar cianobactérias. Necessita-se, assim, o desenvolvimento de métodos rápidos e precisos para detectar precocemente esses organismos em amostras ambientais.

Quanto à detecção de *Anabaena* envolvendo técnicas moleculares, os principais trabalhos utilizaram diferentes regiões como RNAr 16S (BELTRAN; NEILAN, 2000) e *rpoC1* (FERGUSSON; SAINT, 2000; GILL; 2006). Os oligonucleotídeos iniciadores da PCR ACB1F, ACB2F e AC510R para região do RNAr 16S conseguiram detectar diretamente na natureza linhagens de *Anabaena circinalis* (BELTRAN; NEILAN, 2000). Esse trabalho foi pioneiro também na detecção de linhagens tóxicas e não tóxicas de *A. circinalis*. De modo similar, *A. circinalis* foi detectada em amostras ambientais, porém por meio dos iniciadores Ana-2, Ana-4 e Ana-ICF para o gene *rpoC1* (FERGUSSON; SAINT, 2000). Recentemente, um marcador molecular foi desenvolvido usando DGGE para detecção de linhagens de *Anabaena* no Lago Ontário (GILL, 2006). Utilizando os iniciadores 357FC e 518R para a região hipervariável V3 do RNAr 16S, o fragmento de 161 pb após submetido à eletroforese por DGGE pode diferenciar *A. cylindrica*, *A. flos-aquae* e *A. lemmermannii*. Portanto, o desenvolvimento de metodologias para detectar e monitorar espécies potencialmente tóxicas de cianobactérias, como as do gênero *Anabaena* se faz necessário.

### 2.6 Material e métodos

## 2.6.1 Locais de amostragens

As amostras de água foram coletadas na margem de seis ambientes, quatro no Estado de São Paulo (Reservatórios Salto Grande e Billings, Rio Piracicaba e Lago da ESALQ/USP (Engenharia) e dois no Estado do Ceará (Lagoa do Povoado Nova Aurora e Rio Camarão) (Figura 1). Na praia dos Namorados localizada no Reservatório Salto Grande (S22°42'15,3" O47°16'00,3"), Americana, SP, a amostragem da água de superfície foi realizada em 06/09/2007. Esse reservatório está inserido na bacia hidrográfica do rio Atibaia, possui 11,5 km<sup>2</sup>, um volume máximo de 106 milhões m<sup>3</sup> e 19,8 m de profundidade máxima (ZANATA; ESPÍNDOLA, 2002). Ele foi construído entre 1940 e 1949 com o objetivo de gerar energia elétrica para a região mas,



Figura 1 – Alguns locais de amostragem. A, B. Reservatório Salto Grande, Praia dos Namorados, Americana – SP (fonte: Adriana Sturion Lorenzi); C, D. Lago da ESALQ/USP (Engenharia, Piracicaba – SP); E, F. Rio Camarão, Ceará (fonte: Tânia Keiko Shishido); G, H. Lagoa do Povoado Nova Aurora, Canindé – CE (fonte: Tânia Keiko Shishido)

com o passar dos anos, outras atividades foram incorporadas, tais como suprimento de água, irrigação de culturas e recreação. Processo crescente de deterioração da qualidade da água e florações típicas de *Microcystis/Anabaena* são observados praticamente durante o ano todo devido à entrada de efluentes domésticos e industriais das cidades de Paulínia e Campinas, além da carga orgânica de pequenos rios e córregos que recebem esgotos sanitários, sem tratamentos, de outras cidades e material proveniente da atividade agrícola.

A amostra obtida do Riacho Grande (S23°77'60,6" O46°53'17,4"), um braço lateral do Reservatório Billings, localizado no distrito de São Bernardo do Campo no Estado de São Paulo, foi coletada na superfície d'água em 26/05/2008. Esse reservatório foi construído em 1927 e possui 560 km<sup>2</sup>, um volume máximo de 1,27 bilhões de m<sup>3</sup> e profundidade máxima de 18 m (SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998). Ele recebe contribuição dos rios Grande, Pequeno, Bororé, Taquacetuba entre outros. Esse reservatório de ambiente eutrófico possui utilização bem diversificada, desde abastecimento de água, geração de energia, controle de inundações, irrigação e recreação (CARVALHO, 2003; CETESB, 1996, 2003). Segundo caracterização físico-química, esse ambiente pode apresentar pH 7,9, condutividade 178,70  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, fósforo total 0,06 mg L<sup>-1</sup>, nitrogênio total 1,20 mg L<sup>-1</sup> e clorofila-*a* 41,20  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (SANT'ANNA et al., 2007). O estado eutrofizado de suas águas contribui para a formação de florações de cianobactérias praticamente durante o ano todo.

Em um local de capitação de água do Rio Piracicaba, Piracicaba, SP (S22°71'28,2''; O47°65'05,4'') foi coletada amostra da superfície d'água em 27/08/2008. Esse rio recebe grande aporte de efluentes domésticos e industriais pontuais, bem como de efluentes agrícolas e apresenta-se bastante eutrofizado. Outro local amostrado em Piracicaba, SP, em 13/10/2008, foi o Lago da Engenharia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (S22°71'27,0" O47°63'12,6"), que é um ambiente com finalidade ornamental e apresenta água com coloração esverdeada, típica de floração de cianobactérias. A amostragem foi realizada na região encharcada na margem do lago (Figura 1D).

No Estado do Ceará, amostras de água foram coletadas em 07/11/2008, na Lagoa do Povoado Nova Aurora em Canindé (S4°22' O39°19), localizada dentro da vegetação de caatinga e no Rio Camarão (Estrada Fortaleza-Canindé, km 318). A época amostrada corresponde ao período de seca da região (Figuras 1E e 1G). As duas amostragens da margem do corpo d'água

foram compostas por material da região de superfície e fundo. No Rio Camarão foi observada grande quantidade de organismos bentônicos (Figura 1F).

Todas as amostragens foram realizadas utilizando frascos de vidro ou plástico, os quais foram mantidos a 8 °C, até o isolamento das células de *Anabaena*.

## 2.6.2 Isolamento e cultivo de Anabaena

O isolamento das linhagens de Anabaena foi feito pelo método de "pescaria" com pipetas Pasteur em microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Göttingen, Alemanha). A técnica consistiu em pingar uma gota da amostra ambiental numa lâmina, isolar um tricoma por capilaridade, com auxílio de pipeta Pasteur com extremidade afilada (RIPPKA, 1988), e lavá-lo sucessivamente em gotas de meio de cultura esterilizado. Depois de confirmada a presença de apenas um indivíduo, esse foi transferido para tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultura esterilizado. Devido à dificuldade no isolamento de cianobactérias como as do gênero Anabaena, foram empregados diferentes meios de cultura (Tabela 7). Variações na concentração de NaNO<sub>3</sub> e na adição de vitamina B12, bem como diferentes estratégias foram adotadas na tentativa de otimizar a obtenção de linhagens de Anabaena. A variação no teor de nitrogênio foi realizada para o meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979), sendo usadas as seguintes concentrações de NaNO<sub>3</sub>: 17,65 mM (BGN - normal), 8,82 mM (BG50) e sem NaNO<sub>3</sub> (BGS). O meio AA (ALLEN; ARNON, 1955) foi utilizado na concentração diluída de fosfato (AA/4). Para o controle de organismos eucariotos foi adicionada ciclohexamida (100 mg  $L^{-1}$ ) aos meios e para auxiliar no crescimento de Anabaena acrescentou-se vitamina B12 (0,015 µM) (CURRIER; HAURY; WOLK, 1977). Duas estratégias foram utilizadas para o isolamento de Anabaena, sendo que as linhagens das amostras dos Reservatórios Salto Grande e Billings foram isoladas por meio da transferência direta dos tricomas da amostra ambiental para os meios de cultura, devido à alta densidade desse gênero de cianobactéria. Já para as amostras com baixa densidade de Anabaena (Rio Piracicaba, Lago da ESALQ/USP (Engenharia), Lagoa do Povoado Nova Aurora e Rio Camarão), uma alíquota da amostra ambiental foi inoculada em meio AA ou BGS e mantida durante 20-30 dias em condições controladas de cultivo (fotoperíodo 14 h claro: 10 h escuro, irradiância 40 µmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura 25  $\pm$  1 °C). Após esse período, os tricomas de interesse foram isolados como descrito anteriormente. Os cultivos foram verificados quanto a presença de contaminantes periodicamente usando microscópio óptico e após o estabelecimento da condição de monocultura as linhagens foram selecionadas para o estudo.

As linhagens isoladas foram mantidas em câmara de crescimento nas condições descritas acima. Além desses isolados, a linhagem *Anabaena flos-aquae* UTCC64 originária do Lago Ontário (Canadá) foi incluída no estudo. Os meios de cultivo para manutenção das linhagens de *Anabaena* foram AA/4 e BG50, com ou sem vitamina B12.

Tabela 7 – Meios de cultura modificados utilizados para isolamento e manutenção das linhagens de *Anabaena* 

		Meio de cultura	
_	BG-11	AA	ASM-1
	(Rippka et al., 1979)	(Allen; Arnon, 1955)	(Gorham et al., 1964)
Macronutriente (mM)			
NaNO <sub>3</sub>	17,65	-	2,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,23	0,76	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0,13
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	0,10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,30	0,20	0,20
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	0,20
$CaCl_2.2H_2O$	0,25	0,10	0,20
NaCl	-	0,856-	
Na <sub>2</sub> EDTA	0,003	0,05403	0,0702
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,19	-	-
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	0,004
Ácido cítrico			
Citrato férrico amoniacal	0,021	-	-
Micronutrientes (µM)			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46,26	9,25	40,1
КОН	-	26,01	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	13,83	-
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	9,15	1,82	7,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,77	0,15	-
$ZnCl_2$	-	-	2,46
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,03	0,08
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,17	-	-
Z			
CuCl <sub>2</sub>	-	-	0,01
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,32	0,06	-
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	-	0,04	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1,61	0,25	-
pH	7,4	7,8	7,5

## 2.6.3 Análise fenotípica dos isolados

Os isolados brasileiros de *Anabaena* pertencentes às diferentes morfoespécies foram avaliados em microscópio óptico (Axioskop 40) equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Germany) de acordo com os seguintes caracteres morfométricos:

- Diâmetro (diamES) e comprimento (comprES) da espira, quando presente;
- Diâmetro e comprimento da célula vegetativa (diamV, comprV), do heterócito (diamHT, comprHT) e do acineto (diamAC, comprAC), quando presente;
- Diâmetro do envelope mucilaginoso/bainha (diamBA) evidenciado por nanquim, para todas as morfoespécies.

No mínimo 30 células de cada cultura foram medidas. Os caracteres morfométricos diacríticos foram analisados estatisticamente visando discriminar os morfotipos de *Anabaena* por meio da análise de componentes principais ("Principal Component Analysis" - PCA) com o programa para windows CANOCO 4.5 (TER BRAAK; ŠMILAUER, 1998). A ordenação dos diagramas foi criada usando o programa CanoDraw (ŠMILAUER, 1992). O conjunto de dados das variáveis morfométricas diacríticas foi plotado em diagrama (Box-plot) como média ± desvio padrão e valores mínimo e máximo usando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

As identificações dos isolados foram realizadas seguindo o Sistema de Classificação de Komárek e Anagnostidis (1989) para a ordem Nostocales e artigos mais recentes (CRONBERG; KOMÁREK, 2004; KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007, 2008; SANT´ANNA et al., 2007; ZAPOMĚLOVÁ et al., 2007, 2008), baseadas nos caracteres morfológicos diacríticos.

# 2.6.4 Análise genética

## 2.6.4.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico total foi feita usando 3 mL de cultura, sendo as células precipitadas (10.000 x g, 15 min, 20 °C) em centrífuga (Hettich, modelo Universal 320 R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi descartado, o pélete liofilizado e o DNA extraído de acordo com a metodologia descrita por Fiore et al. (2000). Alíquotas contendo 5  $\mu$ L do produto

extraído, acrescidas de 2 µL de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo (0,3 µg mL<sup>-1</sup> de gel), em tampão TBE 0,5X (TBE 1X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), à 90V, 40 min, para a verificação da qualidade do produto da extração. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Promega, Madison, WI, EUA – Cat no. G1731). A documentação do gel foi feita por fotodocumentador "Fluor-S<sup>TM</sup> Multilmager" (BioRad, Hercules, CA, EUA). O material foi armazenado a –20 °C.

## 2.6.4.2 Amplificação por PCR dos genes RNAr 16S, rpoC1, rbcL e tufA

As amplificações dos genes RNAr 16S, *rpoC1, rbcL* e *tufA* foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 8. As reações de PCR, com volume final de 25  $\mu$ L, continham: 10  $\eta$ g de DNA, tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8,4), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 1,5 U de Taq polimerase (Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) esterilizada. As amplificações foram feitas em termociclador "Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Iniciador	Sequência (5'-3')	Região alvo – tamanho (pb)	Referência	
27F1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	RNAr 16S -	Neilan et al.	
1494Rc	TACGGCTACCTTGTTACGAC	1467	(1997)	
rpoC1-1	GAGCTCYAWNACCATCCAYTCNGG	<i>rpoC1</i> - 660	Palenik e	
<i>rpoC1-</i> T	GGTACCNAAYGGNSARRTNGTTGG		Haselkorn (1992)	
rbcLF	GACTTCACCAAAGAYGACGAAAACAT	<i>rbcL</i> - 750	Fewer et al.	
rbcLR	GAACTCGAACTTRATYTCTTTCCA		(2007)	
TF	CACGTDGAYTGYCCNGGNCACGCTG	tufA - 830	Fewer et al.	
TR	ATNCGRTCNCCDGGCATAACCATTTC		(2007)	

 Tabela 8 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de genes de interesse

As condições para amplificação do RNAr 16S foram: 95°C/3 min, 30 ciclos 94°C/10 s, 50°C/20 s, 72°C/1 min e extensão final a 72°C/7 min (NEILAN et al., 1997). O gene *rpoC1* foi amplificado por: 95°C/10 min, 35 ciclos 92°C/1,5 min, 58°C/1 min, 72°C/2 min (WILSON et al., 2000) e extensão final a 72°C/10 min. Para os genes *tufA* e *rbc1*, as condições de reação foram: 95°C/3 min, 30 ciclos 94°C/30 s, 56°C 30 s, 72°C/1 min e extensão final a 72°C/10 min (FEWER et al., 2007). A verificação do tamanho e quantificação dos "amplicons" foi feita em corrida eletroforética como descrito acima (item 2.6.4.1), utilizando como padrão de tamanho e massa molecular os marcadores 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

## 2.6.4.3 Clonagem, transformação e sequenciamento

Após amplificação, os fragmentos dos genes RNAr 16S, *rpoC1, rbcL* e *tufA* foram clonados utilizando o *kit* "pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I" (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Os vetores foram transformados em células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O volume total da ligação (10 µL) e a suspensão de células quimiocompetentes (50 µL) foram misturadas e

mantidas no gelo por 30 min. Posteriormente, o microtubo foi transferido para o banho-maria a 42 °C por 60 s e novamente incubado no gelo por 2 min. Posteriormente, 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi adicionado à mistura e incubado a 37 °C por 90 min, sob agitação constante de 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (20 g L<sup>-1</sup> LB Broth, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), solidificado com ágar 1,5%, acrescido de ampicilina (USB Corporation) e X-Gal (Invitrogen), ambos nas concentrações finais de 100 µg mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Os clones transformados foram selecionados a partir de colônias com coloração branca, as quais foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) a 37 °C durante 12 horas, sob agitação constante de 200 rpm. A presença dos insertos nos clones transformados foi confirmada por meio de PCR de colônia utilizando os iniciadores M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') do vetor. As reações de PCR continham: 1 µL de suspensão de células (clone), tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8,4), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 1,5 U de Taq polimerase (Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase, Invitrogen) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. As reações foram feitas em termociclador "Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700" (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94 °C/5 min, 30 ciclos 95 °C/20 s, 50 °C/15 s e 60 °C/1 min.

Após a confirmação dos insertos por eletroforese em gel de agarose 1% (item 2.6.4.1), o DNA plasmidial foi extraído pelo método de hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Em microtubo de 1,5 mL, 3,0 mL de cultura foram concentrados (10.000 x g por 30 s) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 100  $\mu$ L de solução I (2,5 mL Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,0 mL EDTA 0,5 M, 0,9 g glicose e água ultrapura para volume final de 100 mL) gelada. Em seguida, 200  $\mu$ L de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %, na proporção 1:1) foram adicionados ao microtubo e os volumes misturados por inversão. Após 5 minutos de incubação no gelo, 150  $\mu$ L da solução III (60 mL Acetato de Potássio 5 M; 11,5 mL Ácido Acético Glacial e água ultrapura para volume final de 100 mL) foram adicionados. Depois de homogeneizado gentilmente por inversão, o material foi incubado no gelo por mais 5 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min e o sobrenadante transferido para novo microtubo, sendo tratado com RNAse (10 mg mL<sup>-1</sup>) a 37 °C por 30 min. Decorrido esse período, adicionou-se 1 mL de etanol 100% (gelado) e após centrifugação (10.000 x g, 15 min), o precipitado foi lavado com 750  $\mu$ L de etanol 75% (gelado) e novamente centrifugado (12.000 x g, 5 min). Depois de secado, o pélete foi ressuspendido em 30  $\mu$ L de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada. Os plasmídeos extraídos foram armazenados a –20 °C.

Os insertos clonados foram sequenciados utilizando o *kit* "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial, 0,2 mM de cada iniciador, 1 μL de "Sequencing Reagent Premix", 2 μL de tampão "Save Money" 2,5 X (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada para volume final de 10 μL. Como iniciadores externos foram utilizados o promotor T7 (5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3') e o SP6 (5' – ATTTAGGTGACACTATAGAA – 3') do vetor. Para o RNAr 16S, foram utilizados 3 conjuntos de iniciadores internos, 341-357F, 357-341R, 685-704F, 704-685R, 1099-1114F e 1114-1099R (LANE, 1991). As condições da PCR foram: 25 ciclos 95 °C/20 s, 50 °C/15 s e 60 °C/1 min. Após a reação, as amostras foram precipitadas de acordo com instruções do *kit* "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing" e submetidas ao sequenciamento no sequenciador capilar "ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems). Os dados foram coletados e processados pelo programa "ABI PRISM<sup>®</sup> DNA Sequencing – Analysis Software", versão 3.7 (Applied Biosystems). As sequências geradas estão no Apêndice 1.

As sequências foram processadas ("contig") e a qualidade aferida por meio do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) em ambiente operacional Linux. As sequências geradas estão apresentadas no Apêndice 1.

## 2.6.4.4 Análise filogenética

A fim de aumentar a amostragem dos táxons, mais sequências relacionadas aos genes estudados foram obtidas do GenBank do NCBI ("National Center for Biotechnology Information" - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cada gene foi alinhado independentemente. O alinhamento do RNAr 16S foi realizado usando o programa R-Coffee (www.tcofee.org) (MORETTI et al., 2008). Alinhamentos múltiplos foram feitos para os genes codificantes de proteínas no programa T-Coffee do EBI ("European Bioinformatics Institute") com valores de

57

parâmetro padrão (www.ebi.ac.uk/t-coffee) (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente.

A análise filogenética das sequências de RNAr 16S foi realizada usando os métodos da distância ("Neighbor-Joining" - NJ) e máxima parcimônia ("maximum parsimony" – MP). Para os genes concatenados (RNAr 16S, *rpoC1, tufA* e *rbcL*), após montagem de um conjunto de dados de 3.617 pb, foi utilizado também o método de máxima verossimilhança ("Maximum Likelihood" - ML). A topologia das árvores NJ foi estimada no MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetro de evolução de sequência e repetições de 1000 reamostragens para acessar a confiabilidade dos nós. A escolha do modelo utilizado na ML foi conduzido em HyPhy ("Hypothesis Testing Using Phylogenies") (KOSAKOVSKY POND; FROST; MUSE, 2005). O GTR+G+I foi o melhor ajuste para os dados, com 1% de significância. A árvore ML foi estimada no PhyML 3.0 (GUINDON; GASCUEL, 2003). A significância topológica foi medida pelo teste de razão de verossimilhança aproximado ("approximate likelihood ratio test" - aLRT) para os ramos (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006) nas árvores ML. Para análise concatenada, a cada partição do gene parâmetros evolutivos próprios foram usados. O algoritmo MCMC também foi utilizado.

## 2.6.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Na metodologia de DGGE, além das linhagens de *Anabaena* obtidas neste estudo, também foram utilizadas linhagens de outras ordens do grupo de cianobactérias (Tabela 9) mantidas na coleção de cultura do laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP), ou obtidas como material liofilizado.

Ordem	Morfoespécies/Linhagem	Origem	Meio de cultura
Chroococcales	<i>Microcystis wesenbergii</i> SPC774 <sup>(1)</sup>	Lago de Peixes, Ribeirão Preto – SP	ASM-1
	<i>Microcystis novacekii</i> SPC775 <sup>(1)</sup>	Reservatório Billings Riacho Grande – SP	ASM-1
	<i>Microcystis wesenbergii</i> SPC855 <sup>(1)</sup>	Pesqueiro 4, Mairiporã - SP	ASM-1
Oscillatoriales	Phormidium sp. CENA76	Aquário de Peixe	BGN
	Pseudanabaena galeata SPC722	Reservatório Billings - SP	BGN
	Pseudanabaena mucicola SPC782	Reservatório Billings - SP	BGN
Nostocales	Anabaena flos-aquae UTCC64	Lago Ontário, Canadá	AA/4
	<i>Cylindrospermum</i> sp. CENA33	Várzea Manacapuru - AM	AA/4
	<i>Nostoc commune</i> UTEX584 (CENA74)	University of Texas Culture Collection, EUA	AA/4
Stigonematales	Fischerella sp. CENA19	Várzea Mari-Mari - AM	AA/4
	Mastigocladus sp. RAL	Universidade de Dundee, Escócia	BGS

Tabela 9 - Linhagens de cianobactérias pertencentes às diferentes ordens e local de origem, utilizadas nas análises de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

<sup>(1)</sup> Material cedido pela Dra. Célia Leite Sant'Anna (Instituto de Botânica - SMA, São Paulo, SP).
 <sup>(2)</sup> Material cedido pelo Dr. João Sarkis Yunes (Universidade Federal do Rio Grande, FURG, RS).

O gene que codifica para o RNAr 16S foi amplificado conforme descrito previamente (item 2.6.4.2). Em seguida, realizou-se uma "nested"-PCR utilizando o iniciador CYA359F que foi acrescido de rico GC extremidade 5' (5' um grampo na em 

GGG – 3') e os iniciadores CYA781R(a) (5' – GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT – 3') e CYA781R(b) (5' – GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT – 3') (NÜBEL; GARCIA-PICHEL; MUYZER, 1997), em proporção equimolar. As condições da PCR foram: 95°C/10 min, 20 ciclos de 92 °C/90 s, 68 ou 65 °C (com decréscimo de 0,5 °C por ciclo)/60 s, 72 °C/2 min, seguidos de 5 ciclos de 92 °C/90 s, 58 ou 55 °C/60 s e 72 °C/2 min, com extensão final a 72 °C/10 min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita em corrida eletroforética como descrito no item 2.6.4.1, utilizando padrão de tamanho 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% e gradiente desnaturante variando de 35-55% (100% de desnaturação sendo 7M de uréia e 40% de formamida deionizada). A eletroforese foi realizada a 100V, por 15h, 60 °C em um equipamento INGENYphorU<sup>®</sup> em tampão TAE 0,5X (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001 M, pH 7,6). Todos os géis foram corados com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) e documentados em transluminador de luz branca (VariQuest 100, FOTODYNE Incorporated, Hartland, WI, EUA) com máquina fotográfica digital (CASIO, EX-Z57, Tóquio, Japão).

Após a análise do gel de DGGE as bandas de interesse foram selecionadas e excisadas utilizando lâminas de bisturi. Essas bandas foram eluídas em água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada por 12h em estufa a 38°C e reamplificadas usando os iniciadores CYA359F sem o grampo GC e 781Ra/b, nas condições descritas acima. Os produtos reamplificados foram usados na PCR de sequenciamento (item 2.6.4.3) com o iniciador CYA359F. As sequências resultantes (Apêndice 2) foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/), utilizando a ferramenta Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Após isso, árvores filogenéticas utilizando os métodos NJ e MP foram realizadas (item 2.6.4.4).

### 2.7 Resultados e Discussão

#### 2.7.1 Obtenção das linhagens de Anabaena

As duas abordagens utilizadas para o isolamento de espécies de *Anabaena* propiciaram o cultivo de 43 linhagens (Tabelas 10 e 11). Na análise microscópica preliminar das amostras ambientais, os tricomas foram designados, segundo a morfologia típica das morfoespécies, como *A. circinalis* Rabenhorst ex Bornet et Flahault e *A. crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg, facilmente diferenciadas na natureza, e outros organismos identificados como *Anabaena/Nostoc* sp.

O isolamento direto dos tricomas da amostra ambiental do Reservatório Salto Grande, usando os meios de cultura ASM-1 e BGN, este último também na variante com vitamina B12, não favoreceu o crescimento dos organismos, apesar do meio ASM-1 ser indicado para isolamento de cianobactérias planctônicas (RIPPKA, 1988). Por outro lado, o meio BG-11 que possibilita o crescimento de uma maior variedade de cianobactérias, incluindo as formas terrestres (RIPPKA, 1988), proporcionou o crescimento de *Anabaena* apenas nas variações sem nitrogênio (BGS) e com NaNO<sub>3</sub> na concentração 8,82 mM (BG50). É provável que a alta concentração de nitrato no meio BG-11 (CASTENHOLZ, 1988; SHIMAMORI; ABE; SASAHARA, 1953) tenha inibido o crescimento dos tricomas de *Anabaena*.

Observou-se que as linhagens de *A. crassa*, independente do meio utilizado, não tiveram o seu desenvolvimento alterado em decorrência da presença de vitamina B12. De forma que, no meio BG50, 60% dos tricomas isolados de *A. crassa* cresceram em meio sem vitamina e 50% em meio com vitamina B12. Entretanto, o contrário aconteceu para o crescimento das linhagens de *A. circinalis*, onde houve o favorecimento do crescimento nos meios BGS e BG50 acrescidos de vitamina B12. Currier, Haury e Wolk (1977) verificaram que mutantes auxotróficos de *A. variabilis* necessitavam de uma fonte inorgânica de nitrogênio e adição de vitamina B12 ao meio de cultura para um melhor desenvolvimento das linhagens.

Tanto para *A. circinalis* como para *A. crassa* verificou-se que o meio BG50 proporcionou crescimento mais rápido dos tricomas isolados, decorrendo um período de cerca de 20 dias, enquanto que no meio BGS a visualização macroscópica da cianobactéria ocorreu após aproximadamente 30 dias.

Meio de cultura <sup>(1)</sup>	Origem	Tubos com crescimento/ tricomas inoculados (%)	Tricoma isolado (identificação prévia)	Material em cultivo
ASM-1	Salto Grande 06/09/2007	0/9 (-)	A. circinalis	-
		0/10 (-)	A. crassa	-
		0/2	Anabaena sp.	-
BGN		0/5 (-)	A. circinalis	-
		0/5 (-)	A. crassa	-
BGN + B12		0/5 (-)	A. circinalis	-
		0/5 (-)	A. crassa	-
BGS		0/5 (-)	A circinalis	-
200		2/5 (10%)	A. crassa	A. crassa CENA194, CENA195
BGS + B12		3/5 (60%)	A. circinalis	A. circinalis CENA189, CENA190, CENA191
		3/5 (60%)	A. crassa	A. crassa CENA196, CENA197, CENA198
BG50		0/5 (-)	A. circinalis	-
		3/5 (60%)	A. crassa	A. crassa CENA199, CENA200, CENA201
BG50 + B12		2/4 (50%)	A. circinalis	A. circinalis CENA192, CENA193
		3/6 (50%)	A. crassa	A. crassa CENA202, CENA203, CENA204 <sup>(2)</sup>
AA/4 + B12	Billings 26/05/2008	0/9 (-)	A. circinalis	-
	20,00,2000	4/11 (36,4%)	A. crassa	A. crassa CENA205, CENA206, CENA207
		1/6 (16,7%)	Anabaena sp1	A. cf. fallax CENA208
		0/9 (-)	Anabaena sp2 (An. planctonica ?)	-
		0/4 (-)	Anabaena sp3	-

Tabela 10 - Linhagens isoladas pela transferência direta dos tricomas da amostra ambiental para os tubos de ensaio nos diferentes meios de cultura, % de crescimento dos isolados e material mantido em cultivo

<sup>(1)</sup> Meio BG-11 com diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub>: BGN (17,65 mM), BG50 (8,82 mM) e BGS – sem NaNO<sub>3</sub>. B12: vitamina B12 0,015 μM. <sup>(2)</sup> Linhagem CENA 204 não foi utilizado em análise posterior. <sup>(3)</sup> Apenas três linhagens foram mantidas na coleção de culturas, sendo a quarta descartada.

Tabela 11 - Linhagens isoladas pela transferência dos tricomas para os tubos de ensaio nos diferentes meios de cultura somente após crescimento do material (inóculo da amostra ambiental) em cultura por cerca de 20 dias, % de crescimento dos isolados e material mantido em cultivo.

Meio de cultura <sup>(1)</sup>	Origem <sup>(2)</sup>	Tubos com crescimento/ tricomas inoculados (%)	Tricoma isolado (identificação prévia)	Material em cultivo
BG50 + B12	Rio Piracicaba 27/08/2008 Inóculo em meio AA/4	0/5 (-)	A. circinalis	-
		4/4 (100%)	Anabaena/Nostoc (?)	Anabaena/Nostoc (?)
BG50 + B12	ESALQ 13/10/2008 Inóculo em meio AA/4	2/9 (22,2%)	Anabaena sp. (A. planctonica ?)	A. planctonica CENA209, CENA210
AA/4 + B12	Lagoa Povoado Nova Aurora 07/11/2008 Inóculo em meio AA/4	5/6 (83,3%)	Anabaena sp.	<i>A aphanizomenoides</i> CENA187, CENA188 (4)
AA/4 + B12	Rio Camarão 07/11/2008 Inóculo em meio AA/4	4/8 (50%)	<i>Anabaena</i> sp. – sem aerótopos	<i>A.</i> cf. <i>oscillarioides</i> (?)
BGS + B12	Rio Camarão 07/11/2008 Inóculo em meio BGS	7/7 (100%)	<i>Anabaena</i> sp. – sem aerótopos	A. cf. oscillarioides (?)

<sup>(1)</sup> Meio BG-11 com diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub>: BGN (17,65 mM), BG50 (8,82 mM) e BGS – sem NaNO<sub>3</sub>; B12: vitamina B12 0,015 μM.

<sup>(2)</sup> Para as amostras ESALQ e Rio Piracicaba (São Paulo) foram utilizados apenas o meio AA/4. Para as amostras Lagoa Povoado Nova Aurora e Rio Camarão (Ceará) foram utilizados os meios AA/4 e BGS. Não ocorreu crescimento de tricomas de Anabaena no inoculo do meio BGS.

<sup>(3)</sup> Linhagens sem identificação conclusiva.

<sup>(4)</sup> Linhagens restantes mantidas no Banco, porém sem designação CENA.

<sup>(5)</sup> Linhagens em processo de purificação pois estão misturadas com cianobactéria cocóide.

Após a observação de crescimento dos isolados em BGS e BG50 (Tabela 10), com ou sem vitamina B12, realizou-se um primeiro repique em novo meio de cultura correspondente. Contudo, mesmo após 20 dias de crescimento, as linhagens do meio BGS não alcançaram um desenvolvimento satisfatório, sendo constatado um processo de senescência das células. Assim, todas as culturas foram novamente repicadas em meio BG50 + B12 e também em meio AA/4. O meio de cultura AA/4 não foi utilizado no isolamento inicial das linhagens do Reservatório Salto Grande na abordagem de transferência direta dos tricomas, mas constatou-se que ele propiciou boas condições de crescimento e, então, foi adotado para manutenção de todas as linhagens.

O isolamento de linhagens de *Anabaena* da amostra do Reservatório Billings (Tabela 10), foi realizado no meio de cultura AA/4, indicado para cianobactérias heterocitadas (ALLEN; ARNON, 1955), acrescido de vitamina B12. Como a adição de vitamina B12 favoreceu o crescimento das linhagens de Salto Grande, logo, também foi testada no isolamento de *Anabaena* do Reservatório Billings. Entretanto, o meio de cultura selecionado desfavoreceu o crescimento de *A. circinalis* e constatou-se crescimento de apenas 36,4% de tricomas de *A. crassa*. Além disso, outras morfoespécies (sp1, sp2 e sp3 – Tabela 10) apresentaram pouco crescimento e destas, somente a linhagem *Anabaena* sp1 (designada posteriormente como *A. cf. fallax* Komárek et Komárková-Legnerová CENA208) foi mantida em cultivo. As demais linhagens *Anabaena* sp2 (possível *A. planctonica*) e *Anabaena* sp3, apesar dos tricomas terem sido inoculados em AA/4+B12, não foram recuperadas. Portanto, a partir das observações realizadas pode-se inferir que *A. circinalis* tem um requerimento nutricional mais restrito crescendo apenas em meio BGS e/ou BG50 com vitamina B12, enquanto que para a espécie *A. crassa* uma maior variedade de meios de cultura pode ser utilizada em seu isolamento (BGS, BGS+B12, BG50, BG50+B12, AA/4+B12).

A abordagem utilizada para o isolamento de linhagens de *Anabaena* das amostras coletadas em ambos os reservatórios (Salto Grande e Billings), assim como os meios de cultura testados, propiciaram principalmente o crescimento de *A. crassa* e *A. circinalis*. Essas amostras de água apresentavam grande concentração de *Microcystis* spp. e de *Anabaena* spp., sendo constatada dominância das morfoespécies de *A. circinalis* e *A. crassa* (dados não mostrados). Estudos anteriores, realizados no Reservatório Salto Grande, relatam a presença das morfoespécies *A. circinalis*, *A. crassa*, *Anabaena* cf. *smithii* e *A. planctonica* (AGUJARO, 2007;

DEBERDT, 2002; TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004). Segundo o levantamento feito na Praia dos Namorados do Reservatório Salto Grande, *A. circinalis* atingiu valor de 358 orgs mL<sup>-1</sup> e *A. crassa* 3455 orgs mL<sup>-1</sup> em amostras coletadas em agosto de 2005 (AGUJARO, 2007). No presente estudo, a amostra coletada na Praia dos Namorados, em setembro de 2007, foi retirada de uma floração de cianobactérias composta por *Anabaena, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Microcystis, Planktothrix, Pseudanabaena, Radiocystis e Sphaerocavum* (LORENZI, 2008). No Reservatório Billings, a presença das morfoespécies *A. circinalis* e *A. spiroides* foram relatadas anteriomente (SANT'ANNA et al., 2007), enquanto, neste estudo, as morfoespécies *A. crassa* e *A. cf. fallax* foram isoladas desse reservatório. A dominância de certas morfoespécies no ambiente, no caso *A. circinalis* e *A. crassa*, pode estar relacionada às condições ambientais como composição nutricional, pH e temperatura (AGUJARO, 2007). Este dado vem a reforçar a idéia que *A. crassa* tenha um requerimento nutricional menos restritivo que *A. circinalis*, e suficiente para proporcionar maiores densidades na natureza que *A. cf. fallax*, presente em baixa densidade na amostra do Reservatório Billings.

A tentativa de cultivo de *Anabaena* do Rio Piracicaba e do Lago da ESALQ/USP (Tabela 11) foi feita por meio da inoculação de alíquotas das amostras coletadas em meio de cultura AA/4 (ALLEN; ARNON, 1955), o qual é indicado para cianobactérias heterocitadas. Embora tenha sido observado crescimento celular nesse meio depois de aproximadamente 20 dias, tricomas de *A. circinalis* observados nos tubos contendo amostras do Rio Piracicaba foram transferidos para o meio BG50+B12, uma vez que este favoreceu o crescimento de *A. circinalis* e *A. crassa* do Reservatório Salto Grande (Tabela 10). Porém, os cinco tricomas transferidos não se desenvolveram nessas condições e, portanto, não se obteve isolados do Rio Piracicaba (Tabela 11). Contudo, essa metodologia de isolamento propiciou o cultivo de duas linhagens de *A. planctonica* (CENA209, CENA210) da amostra proveniente do Lago da ESALQ/USP (Tabela 11).

As espécies *A. aphanizomenoides* e *A. cf. oscillarioides* foram isoladas das amostras provenientes do nordeste do Brasil (Lagoa do Povoado Nova Aurora e do Rio Camarão, Canindé, CE) (Tabela 11). Para a obtenção desses isolados, alíquotas das amostras coletadas foram inoculadas em dois meios de cultura, AA/4 e BGS. Após o crescimento, os tricomas foram isolados no meio correspondente acrescido de vitamina B12. Verificou-se alta percentagem de

crescimento do material isolado, sendo 83,3% para as linhagens de *A. aphanizomenoides* no meio AA/4+B12, 50% e 100% para *A.* cf. *oscillarioides* nos meios AA/4+B12 e BGS+B12, respectivamente. Cabe ressaltar que *Anabaena* sp. da Lagoa do Povoado de Nova Aurora, posteriormente confirmada como *A. aphanizomenoides*, não cresceu no meio BGS+B12. Isso indica que cada espécie de *Anabaena* tem uma necessidade nutricional distinta, como verificado anteriormente para *A. circinalis*. O meio de cultura AA/4, quando usado como fonte inicial para o crescimento dos tricomas das amostras ambientais, propiciou o aumento de biomassa de *Anabaena* em quatro amostras analisadas (Rio Piracicaba, Lago da ESALQ/USP (Engenharia), Lagoa do Povoado e Rio Camarão) (Tabela 11). Essas espécies recuperadas do ambiente da caatinga estão sendo mantidas sob cultivo, sendo este o primeiro relato de isolamento de cianobactérias desses locais amostrados no nordeste brasileiro.

Diante da experiência adquirida com o isolamento de *Anabaena* em diferentes ambientes, sugere-se para trabalhos futuros que o meio BGN seja evitado, pois a alta concentração de nitrogênio pode inibir o crescimento de *A. circinalis* e *A. crassa*. Além disso, apesar de indicado para isolamento de cianobactérias heterocitadas, evitando a seleção de mutantes que não formam heterócito (RIPPKA, 1988), o meio de cultura BGS proporcionou baixa taxa de crescimento. Sugere-se, portanto, usar o meio BG50. Quanto à estratégia para o isolamento, indica-se a inoculação de uma alíquota da amostra ambiental em meio de cultura para aumento de biomassa (indicado para material com baixa densidade do organismo alvo). Nesse estudo, o meio AA/4 foi utilizado com sucesso; no entanto algumas morfoespécies podem necessitar de vitamina B12 (RIPPKA et, al., 1979), por exemplo *A. circinalis*. Deve-se também evitar ao máximo a mudança de meio de cultura nas etapas iniciais de isolamento.

# 2.7.2 Análise morfológica

As análises morfológicas foram realizadas em 24 linhagens das 43 mantidas em cultivo. As morfoespécies avaliadas foram *Anabaena aphanizomeoides* Forti, *A. circinalis* Rabenhorst ex Bornet et Flahault, *A. crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg, *A. cf. fallax* Komárek et Komárková-Legnerová e *A. planctonica* Brunnthaler. Além das descrições das linhagens analisadas, a caracterização complementar do material encontra-se nas Tabelas 12-18 e

Tabela 12 - Característ icas morfométricas das células vegetativa, heterócito, acineto e espira das linhagens de Anabaena (valores em
μm, mínimo-máximo)

morfoespécie			vegetativa			heterócito			acineto			espira		bainha
		С	D	R C/D	С	D	R C/D	С	D	R C/D	С	D	R D/C	D
A. aphanizomenoides	<b>CENA 188</b>	2,6 - 6,0	4,3 - 6,2	0,5 - 1,1	5,0 - 13,2	4,2 - 8,5	0,9 - 1,7	8,6 - 14,3	8,1 - 12,3	1,0 - 1,3	-		-	0,5 - 1,6
A. circinalis	CENA189	4,9 - 7,8	6,0 - 8,6	0,7 - 1,0	5,9 - 9,3	6,7 - 9,3	0,7 - 1,1	13,8 - 25,1	7,1 - 14,1	1,2 - 3,0	11,3 - 81,3	41,0 - 150,7	1,5 - 6,9	2,3 - 4,0
	CENA190	4,7 - 7,5	6,1 - 7,9	0,6 - 1,0	6,2 - 9,5	6,9 - 10,2	0,8 - 1,2	Ν	Ν	Ν	10,8 - 34,1	40,1 - 80,5	1,9 - 6,2	Ν
	CENA192	4,6 - 8,2	6,4 - 8,5	0,7 - 1,1	7,1 - 10,7	8,2 - 11,5	0,8 - 1,0	Ν	Ν	Ν	12,7 - 37,9	53,1 - 92,1	2,1 - 5,2	1,1 - 6,2
	CENA193	4,3 - 8,5	6,0 - 8,2	0,7 - 1,2	7,1 - 9,7	7,4 - 10,2	0,9 - 1,0	12,0 - 38,1	9,7 - 18,0	1,2 - 2,6	10,8 - 46,3	57,2 - 97,6	1,7 - 7,6	0,7 - 3,0
A. crassa	CENA194	6,8 - 11,8	8,2 - 11,6	0,8 - 1,2	9,2 - 12,6	8,7 - 12,6	0,9 - 1,2	18,3 - 43,0	8,8 - 15,8	1,8 - 3,5	37,4 - 68,3	40,1 - 74,3	0,8 - 1,3	Ν
	CENA195	6,0 - 11,2	7,8 - 10,7	0,6 - 1,1	8,3 - 12,5	8,3 - 12,5	0,9 - 1,2	16,0 - 37,4	8,6 - 18,7	1,6 - 3,1	34,1 - 76,5	37,1 - 72,0	0,5 - 1,8	12,9 - 20,8
	CENA196	6,6 - 11,2	7,9 - 11,7	0,7 - 1,2	8,3 - 12,3	8,5 - 12,3	0,7 - 1,1	22,2 - 42,3	10,5 - 18,2	1,6 - 3,1	42,3 - 61,8	36,9 - 61,8	0,7 - 1,1	12,5 - 22,5
	CENA197	5,8 - 10,8	7,0 - 10,4	0,7 - 1,2	9,1 - 13,5	9,4 - 12,0	0,9 - 1,1	22,8 - 40,2	8,5 - 18,4	1,8-3,8	40,3 - 71,0	34,6 - 70,5	0,7 - 1,7	12,5 - 20,6
	CENA198	5,8 - 11,1	8,7 - 11,6	0,5 - 1,0	9,7 - 13,6	10,0 - 14,8	0,8 - 1,1	19,2 - 41,2	10,6 - 18,9	1,5 - 3,0	49,1 - 101,9	45,0 - 79,9	0,6 - 1,3	13,3 - 22,5
	CENA199	7,3 - 11,2	9,2 - 11,5	0,7 - 1,1	8,8 - 11,9	9,5 - 12,6	0,8 - 1,0	19,6 - 33,3	10,7 - 16,9	1,3 - 2,9	31,7 - 87,8	33,1 - 84,0	0,6 - 1,8	5,7 - 24,4
	CENA200	7,3 - 10,8	8,9 - 11,7	0,7 - 1,1	9,5 - 12,4	9,3 - 12,8	0,9 - 1,1	22,7 - 41,5	11,5 - 21,6	1,3 - 2,9	48,5 - 90,0	41,7 - 67,8	0,6 - 1,4	9,2 - 18,7
	CENA201	5,7 - 10,8	7,7 - 10,9	0,6 - 1,2	8,7 - 12,4	9,5 - 11,6	0,8 - 1,1	16,0 - 37,4	8,7 - 18,2	1,4 - 3,3	32,8 - 89,2	27,6 - 83,3	0,5 - 1,6	12,3 - 23,6
	CENA202	5,4 - 11,6	8,9 - 11,4	0,6 - 1,1	9,0 - 12,2	8,8 - 11,7	0,9 - 1,1	18,2 - 41,1	8,8 - 15,4	1,6 - 3,2	36,6 - 86,1	36,6 - 76,4	0,6 - 1,3	22,6 - 16,1
	CENA206	5,1 - 9,1	7,8 - 10,2	0,5 - 1,0	7,5 - 11,5	7,7 - 10,9	0,9 - 1,2	17,5 - 31,1	9,9 - 15,3	1,4 - 2,7	24,1 - 43,9	22,4 - 46,1	0,8 - 1,3	10,2 - 16,1
A. cf. fallax	CENA208	3,1 - 6,3	2,0 - 4,2	0,9 - 2,2	4,6 - 7,5	3,7 - 5,7	1,1 - 1,8	-		-	8,9 - 21,3	12,0 - 21,7	0,8 - 2,0	0,7 - 3,1
A. planctonica	CENA209	4,4 - 7,1	6,4 - 8,3	0,5 - 1,0	7,4 - 9,4	7,1 - 9,9	0,9 - 1,1	13,4 - 21,2	9,2 - 15,3	1,2 - 2,2	-		-	1,6 - 4,2
	CENA210	3,0 - 7,0	5,0 - 8,5	0,5 - 0,9	5,0 - 9,2	6,8 - 9,5	0,6 - 1,0	12,3 - 24,5	9,7 -14,1	1,1 - 2,1	-		-	1,9 - 7,5

Nota: C – comprimento; D – diâmetro; R – razão; N – não medido.

		vegetativa				heterocito			acineto			espira	bainha	
		С	D	R C/D	С	D	R C/D	С	D	R C/D	С	D	R D/C	D
Aph anhanizomenoides	<b>CENA 188</b>	3,8 (0,8)	5,0 (0,5)	0,8 (0,2)	7,8 (2,2)	6,5 (1,3)	1,2 (0,2)	11,2 (1,2)	9,8 (1,1)	1,1(0,1)	-	-	-	1,0 (0,3)
A. circinalis	CENA189	6,1 (0,7)	7,2 (0,6)	0,9 (0,1)	7,4 (0,8)	8,1 (0,7)	0,9 (0,1)	17,7 (3,2)	11,5 (1,6)	1,6 (0,4)	29,5 (15,3)	78,7 (24,6)	3,1 (1,2)	2,9 (0,4)
	CENA190	6,0 (0,8)	7,1 (0,5)	0,8 (0,1)	7,7 (0,8)	8,3 (0,7)	0,9 (0,1)	Ν	Ν	Ν	17,7 (4,9)	54,9 (10,0)	3,3 (0,9)	Ν
	CENA192	6,5 (0,8)	7,4 (0,6)	0,9 (0,1)	8,7 (1,0)	9,8 (0,9)	0,9 (0,1)	Ν	Ν	Ν	19,7 (4,8)	69,9 (10,8)	3,7 (0,8)	3,3 (1,1)
	CENA193	6,7 (0,9)	7,1 (0,5)	1,0 (0,1)	8,0 (0,6)	8,3 (0,6)	1,0 (0,0)	25,3 (6,2)	13,6 (2,1)	1,9 (0,4)	24,7 (8,6)	74,6 (8,5)	3,4 (1,5)	1,6 (0,5)
A. crassa	CENA194	8,6 (1,2)	9,3 (0,7)	0,9 (0,1)	10,6 (0,9)	10,6 (0,9)	1,0 (0,1)	30,5 (6,0)	12,0 (1,8)	2,6 (0,5)	47,7 (8,5)	51,0 (8,6)	1,1 (0,1)	NO
	CENA195	8,8 (1,3)	9,4 (0,7)	0,9 (0,1)	10,6 (1,1)	10,4 (0,9)	1,0 (0,1)	26,2 (5,6)	11,6 (2,1)	2,3 (0,4)	52,6 (12,8)	54,6 (10,6)	1,1 (0,2)	16,3 (2,3)
	CENA196	9,1 (1,0)	10,1 (0,8)	0,9 (0,1)	10,1 (1,0)	10,6 (1,0)	1,0 (0,1)	29,7 (4,9)	13,7 (2,1)	2,2 (0,5)	51,2 (5,9)	48,2 (5,4)	0,9 (0,1)	16,7 (2,4)
	CENA197	8,1 (1,3)	8,9 (0,7)	0,9 (0,1)	10,6 (0,9)	10,4 (0,7)	1,0 (0,1)	31,2 (4,6)	12,8 (2,5)	2,5 (0,5)	52,3 (8,3)	52,1 (9,6)	1,0 (0,2)	16,5 (2,3)
	CENA198	8,6 (1,2)	10,1 (0,8)	0,8 (0,1)	11,6 (1,0)	11,6 (1,0)	1,0 (0,1)	30,8 (4,7)	14,3 (1,9)	2,2 (0,4)	67,3 (11,9)	57,0 (8,3)	0,9 (0,2)	18,3 (2,6)
	CENA199	9,1 (1,2)	10,3 (0,5)	0,9 (0,1)	10,5 (0,8)	11,0 (0,8)	0,9 (0,0)	27,6 (3,7)	14,2 (1,5)	2,0 (0,3)	51,5 (14,6)	54,4 (10,6)	1,1 (0,3)	15,2 (4,5)
	CENA200	9,2 (1,0)	10,4 (0,8)	0,9 (0,1)	10,8 (0,8)	11,0 (0,8)	1,0 (0,0)	29,1 (4,1)	15,4 (2,5)	1,9 (0,3)	69,5 (11,4)	50,3 (7,6)	0,7 (0,2)	14,8 (1,9)
	CENA201	8,0 (1,4)	9,4 (0,7)	0,9 (0,1)	10,1 (0,8)	10,6 (0,6)	1,0 (0,1)	26,0 (5,8)	12,5 (2,3)	2,1 (0,5)	53,4 (12,7)	49,5 (12,6)	1,0 (0,4)	17,1 (2,4)
	CENA202	8,5 (1,5)	10,0 (0,7)	0,8 (0,1)	10,6 (0,8)	10,6 (0,7)	1,0 (0,0)	27,7 (5,5)	11,7 (1,7)	2,4 (0,4)	60,4 (12,1)	53,6 (9,6)	0,9 (0,2)	19,5 (1,7)
	CENA206	7,1 (1,2)	9,1 (0,6)	0,8 (0,1)	9,2 (1,0)	9,0 (0,7)	1,0 (0,1)	23,8 (3,5)	12,5 (1,4)	1,9 (0,3)	33,2 (5,0)	31,9 (4,2)	1,0 (0,1)	13,2 (1,6)
A.cf. fallax	CENA208	4,4 (1,0)	3,2 (0,5)	1,4 (0,4)	6,0 (0,7)	4,6 (0,5)	1,3 (0,2)	-	-	-	13,3 (3,4)	17,0 (2,3)	1,4 (0,4)	1,7 (0,5)
A. planctonica	CENA209	5,5 (0,7)	7,2 (0,5)	0,8 (0,1)	8,3 (0,5)	8,5 (0,6)	1,0 (0,1)	18,0 (2,0)	11,9 (1,8)	1,5 (0,3)	-	-	-	2,5 (0,6)
	CENA210	5,0(1,1)	7,1 (0,8)	0,7 (0,1)	7,7(1,1)	8,3(0,9)	0,9 (0,1)	17,1 (3,2)	11,5 (1,2)	1,5 (0,2)	-	-	-	3,8 (1,8)

Tabela 13 - Características morfométricas das células vegetativa, heterócito, acineto e espiras de linhagens de *Anabaena* (valores em μm, média e desvio padrão)

Nota: C - comprimento; D - diâmetro; dp - desvio padrão; N - não medido.

Figuras 2-7. Foram incluídas também fotografias da linhagem *A. flos-aquae* UTCC64 utilizada neste estudo (Figura 7).

### Anabaena aphanizomenoides Forti

# Sinonímia: Aphanizomenon sphaericum Kisselev

### Figura 2, Tabelas 12-14, Linhagens: CENA187, CENA188

Tricoma reto com extremidade (4 – 6 células) levemente atenuada; célula vegetativa subquadrática/quadrática a um pouco mais longa que larga, com aerótopos, 2,6 – 6 µm compr., 4,3 – 6,2 µm diâm., razão compr./diâm. 0,5 – 1,1; células apicais (4- 6) com diâmetro variando de 3,1 – 3,5 µm; heterócito intercalar, esférico a oblongo alongado, 5 – 13,2 µm compr., 4,2 – 8,5 µm diâm., razão compr./diâm. 0,9 – 1,7; acineto esférico a oval, ao lado do heterócito, 8,1 – 12,3 µm compr., 8,6 – 14,3 µm diâm., razão compr./diâm. 1,0 – 1,3. Envelope mucilaginoso estreito, variando de 0,5 – 1,6 µm, com valor médio de 1 µm.

Aphanizomenon aphanizomenoides (Forti) Horecká et Komárek 1979 tem como basiônimo Anabaena aphanizomenoides Forti 1912 e sinonímia Aphanizomenon sphaericum Kisselev 1955 (HINDÁK, 2000, HORECKÁ; KOMÁREK, 1979). Esse táxon foi descrito inicialmente para um lago na Turquia como integrante do gênero Anabaena e posteriormente reclassificado para Aphanizomenon (HORECKÁ; KOMÁREK, 1979), devido principalmente à distribuição dos heterócitos no tricoma (estrutura subsimétrica) e à célula apical afilada. Porém, em algumas populações, a distribuição simétrica dos heterócitos no tricoma foi mais comum, caracterizando, portanto uma estrutura metamérica (HINDÁK; MOUSTAKA, 1988). Assim, a aceitação de Anabaena aphanizomenoides Forti como integrante do gênero Aphanizomenon não é consensual (HINDÁK, 2000). Da mesma forma, a linhagem CENA188 apresentou estrutura metamérica dos tricomas, uma das características que define o gênero Anabaena, sendo adotado, portanto, o nome Anabaena aphanizomenoides para a linhagem CENA188.

Assim, diferentes populações de *Anabaena aphanizomenoides* Forti, incluindo a sua última combinação *Aph. aphanizomenoides* (Forti) Horecká et Komárek, não apresentaram grande variação em relação ao material tipo (Tabela 14). Apenas duas características estiveram fora dos



Figura 2 - Anabaena aphanizomenoides Forti CENA188 (meio de cultura AA/4, 25±1°C; 40μmol fóton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). A. tricoma com heterócitos (H) intercalares e acinetos (A) adjacentes ao heterócito, notar extremidade do tricoma levemente afilada (seta) (contraste-de-fase); B. fragmentação do tricoma na região de dois heterócitos contíguos (seta); C, D. variação da célula apical (seta); E. heterócitos (H) e acinetos (A) maduros

Aph. aphanizomenoides (Forti) Horecká et Komárek Morfoespécie A. aphanizomenoides Forti Linhagem 22C4.9, Linhagem CENA188, Material/origem Eslováguia (Lago Vietnã (Nhuy, República Checa Turquia (Anatólia) – Stará Morava)  $(Svet)^{(1)}$ Material tipo Brasil (Canindé, CE) Dapda e Alemanha Anluu) Célula vegetativa barril, cilíndrico curta Forma cilíndrico curta barril, barril, cilíndrica esférica, cilíndrica \_ cilíndrica curta 2-3 4,7 4-5 Diâmetro (µm) 2-5 4,1-4,7 4,3-6,2 Comprimento (µm) 2,5-63-10 4,5-6,5 5 4-15 2,6-6 Razão compr./diâm. 1-1.5 0.5-1.1 ---\_ Células apicais Forma arredondada, longa, afilada levemente arredondada. levemente afilada, levemente estreita afilada, capitada levemente estreita capitada Diâmetro (µm) 2-3,5 2,7 3,1-3,5 \_ Comprimento (µm) 6-10 7 --\_ \_ Heterócito Forma esférica, cilíndrico esférica, ovóide esférica esférica, cilíndrico esférica, oblongo \_ alongada curta curta Diâmetro (um) 2.5-73.5-5 5.1-6.8 6 5.5-7 4.2-8.5 Comprimento (µm) 6,2 6-7,5 4.5-7 5-8 5.7-7 5.0-13.2 Razão compr./diâm. 1,0-1,2 0,9-1,7 --\_ \_ Acineto Forma esférica esférica, ovóide esférica esférica, ovóide esférica, ovaóide -Diâmetro (µm) 9,8-11,1 10.9 8,1-12,3 8-10 7,5-12,5 8-14 Comprimento (µm) 8-10 9.2-10.9 11,4 8-14 8,6-14,3 -Razão compr./diâm. 0,9-1,1 1,0-1,3 --\_ -Envelope mucilaginoso Diâmetro (µm) 0.5-1.6 Referência Hindák (2000) Nguyen et al. E. Zapomělová Stüken et al. (2009) Horecká e Komárek Presente estudo (comunicação (2007)(1979)pessoal)

Tabela 14 – Principais características morfométricas de populações de Anabaena aphanizomenoides Forti e Aphanizomenon aphanizomenoides (Forti) Horecká et Komárek
valores descritos para o tipo, o diâmetro da célula vegetativa  $(2,0 - 3,0 \ \mu\text{m})$  para material da Eslováquia (Lago Stará Morava) e o diâmetro do heterócito  $(3,5 - 5,0 \ \mu\text{m})$  para material do Vietnã (Nhuy, Dapda e Anluu). Quanto ao material brasileiro, *A. aphanizomenoides* CENA188 diferiu ligeiramente do material tipo pelas dimensões do heterócito e por apresentar envelope mucilaginoso estreito, variando de  $0,5 - 1,6 \ \mu\text{m}$ . A linhagem CENA188 apresentou variação morfométrica para os heterócitos (diâm.  $4,2 - 8,5 \ \mu\text{m}$  e compr.  $5,0 - 13,2 \ \mu\text{m}$ ) e, em comparação com o material descrito para a República Tcheca (*Aph. aphanizomenoides*), estes apresentaram forma geralmente esférica (razão compr./diâm. 1,0 - 1,2) enquanto que na linhagem CENA188, de esférica a cilíndrica (razão compr./diâm. 0,9 - 1,7) (Tabela 14).

#### Anabaena circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault

Sinonímia: Anabaena hassallii Witrock ex Lemmermann

Figura 3, Tabelas 12, 13 e 15, Linhagens: CENA189, CENA190, CENA191, CENA192, CENA193

Tricoma espiralado,  $10,8 - 81,3 \ \mu\text{m}$  compr.,  $40,1 - 150,7 \ \mu\text{m}$  diâm., razão diâm./compr. 1,5 - 7,6; célula vegetativa esférica a oblonga, com aerótopos,  $4,3 - 8,5 \ \mu\text{m}$  compr.,  $6,0 - 8,6 \ \mu\text{m}$  diâm., razão compr./diâm. 0,6 - 1,2; heterócito intercalar, esférico,  $5,9 - 10,7 \ \mu\text{m}$  compr.,  $6,7 - 11,5 \ \mu\text{m}$  diâm., razão compr./diâm. 0,7 - 1,2; acineto oblongo, cilíndrico,  $12,0 - 38,1 \ \mu\text{m}$  compr.,  $7,1 - 18,0 \ \mu\text{m}$  diâm., razão compr./diâm. 1,2 - 3,0. Envelope mucilaginoso estreito, variando de  $0,7 - 6,2 \ \mu\text{m}$ , com valores médios de  $1,6 - 2,9 \ \mu\text{m}$ .

As linhagens brasileiras de *Anabaena circinalis* não diferiram na maioria das características morfométricas relatadas para o material tipo, exceto pela não citação do envelope mucilaginoso na descrição fornecida por Komárek e Zapomělová (2007) (Tabela 15). Além disso, o envelope mucilaginoso nas linhagens brasileiras variou de  $0,7 - 6,2 \mu m$ , enquanto que foi relatado como estreito nas populações naturais do Rio Grande do Sul e São Paulo.



Figura 3 - Anabaena circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault (25±1°C; 40µmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A. CENA193 (meio de cultura AA/4) - aspecto geral do tricoma espiralado; B. CENA193 (meio de cultura AA/4) - detalhe do tricoma; C. CENA192 (meio de cultura AA/4) - tricoma espiralado com heterócitos (H); D. CENA192 (meio de cultura AA/4) - detalhe dos heterócitos intercalares (H) (contraste-de-fase); E. CENA191 (meio de cultura BGS + vitamina B12 0,015 µM) - detalhe dos heterócitos (H) com espessamento mucilaginoso da parede (contraste-de-fase)

Morfoespécie	Anabaena circ	Anabaena circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault								
Material/origem	Amostra	República Tcheca	Brasil (Rio	Brasil	Linhagem 04-28	Linhagens CENA189,				
	ambiental -	(Lagoa de Pesca	Grande do Sul)	(Reservatório	(Hodějovický,	190, 192, 193 (Salto				
	Material tipo	Hodějovický)		Billings, SP)	República Tcheca)	Grande, SP)				
Espira										
Diâmetro (µm)	68-120	40-52	67-91,2	75-100	15-110	40,1-150,7				
Comprimento (µm)	-	25-40	20,8-39	25-50	20-130	10,8-81,3				
Razão diâm./compr.	1,4-3,2	1-1,8	1,9-3,2	-	0,2-2,8	1,5-7,6				
Célula vegetativa										
Forma	esférica	-	esférica, barril	esférica, barril	-	esférica, oblonga				
Diâmetro (µm)	7-11	10-11	7,2-12,4	8-13	7-13	6-8,6				
Comprimento (µm)	-	6,4-8,6	7-11,4	7,5-12	5,5-17	4,3-8,5				
Razão compr./diâm.	-	0,6-0,8	-	-	0,6-2,1	0,6-1,2				
Heterócito										
Forma	-	-	arredondada	± esférica	-	esférica				
Diâmetro (µm)	-	10,6-11,8	10,4-16	9-12	9-13	6,7-11,5				
Comprimento (µm)	-	10,2-12	-	-	8,5-12,6	5,9-10,7				
Razão compr./diâm.	-	0,9-1	-	-	0,9-1,2	0,7-1,2				
Acineto										
Forma	ovóide	-	cilíndrica	cilíndrica	-	oblonga, cilíndrica				
Diâmetro (µm)	9-21	12,8-15,2	15-22,5	14-23	13-18,5	7,1-18				
Comprimento (µm)	12,5-42	17-25	21,2-27,4	18-25	18-29	12-38,1				
Razão compr./diâm.	-	1,3-1,7	-	-	1,4-2	1,2-3				
Envelope										
mucialginoso										
Diâmetro (µm)	-	-	presente ou	estreito	-	0,7-6,2				
			ausente							
Referência	Komárek e	Zapomělová et al.	Werner (2002)	Sant'Anna et al.	Zapomělová et al.	Presente estudo				
	Zapomělová	(2008)		(2007)	(2008)					
	(2007)									

Tabela 15 – Principais características morfométricas de populações de Anabaena circinalis Rabenhorst ex Bornet et Flahault

Anabaena crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg

Sinonímia: Anabaena spiroides var. crassa Lemmermann

Figura 4, Tabelas 12, 13 e 16, Linhagens: CENA194, CENA195, CENA196, CENA197, CENA198, CENA199, CENA200, CENA201, CENA202, CENA203, CENA204, CENA205, CENA206, CENA207

Tricoma espiralado, 24,1 – 101,9  $\mu$ m compr., 22,4 – 84,0  $\mu$ m diâm., razão diâm./compr. 0,5 – 1,8; célula vegetativa esférica a oblonga, com aerótopos, 5,1 – 11,8  $\mu$ m compr., 7,0 – 11,7  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 0,5 – 1,2; heterócito intercalar, esférico, 7,5 – 13,6  $\mu$ m compr., 7,7 – 14,8  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 0,7 – 1,2; acineto cilíndrico alongado, às vezes curvo, 16,0 – 43,0  $\mu$ m compr., 8,5 – 21,6  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 1,3 – 3,8. Envelope mucilaginoso amplo, variando de 5,7 a 24,4  $\mu$ m, com valores médios de 13,2 – 19,5 3  $\mu$ m.

As características morfológicas das linhagens brasileiras de *Anabaena crassa* estão de acordo com aquelas descritas para o material tipo (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007) (Tabela 16). Da mesma forma que em *A. circinalis*, o relato do envelope mucialginoso não foi feito por Komárek e Zapomělová (2007), sendo este amplo nas linhagens de Billings e Salto Grande, variando de  $5,7 - 24,4 \mu m$ .

# A. cf. fallax Komárek et Komárková-Legnerová

### Figura 5, Tabelas 12, 13 e 17, Linhagem: CENA208

Tricoma espiralado irregular; célula vegetativa quadrática ou em forma de barril a mais longa que larga, cilíndrica, com aerótopos,  $3,1 - 6,3 \mu m$  compr.,  $2,0 - 4,2 \mu m$  diâm., razão compr./diâm. 0,9 - 2,2; heterócito intercalar, esférico, ovóide a cilíndrico,  $4,6 - 7,5 \mu m$  compr.,  $3,7 - 5,7 \mu m$  diâm., razão compr./diâm. 1,1 - 1,8; sem acineto; envelope mucilaginoso estreito, variando de 0,7 - 3,1  $\mu m$ , com valor médio de 1,7  $\mu m$ .

*Anabaena fallax* foi descrita para reservatórios eutrofizados da região central do México (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 2002; KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007). Como relatado pelos autores, essa morfoespécie não possui acinetos, mas pode ser definida



Figura 4 - Anabaena crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg (meio de cultura AA/4, 25±1°C; 40µmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A. CENA194 - aspecto geral do tricoma espiralado com heterócitos (H);
B. CENA194 - tricoma com acinetos (A) adjacentes ao heterócito (H) (contraste-de-fase); C. CENA194 - detalhe do acineto(A) e heterócito (H) (contraste-de-fase); D. CENA198 - tricomas espiralados com heterócitos (H), fluorescência do pigmento clorofila-a (epifluorescência); E. CENA197 - aspecto geral do tricoma com heterócitos (H) e acinetos (A); F, G. CENA197 – acinetos (A) em diferentes estágios de desenvolvimento (contraste-de-fase)

Morfoespécie	Anabaena crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg									
Material/origem	Amostra ambiental - Material tipo	República Tcheca (Reservatório Jesenice)	Brasil (Rio Grande do Sul)	Brasil (Reservatório Jundiaí, SP)	Linhagem 04-26 (Jesenice, República Tcheca)	Linhagens CENA194-202 (Salto Grande, SP), 206 (Billings, SP)				
Espira										
Diâmetro (µm)	40-70	45-56	33-82	60-70	35-62	22,4-84				
Comprimento (µm)	30-55	38-45	28,2-74	30-52	20-57	24,1-101,9				
Razão diâm./compr.	0,5-2	0,8-1,4	1,1-2	-	0,9-1,9	0,5-1,8				
Célula vegetativa										
Forma	esférica, barril	-	barril, arredondada	esférica, barril	-	esférica, oblonga				
Diâmetro (µm)	8-15	11,2-12,2	9,2-15	9-12	8,5-13,5	7-11,7				
Comprimento (µm)	-	8,2-10,6	9-12,2	9,5-12	6-12	5,1-11,8				
Razão compr./diâm.	-	0,7-0,9	-	-	0,7-1,2	0,5-1,2				
Heterócito										
Forma	-	-	arredondada	± esférica	-	esférico				
Diâmetro (µm)	-	11,2-12,2	12,9-15	12-14	8,5-13	7,7-14,8				
Comprimento (µm)	-	10,6-12,5	10,4-14,3	-	7,5-13	7,5-13,6				
Razão compr./diâm.	-	0,9-1	-	-	0,9-1,1	0,7-1,2				
Acineto										
Forma	oval	-	elíptica	elíptica	-	oval, cilíndrico				
Diâmetro (µm)	13-25	16,5-18,5	14,1-16,5	14-17	12,5-18,5	8,5-21,6				
Comprimento (µm)	15-42	24-29	21,6-24,7	20-25	20-30	16-43				
Razão compr./diâm.	-	1,5-1,6	-	-	1,3-1,9	1,3-3,8				
Envelope mucialginoso										
Diâmetro (µm)	-	-	presente	amplo	-	5,7-24,4				
Referência	Komárek e Zapomělová (2007)	Zapomělová et al. (2008)	Werner (2002)	Sant'Anna et al. (2007)	Zapomělová et al. (2008)	Presente estudo				

Tabela 16 – Principais características morfométricas de populações de Anabaena crassa (Lemmermann) Komárková-Legnerová et Cronberg



**Figura 5 -** *Anabaena* **cf.** *fallax* **Komárek et Komárková-Legnerová CENA208** (meio de cultura AA/4, 25±1°C; 40μmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A. aspecto geral do tricoma espiralado; B. tricoma com aerótopos (contraste-defase); C, D. tricoma com extremidade afilada e célula apical levemente capitada (seta) (C. contraste-defase); E. fragmentação do tricoma típica da espécie (seta); F. tricoma com heterócitos (H) intercalares com distribuição metamérica (contraste-de-fase); G. diferentes morfologias dos heterócitos (setas) (contraste-de-fase)

principalmente pelo tipo característico de fragmentação do tricoma e pela morfologia dos heterócitos. Da mesma forma que no gênero *Anabaenopsis*, heterócitos terminais podem ocorrer em *A. fallax*, porém sua origem é diferente daquela apresentada em *Anabaenopsis*. Como observado no material tipo (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 2002), *A. cf. fallax* CENA208 apresentou em sua maioria heterócitos biporados (Figura 5G), porém ocorreram também heterócitos com um poro apenas. Outra característica importante foi a presença de célula apical cilíndrica alongada, às vezes capitata na linhagem CENA208 (Figuras 5C e 5D), característica relatada também para o material tipo. *A. cf. fallax* CENA208 difere do material tipo pelo diâmetro da célula vegetativa, mais estreito em CENA208, variando de 2,0 – 4,2 µm e para o tipo, de 5,2 – 6,0 µm e pelas dimensões da espira (Tabela 17). A espira em CENA208 é mais estreita (12,0 – 21,7 µm) que no material tipo (48,0 – 76,0 µ) (Tabela 17). Porém, análise de mais populações e em diferentes condições possibilitará verificar se *A. cf. fallax* CENA208 representa uma variação de *A. fallax* ou uma outra morfoespécie.

Morfoespécie	Anabaena fallax Komárek et Komárková-Legnerová				
Material/origem	Parque Chapultepec (Cidade	Linhagem CENA208			
	do México) – Material tipo	(Reservatório Billings,			
		Riacho Grande – SP)			
Espira					
Diâmetro	48-76	12-21,7			
Comprimento	-	8,9-21,3			
Razão diâm./compr.	-	0,8-2			
Célula vegetativa					
Forma	barril, cilíndrica	barril, cilíndrica			
Diâmetro (µm)	5,2-6	2-4,2			
Comprimento (µm)	-	3,1-6,3			
Razão compr./diâm.	-	0,9-2,2			
Heterócito					
Forma	ovóide	esférica. ovóide, cilíndrica			
Diâmetro (µm)	6-7	3,7-5,7			
Comprimento (µm)	7,2-8,4	4,6-7,5			
Razão compr./diâm.	-	1,1-1,8			
Envelope					
mucilaginoso					
Diâmetro (µm)	-	0,7-3,1			
Referência	Komárek e Komárková- Legnerová (2002)	Presente estudo			

Tabela 17 - Principais características morfométricas de Anabaena fallax Komárek et<br/>Komárková-Legnerová e Linhagem CENA208

### Anabaena planctonica Brunnthaler

### Figuras 6 e 7, Tabelas 12, 13 e 18, Linhagens: CENA209, CENA210

Tricoma reto; célula vegetativa em forma de barril, subquadrática a quadrática, com aerótopos, 3 – 7,1  $\mu$ m compr., 5 – 8,5  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 0,5 – 1; heterócito intercalar, esférico a levemente oblongo, 5 – 9,4  $\mu$ m compr., 6,8 – 9,9  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 0,6 – 1,1; acineto distante do heterócito 2 a 4 células, esférico a levemente oblongo, às vezes cilíndrico alongado, 12,5 – 24,5  $\mu$ m compr., 9,2 – 15,3  $\mu$ m diâm., razão compr./diâm. 1,1 – 2,2. Envelope mucilaginoso variando de 1,6 – 7,5  $\mu$ m, com valores médios de 2,5/3,8  $\mu$ m.

As variações métricas de *Anabaena planctonica* CENA209/210 estão dentro daquelas descritas para *A. planctonica* Brunnthaler 1903 (KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ; ELORANTA, 1992), apesar do diâmetro da célula vegetativa (variação  $5,0 - 8,5 \mu m$ ) estar próximo ao limite mínimo para o material tipo (variação  $7,7 - 15 \mu m$ ) (Tabela 18). *A. planctonica* apresenta semelhança com *A. viguieri* Denis et Frémy, porém elas diferem principalmente pelas dimensões da célula vegetativa e do acineto, além da presença do envelope mucilaginoso em *A. planctonica* (WERNER, 2002). Assim, o acineto tem maior comprimento em *A. planctonica* (variação 15,0 – 37,0 µm para o material tipo e 12,3 – 24,5 µm para CENA209/210) e não ultrapassa 17,0 µm em *A.viguieri* (Tabela 18). Outra característica importante que diferencia as duas espécies é o envelope mucilaginoso, citado como amplo para material do Lago das Garças (TUCCI et al., 2006) e variando de 1,6 – 7,5 µm para *A. planctonica* CENA209/210.

#### 2.7.3 Análise de componentes principais (ACP)

Na análise de ACP foram utilizadas 16 linhagens representativas das morfoespécies *A. aphanizomenoides, A. circinalis, A. crassa, A.* cf. *fallax* e *A. planctonica*. O gênero *Anabaena* composto por organismos espiralados pode ser diferenciado em grupos distintos (Figura 8), tanto pelo eixo X (57,3% de explicabilidade) quanto pelo eixo Y (32,8% de explicabilidade). Pelo eixo X, as variáveis comprimento da espira (comprES) e razões comprimento/diâmetro do heterócito (RHT) e da célula vegetativa (RV) foram as variáveis mais significativas. Apesar do diâmetro da bainha (diamBA) ter sido menos expressivo na ACP em relação às demais variáveis citadas, este foi um caractere analisado separadamente, devido a sua importância no agrupamento



Figura 6 - Anabaena planctonica Brunnthaler CENA210 (meio de cultura AA/4 + vitamina B12 0,015μM, 25±1°C; 40μmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A. aspecto geral do tricoma com heterócitos (H) e acineto (A) (contraste-de-fase); B. envelope mucilaginoso (seta) evidenciado por nanquim; C. tricomas com heterócitos (H) e acinetos (A), notar distribuição metamérica dos heterócitos;. D. tricoma com heterócitos (H) e acineto (A), notar acineto maduro (seta)



Figura 7 - Anabaena planctonica Brunnthaler 1903 CENA209 (meio de cultura AA/4 + vitamina B12 0,015μM, 25±1°C; 40μmol fóton m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). A. aspecto geral do tricoma com heterócitos (H) e acineto (A); B. envelope mucilaginoso (seta) evidenciado por nanquim; C. tricomas com heterócitos (H) e acineto (A) maduro. Anabaena flos-aquae (Lyngbye) Brébisson ex Bornet et Flauhault UTCC64 (meio de cultura AA/4, 25±1°C; 40μmol fóton m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). D. aspecto geral dos tricomas com heterócitos (H) e sem aerótopos; E. detalhe do heterócito (H) cilíndrico; F. detalhe da fragmentação do tricoma nos heterócitos (H) contíguos

Tabela 18 - Principais características morfométricas de diferentes populações de Anabaena planctonica Brunnthaler e A. viguieri Denis et Frémy

Morfoespécie	A. viguieri Denis et	Frémy		A. planctonica Bru	A. planctonica Brunnthaler			
Material/origem	Amostra ambiental	Vietnã (Rio	Brasil (Rio Grande	Amostra	Lago das	Reservatório	Linhagens CENA209,	
	<ul> <li>Material tipo</li> </ul>	Huong, Dapda,	do Sul)	ambiental –	Garças (São	Taiaçupeba	CENA210, Brasil	
		Nhuy e Anluu)		Material tipo	Paulo, SP)	(Suzano, SP)	(Piracicaba, SP)	
Célula vegetativa								
Forma	elíptica, barril	barril, esférica	barril, arredondada	barril curta	barril	barril	barril	
Diâmetro (µm)	6-7	5-9	5,8-6,4	7,7-15	8,8-10	10-14	5-8,5	
Comprimento (µm)	4-8,5	3,4-8,0	4-6,5	-	-	4,5-7	3-7,1	
Razão compr./diâm.	-	-	-	-	-	-	0,5-1	
Heterócito								
Forma	esférica	esférica	arredondada	arredondada,	esférica	± esférica	arredondada, esférica,	
				esférica				
Diâmetro (µm)	5,5-6	6-9	ca. 6,9	-	10,7-11,8	10-12	6,8-9,9	
Comprimento (µm)	-	-	-	-	-	-	5-9,4	
Razão compr./diâm.	-	-	-	-	-	-	0,6-1,1	
Acineto								
Forma	elíptica, ovóide	elíptica	elíptica, cilíndrica	ovóide, cilíndrica	ovóide	elíptica	esférica/oblonga,	
							cilíndrica	
Diâmetro (µm)	12-13	9-12	12,6-16	9-21	8,8-11	12-18	9,2-15,3	
Comprimento (µm)	até 17	7,5-19	16,2-19	15-37	13-14	18-26	12,3-24,5	
Razão compr./diâm.	-	-	-	-	-	-	1,1-2,2	
Envelope mucilaginoso								
Diâmetro (µm)	ausente	-	ausente	presente	amplo	-	1,6-7,5	
Referência	Werner (2002)	Nguyen et al.	Werner (2002)	Komárkova-	Tucci et al.	Sant'Anna et al.	Presente estudo	
		(2007)		Legnerová e	(2006)	(2007)		
				Eloranta (1992)				



Figura 8 - ACP das variáveis morfométricas de *A. circinalis* (CENA189 e CENA193), *A. crassa* (CENA194-202 e CENA206) e *A.* cf. *fallax* CENA208

de *A circinalis* e *A. crassa*. Já pelo eixo Y (32,8% de explicabilidade), o diâmetro da espira (diamES) e a razão diâmetro/comprimento da espira (RES) foram as mais representativas. Assim, *A.* cf. *fallax* CENA208 pode ser diferenciada das outras formas espiraladas, *A. circinalis* e *A. crassa*, pelas variáveis RHT e RV (Figuras 9 e 10). A média da razão comprimento/diâmetro do heterócito (RHT) foi 1,3 (mín. 1,1 – máx. 1,8) e esteve acima das outras médias, 0,9 – 1,0 (mín. 0,7 – máx. 1,2) (Figura 9, Tabelas 12 e 13). Outra variável que diferenciou *A.* cf. *fallax* CENA208 das formas espiraladas foi a RV, a qual apresentou um valor médio de 1,4 (mín. 0,9 – máx. 2,2), enquanto valores médios de 0,8/0,9/1,0 (mín. 0,6 – máx. 1,2) em *A. circinalis* e *A. crassa* foram encontrados (Figura 10, Tabela 13, 14). Portanto, a forma dos heterócitos e células vegetativas, de levemente mais longa que larga a cilíndrica, é uma característica importante para diferenciação de *A.* cf. *fallax*.



Figura 9 - Variação da razão comprimento/diâmetro do heterócito (RHT) de representantes de A. crassa (CENA197-202 e CENA206), A. circinalis (CENA189 e CENA193) e A. cf. fallax CENA208. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"



Figura 10 - Variação da razão comprimento/diâmetro da célula vegetativa (RV) de representantes de *A. crassa* (CENA197-202 e CENA206), *A. circinalis* (CENA189 e CENA193) e *A.* cf. *fallax* CENA208. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"

Como evidenciado pela ACP (Figura 8), as variáveis relacionadas à espira, comprimento (comprES), diâmetro (diamES) e razão diâmetro/comprimento (RES), foram importantes para diferenciação das morfoespécies. Dentre essas variáveis, a RES foi a mais significativa, cujos valores médios variaram de 0,7 - 1,1 (mín. 0,5 - máx. 1,8) para A. crassa, 3,4 - 3,7 (mín. 1,5 - 1,5) 7,6) para A. circinalis e foi de 1,4 (mín. 0,8 – máx. 2,0) para A. cf. fallax (Figura 11, Tabelas 12 e 13). Assim, esta variável se mostra importante na diferenciação das morfoespécies avaliadas. Para a variável diâmetro das espiras (diamES), embora tenha ocorrido sobreposição dos valores mínimo e máximo para A. circinalis (mín. 40,1 – máx. 150,7 µm) e A. crassa (mín. 22,4 – máx. 84,0  $\mu$ m), estas puderam ser diferenciadas de A. cf. *fallax* que apresentou espira com 12,0 – 21,7 µm de diâmetro (Figura 12, Tabela 12). Desta forma ao se avaliar apenas A. circinalis e A. crassa este caractere não ajuda na diferenciação, porém é de expressiva importância para a separação de A. cf. fallax das demais espiraladas estudadas. Já os comprimentos das espiras (comprES) apresentaram maior sobreposição dos valores, sendo que variaram de 10,8 - 81,3 µm para A. circinalis, de 24,1 – 101,9 µm para A. crassa e de 8,9 – 21,3 para A. cf. fallax, indicando que quanto menor este valor, existe uma tendência para separação de A. cf. fallax das demais estudadas, e no entanto não tem muito valor na diferenciação entre A. circinalis e A. crassa. (Figura 13, Tabelas 12 e 13).

Corroborando com os dados observados, a forma da espira, incluindo suas dimensões de comprimento (comprES), diâmetro (diamES) e razão diâmetro/comprimento (RES), é tradicionalmente utilizada para diferenciar as morfoespécies espiraladas de *Anabaena* (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007, WERNER, 2002). Isso está de acordo com resultados obtidos para populações de *A. circinalis* e *A. crassa* do Brasil e República Tcheca (Tabelas 15 e 16). Por exemplo, a RES de *A. crassa* nunca atingiu o valor máximo superior a 2,0 para o material tipo, variando de 0,8 – 1,9 para populações de Jesenice (República Tcheca) e de 0,5 – 2,0 para amostras do Rio Grande do Sul e São Paulo (Tabela 16). No entanto, *A. circinalis* isoladas no Brasil apresentaram valores de RES mais altos, atingindo o valor de 3,2 nas linhagens do Rio Grande do Sul e 7,6 nas linhagens de São Paulo (Tabela 15). Outra variável importante na identificação das formas espiraladas foi o diâmetro da espira (diamES) que ajudou na diferenciação de *A. circinalis/A. crassa* Porém, ele não serviria para diferenciar o material tipo de *A. fallax* de *A. circinalis/A. crassa* devido à sobreposição dos valores, 48 – 76 μm (Tabela 17). A diferenciação entre *A. circinalis* e *A. crassa* não foi possível baseada



Figura 11- Variação da razão diâmetro/comprimento da espira (RES) de representantes de *A. crassa* (CENA197-202 e CENA206), *A. circinalis* (CENA189 e CENA190) e *A.* cf. *fallax* CENA208. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"



Figura 12 - Variação do diâmetro da espira (diamES) de representantes de A. crassa (CENA197-202 e CENA206), A. circinalis (CENA189 e CENA190) e A. cf. fallax CENA208. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"



Figura 13 - Variação do comprimento da espira (comprES) de representantes de A. crassa (CENA197-202 e CENA206), A. circinalis (CENA189 e CENA190) e A. cf. fallax CENA208. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"

nos diâmetros da célula vegetativa e da espira para populações da República Tcheca (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2007), sendo essas características susceptíveis às condições ambientais como temperatura e concentração de fósforo (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008). Apesar do diâmetro da espira em *A. circinalis* e *A. crassa* se sobreporem (Figura 12, Tabelas 12 e 13), este caractere ainda se mostra como um fator a ser levado em consideração nas análises para a diferenciação destas morfoespécies como indicado pela ACP. Entretanto, o diâmetro da célula vegetativa indica que as morfoespécies podem ser diferenciadas por esta variável (Figura 14), cujos valores médios foram 7,1 – 7,4 µm (mín. 6,0 – máx. 8,6 µm) para *A. circinalis* e 8,9 – 10,4 µm (mín. 7,0 – máx. 11,7 µm) para *A. crassa* (Tabelas 12 e 13).

A análise de ACP das morfoespécies de *Anabaena* com tricomas retos mostrou que *A*. *aphanizomenoides* CENA188 e *A. planctonica* (CENA209, CENA210) podem ser separadas principalmente pelo comprimento do acineto (comprAC) e, em menor grau, pela razão comprimento/diâmetro do heterócito (RHT) pelo eixo X (69,0% de explicabilidade) (Figuras 15-17). A variável comprAC apresentou valor médio 11,2 μm (mín. 8,6 – máx. 14,3 μm) para a linhagem CENA188, enquanto que os valores médios para as linhagens CENA209 e CENA210 foram 18,0/17,1 μm, respectivamente, e variação mín. 12,3 – máx. 24,5 μm (Figura 16, Tabelas

12 e 13). Quanto à razão comprimento/diâmetro do heterócito (RHT), apesar da diferenciação dos valores médios, *A. aphanizomenoides* 1,2 e *A. planctonica* 0,9/1,0, ocorreu maior sobreposição dos valores mínimo e máximo. A linhagem CENA188 apresentou os valores mínimo e máximo de 0,9 e 1,7, e para *A. planctonica* eles variaram de 0,6 – 1,1 (Figura 17, Tabelas 12 e 13).



Figura 14 - Variação do diâmetro da célula vegetativa (diamV) de representantes de A. crassa (CENA196-202 e CENA206) e A. circinalis (CENA189 e CENA193). Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"



Figura 15 - ACP das variáveis morfométricas de A. aphanizomenoides CENA188 e A. planctonica (CENA209 e CENA210)



Figura 16 - Variação do comprimento do acineto (comprAC) de A. aphanizomenoides CENA188 e A. planctonica (CENA209 e CENA210). Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"



Figura 17 - Variação da razão de comprimento/diâmetro do heterócito (RHT) de A. aphanizomenoides CENA188 e A. planctonica (CENA209 e CENA210). Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"

Os acinetos têm sido relatados como estáveis tanto na natureza quanto na cultura e possuem, portanto, grande valor como característica para diferenciar as morfoespécies de *Anabaena* (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007, 2008, ZAPOMĚLOVÁ et al., 2007, 2008). Por exemplo, *A. compacta* é uma morfoespécie bem definida pelas características diâmetro da célula vegetativa e forma do acineto (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2007). O mesmo pode ser verificado para diferenciar as morfoespécies *A. aphanizomenoides* e *A. planctonica*.

Devido à grande variação da espira dentro do grupo *Anabaena* (subg. *Dolichospermum*) (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008), decidiu-se realizar nova análise das variáveis morfométricas, porém excluindo aquelas relacionadas à espira do tricoma. Da mesma forma que na análise considerando as variáveis comprES, diamES e RES em *Anabaena* espiralada (Figura 8), as váriavéis RHT e RV para *A*. cf. *fallax* CENA208 mostrou ser importante para sua diferenciação em relação a todas as morfoespécies analisadas (Figura 18). Além disso, pelo eixo X (80,5% de explicabilidade), o diâmetro da bainha (diamBA) caracterizou três grupos, *A. crassa, A. aphanizomenoides/A. circinalis/A. planctonica* e *A.* cf. *fallax*. Assim, os diâmetros médios da

bainha para *A. crassa* foram 13,2 – 19,5  $\mu$ m (mín. 5,7 – máx. 24,4  $\mu$ m), para *A. aphanizomenoides/A. circinalis/A. planctonica* 1,0 – 3,8  $\mu$ m (mín. 0,5 – máx. 7,5  $\mu$ m) e para *A.* cf. *fallax*, 1,7  $\mu$ m (mín. 0,7 – máx. 3,1  $\mu$ m) (Figura 19, Tabelas 12 e 13). O envelope mucilaginoso (bainha) amplo observado nas linhagens *A. crassa* isoladas neste estudo, também foi descrito como amplo para a mesma morfoespécie isolada do Reservatório Jundiaí (São Paulo) e relatado como presente em *A. crassa* do Rio Grande do Sul (Tabela 16). Apesar de trabalhos recentes não considerarem essa característica na análise morfológica (KOMÁREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007; ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008), ela pode ser um parâmetro importante para diferenciar as morfoespécies.



Figura 18 - ACP das variáveis morfométricas (exceto aquelas relacionadas à espira – comprES, diamES, RES) de *A. aphanizomenoides* CENA188, *A. circinalis* (CENA189 e CENA193), *A. crassa* (CENA194-202 e CENA206), *A. cf. fallax* CENA208 e *A. planctonica* (CENA209 e CENA210)



Figura 19 – Variação do diâmetro da bainha (diamBA) de representantes de A. crassa (CENA200-202 e CENA206),
 A. circinalis (CENA189 e CENA193), A. cf. fallax CENA208, A. aphanizomenoides CENA188 e A. planctonica (CENA209 e CENA210). Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – "Whisker Boxplot"

# 2.7.4 Análise filogenética

As análises comparativas (BLAST) das sequências do gene de RNAr 16S (1410 – 1436 pb) de 14 linhagens de *Anabaena* geradas neste estudo, com outras sequências depositadas no GenBank mostraram valores de identidade variando de 97,2% - 100% (Tabela 19). Na bacteriologia tem sido considerado que similaridade acima de 97% entre sequências do gene de RNAr 16S indica que as linhagens pertencem a uma mesma espécie (VANDAMME et al., 1996). Embora as similaridades entre as sequências de RNAr 16S das linhagens de *Anabaena* deste estudo e as mais próximas relacionadas do GenBank estejam acima de 97%, as nomenclaturas não foram correspondentes. Komárek e Anagnostidis (1989) relatam que mais de 50% das linhagens existentes nas coleções de culturas de cianobactérias não correspondem às características do táxon nas quais elas foram incluídas.

Morfoespécie	Tamanho do fragemnto de RNAr 16S (pb)	I (%)	C (%)	Organismo mais próximo no GenBank (no. de acesso)
A. crassa CENA196, CENA199, CENA205, CENA207	1410 -1411	98,6	100	A. planctonica 1tu36s8 (AJ630433)
		98,6	100	A. mucosa 1tu35s5 (AJ630425)
		98,6	100	Anabaena cf. scheremetievi PMC9701 (AJ293117)
A. crassa CENA206	1415	98.7	100	A. planctonica 1tu36s8 (AJ630433)
	1110	98,7	100	Anabaena cf. Scheremetievi PMC9701 (AJ293117)
		98,7	99	A.mucosa 1tu35s5 (AJ630425)
A. crassa CENA202	1436	97,3	86	<i>Anabaena</i> cf. Scheremetievi PMC9701 (AJ293117)
		97,2	86	A. planctonica 1tu36s8 (AJ630433)
		97,2	86	A. mucosa 1tu35s5 (AJ630425)
A. circinalis CENA190, CENA191, CENA193	1410	98,5	100	Aph. flos-aquae 1tu37s13 (AJ630442)
		98,3	100	A. spiroides 1tu39s17 (AJ630440)
		98,4	100	A. sigmoidea 0tu36s7 (AJ630434)
A. planctonica CENA209	1411	99,9	100	A. mucosa 1tu35s5 (AJ630425)
		99,8	100	<i>Anabaena</i> cf. Scheremetievi PMC9701 (AJ293117)
		99,6	100	A. planctonica 1tu36s8 (AJ630433)
A. planctonica CENA210	1424	99,8	100	A. planctonica 1tu36s8 (AJ630433)
		99,8	100	A. mucosa 1tu35s5 (AJ630425)
		99,7	100	<i>Anabaena</i> cf. Scheremetievi PMC9701 (AJ293117)
<i>Anabaena</i> cf. fallax CENA208	1411	98,0	100	Aph. issatschenkoi 0tu37s7 (AJ630446)
		97.9	100	Anabaena sp. A277 (AJ133160)
		97,9	100	A. planctonica PH71 (AJ293108)
A. flos-aquae UTCC64	1413	100	100	A. variabilis ATCC29413 (NC_007413)
		100	100	A. variabilis IAM M-204 (AB074502)
A. aphanizomenoides CENA188	1411	98,7	98	A. reniformis 07-01 (FM161349)
		99,1	95	Aph. aphanizomenoides 04-43 (FM161350)
		98,3	98	A. reniformis 06-01 (FM161348)

Tabela 19 – Identidades das sequências do RNAr 16S das linhagens de *Anabaena* estudadas e comparadas com outras seqüênmeias de cianobactérias do GenBank (NCBI)

Nota: I – identidade; C – cobertura.



Figura 20 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S (1410 pb) usando o método da distância ("Neighbor Joining" – NJ). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise NJ estão apresentados em cada nó



Figura 21 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S (1410 pb) usando o método máxima parcimônia (MP). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise MP estão apresentados em cada nó

Nas árvores filogenéticas de sequências do gene de RNAr 16S os isolados brasileiros de Anabaena formaram cinco grupos distintos (Figuras 20 e 21). O grupo I é representado pelas linhagens de Anabaena crassa CENA196/199/202/205/206/207 e suportado por altos valores de reamostragem (91% para NJ e 92% para MP). Porém, essas linhagens não se agruparam com as outras da mesma morfoespécie, ou seja, Anabaena cf. crassa 1tu27s7 da Finlândia e A. crassa 215 da Dinamarca. As linhagens A. planctonica CENA209/210 agruparam-se com diferentes morfoespécies como A. mucosa e Anabaena cf. scheremetievi (grupo II, Figuras 20 e 21), porém com baixos valores de reamostragem (65% para NJ e <50% para MP). As linhagens A. circinalis CENA190/191/193 formaram um agrupamento único (grupo III, Figuras 20 e 21) com altos valores de reamostragem (95% para NJ e 87% para MP). Da mesma forma que A. crassa, as linhagens brasileiras não se agruparam com outras linhagens de A. circinalis, ficando A. circinalis AWT02, NIES41 e 123 dispersas nas duas árvores. A linhagem de A. cf. fallax posicionou-se em um ramo interno separado, dentro de um ramo maior formado por táxons distintos, ou seja, duas espécies diferentes de Anabaena (Anabaena sp. A277 e A. planctonica PH71) e um gênero diferente (Aphanizomenon issatschenkoi 0tu37s7). A espécie A. aphanizomenoides CENA188 agrupou-se com linhagens de Aph. aphanizomenoides e de A. reniformis (grupo IV, Figuras 20 e 21). De acordo com nova proposição de gênero (Eliska Zapomelová, comunicação pessoal), esse agrupamento é caracterizado por organismos com heterócitos esféricos ao lado do acineto. Recentemente, essa característica também foi citada como importante para alguns integrantes de Anabaena/Aphanizomenon (STÚKEN et al., 2009). Segundo esses autores, heterócitos esféricos ao lado do acineto é característica comum à Aph. aphanizomenoides, A. kisseleviana e A. oumiana. Portanto, como verificado para A. aphanizomenoides (Aph. aphanizomeoides) e A. reniformis, provavelmente A. oumiana seja integrante desse novo gênero. O grupo V foi representado pelas linhagens A. flos-aquae UTCC64, A. variabilis IAM M-204/ATCC29413 e Nostoc sp. PCC7120. Importante citar que

As topologias das árvores filogenéticas (NJ e MP) das sequências do gene de RNAr 16S mostraram que os representantes selecionados das ordens Nostocales (*Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Nostoc*) e Stigonematales (*Hapalosiphon*) separaram-se dos organismos pertencentes às ordens Chroococcales (*Microcystis* e *Synechococcus*) e Oscillatoriales (*Planktothrix*) (Figuras 20 e 21), conforme esperado. Quanto às tradicionais ordens Nostocales e Stigonematales, diferenciadas

esse grupo é próximo daquele composto pelas linhagens Nostoc sp. 152 e IO-102-I.

morfologicamente pelo tipo de ramificação do tricoma (divisão celular), ambas as análises mostraram que esta divisão é artificial, pois *Hapalosiphon hibernicus* agrupou-se com *Anabaena/Aphanizomenon/Nostoc* (Figuras 20 e 21). Essa divisão não suportada pelas análises filogenéticas (WILMOTTE; HERDMAN, 2001) auxiliou também na proposição do atual Sistema de Classificação feita por Hoffmann, Komárek e Kastovský (2005). Nesse sistema, as tradicionais ordens Nostocales e Stigonematales passaram a integrar uma única ordem (Nostocales) dentro da subclasse Nostocophycidae.

A análise filogenética dos genes concatenados RNAr 16S, *rpoC1*, *rbcL* e *tufA* (Figuras 22 - 24) mantiveram a mesma classificação para as ordens Nostocales e Stigonematales. Porém, houve uma melhor congruência das morfoespécies com os genes analisados. As espécies *A. aphanizomenoides*, *A. circinalis* e *A. planctonica* formaram agrupamentos distintos, independente do método de análise utilizado (NJ, MP e ML). Assim, essas morfoespécies representam claramente indivíduos distintos. Quanto às morfoespécies *Anabaena* cf. *fallax* e *A. crassa*, elas se agruparam nas análises de NJ e MP com valores de reamostragem 66% e 74%, respectivamente (Figuras 22 e 23). Porém, na análise de ML, *A. crassa* CENA202 agrupou-se com as outras linhagens da mesma espécie e *A.* cf. *fallax* CENA208 posicionou-se em um ramo separado. A linhagem *A. aphanizomenoides* CENA188 também ficou em um ramo separado e, assim como *A.* cf. *fallax* CENA208, mostrou-se distinta de *A. crassa*. Novamente, *A. flos-aquae* UTCC64 agrupou-se com *Nostoc* sp. PCC7120 e *A. variabilis* ATCC29413.

Como verificado por Rajaniemi et al. (2005), análises das sequências do gene de RNAr 16S mostraram que existe um agrupamento com morfoespécies retas e espiraladas de *Anabaena*, como por exemplo, *A. circinalis*, *A. crassa*, *A. mucosa*, *A. planctonica*, *A. smithii* e *A. sigmoidea*, indicando que esta característica não é válida para separar morfoespécies. Resultados similares foram obtidos para *A. circinalis* e *A. crassa* que se agruparam em clado único com *A. planctonica*, *A. mucosa*, *A. cf. scheremetievi*, *A. cf. crassa*, *Aph. flos-aquae*, *A. spiroides* e *A. sigmoidea* (Figuras 20 e 21) nas análises das sequências de RNAr 16S. Por outro lado, a análise dos genes concatenados resultou na diferenciação de *A. circinalis* e *A. crassa* (Figuras 22 - 24). Além disso, o diâmetro da célula vegetativa (diamV) e a razão diâmetro/comprimento da espira (RES) foram as variáveis morfológicas que diferenciaram essas morfoespécies. Apesar de fatores ambientais, como temperatura e nutrientes (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008), poderem influenciar a morfologia da espira e, muitas vezes a separação de tipos espiralados e retos não ser suportada por análises filogenéticas, a ocorrência de tricomas espiralados na natureza permanece sem resposta (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2008). Portanto, até que outra característica morfológica apresente melhor congruência com os dados filogenéticos, é aconselhável manter essas duas morfoespécies (*A. circinalis* e *A. crassa*) separadas baseado na espira do tricoma.

Atualmente, o acineto tem sido citado como característica estável e importante para a identificação das morfoespécies de *Anabaena* (RAJANIEMI et al., 2005; KOMÉREK; ZAPOMĚLOVÁ, 2007, 2008). De acordo com os resultados obtidos, o comprimento do acineto (comprAC) mostrou ser importante para diferenciar *A. planctonica* de *A. aphanizomenoides*, este último caracterizado pelos acinetos esféricos. A estabilidade da forma e posição do acineto, como em *A. aphanizomenoides*, é característica importante para proposição de um novo gênero (Eliska Zapomělová, comunicação pessoal).

Como mencionado anteriormente na análise filogenética das sequências do gene de RNAr 16S, A. cf. fallax posicionou-se em um ramo separado, cujo agrupamento mais próximo foi o formado por Anabaena sp. A277, A. planctonica PH71 e Aph. issatschenkoi 0tu37s7 (Figuras 20 e 21). Resultados similares foram obtidos por Rajaniemi et al. (2005) cujas linhagens Aph. issatschenkoi Otu37s7 e Ananabena sp. A277 agruparam-se em ramo único juntamente com outras linhagens de Aph. issatschenkoi. Esse agrupamento heterogêneo composto por organismos planctônico (Aph. issatschenkoi) e bentônico (Anabaena sp. A277) é caracterizado por formas distintas morfologicamente (RAJANIEMI et al., 2005). No entanto, a célula apical afilada de Aph. issatschenkoi torna este grupo distinto e separado dos organismo típicos de Anabaena/Aphanizomenon planctônicos. Anabaena fallax é descrita por não possuir acinetos (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 2002), como verificado para a linhagem CENA208. Apesar dessa linhagem não possuir a célula apical afilada como a de Aph. issatschenkoi, ela apresenta célula apical levemente atenuada e capitada (Figuras 5C e 5D), ainda característica de Aphanizomenon (HINDÁK, 2000). Por outro lado, a estrutura metamérica do tricoma (Figuras 5C, 5F e 5G) e a forma espiralada são características típicas de Anabaena (HINDÁK, 2000). Assim, a linhagem CENA208 representa um organismo com características morfológica típicas de Aphanizomenon e Anabaena. As análises dos genes concatenados mostraram que A. cf. fallax CENA208 está em um ramo separado (Figura 24) ou agrupada com A. crassa CENA202 (Figuras 22 e 23). A sequência do gene de RNAr 16S da linhagem CENA202 apresentou a menor percentagem de cobertura (86%) dentre todas as sequências estudadas, cujas coberturas variaram de 95% a 100% na análise BLAST. Porém, na análise de ML (Figura 24), *Anabaena* cf. *fallax* CENA208 separou-se das linhagens de *A. circinalis* e *A. crassa* em um ramo único. Provavelmente, *Anabaena* cf. *fallax* seja representante de um novo gênero de acordo com as análises filogenéticas. Morfologicamente, as ACPs mostraram que as variáveis RV e RHT são importantes para diferenciar essa morfoespécie, além da variável espira (comprES, diamES e RES) diferenciá-la de *A. crassa* e *A. circinalis* (item 2.7.3). Contudo, devese confirmar a validade desse novo gênero por estudos morfológicos e moleculares de mais isolados e também de material da natureza.



Figura 22 - Análise filogenética de sequências concatenadas dos genes constitutivos RNAr 16S, rpoC1, tufA and rbcL (3617 pb) usando o método da distância ("Neighbor Joining" - NJ). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise NJ estão apresentados em cada nó



Figura 23 - Análise filogenética de sequências concatenadas dos genes constitutivos RNAr 16S, *rpoC1*, *tufA* and *rbcL* (3617 pb) usando o método máxima parcimônia (MP). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise MP estão apresentados em cada nó



Figura 24 -Análise filogenética de sequências concatenadas dos genes constitutivos RNAr 16S, rpoC1, tufA and rbcL (3617 pb) usando o método máxima verossimilhança ("Maximum likelihood " - ML). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise ML estão apresentados em cada nó

#### 2.7.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os fragmentos do RNAr 16S das morfoespécies de *Anabaena*, (Figura 25, linhas 1-12), mostraram diferentes padrões de migração no DGGE, apresentando desde uma única banda intensa para *A. circinalis* CENA193 (linha 3) até mais de uma banda, como visualizado para as linhagens *A. aphanizomenoides* CENA187/188 (linhas 1 e 2, respectivamente), *A. crassa* CENA195/200/203/206/207 (linhas 4 – 8, respectivamente), *A. cf. fallax* CENA208 (linha 9), *A. flos-aquae* UTCC64 (linha 10) e *A. planctonica* CENA209/211 (linhas 11 e 12 respectivamente) (Tabela 20).



Figura 25 – Eletroforese em Gel com Gradiente desnaturante de fragmentos do RNAr 16S (iniciadores CYA359FGC, CYA781a/b) das linhagens isoladas e material da natureza (Salto Garnde e Billings). O gel foi normalizado utilizando o programa Bionumerics

102

Após a excisão, reamplificação e seqüenciamento das bandas do DGGE, pôde-se perceber que, em sua maioria, os organismos resultantes do alinhamento, e com maior similaridade, foram do gênero *Anabaena*. No entanto, o fragmento do RNAr 16S de *A. aphanizomenoides* CENA188 (banda 1, linha 2 – Figura 25), após o alinhamento, mostrou maior similaridade com *Aphanizomenon aphanizomenoides* ANA235C, ANA217A e ANA237D (Tabela 20). Como discutido anteriormente, esses dois táxons são sinônimos e representam, portanto, a mesma morfoespécie. A análise BLAST da sequência do RNAr 16S da linhagem CENA188 (1411 pb) também apresentou similaridade com *Aph. aphanizomenoides* (Tabela 19), indicando que a região sequenciada (iniciadores CYA359FGC e CYA781Ra/b) possui informação semelhante para as duas metodologias avaliadas. Da mesma forma, *Aph. issatschenkoi* mostrou a maior similaridade obtida para a linhagem *A. cf. fallax* CENA208, após análise BLAST, considerando as bandas 8 e 9 excisadas do gel de DGGE, e a sequência do RNAr 16S (1411 pb) da mesma linhagem (Tabela 19).

Dentre as morfoespécies de Anabaena, o padrão de separação dos fragmentos pôde diferenciar duas morfoespécies, A. cicinalis (banda 2) e A. flos-aquae (banda 10). Porém, a região amplificada do RNAr 16S e submetida ao DGGE, não pôde discriminar as outras linhagens de Anabaena, principalmente pela ocorrência de mais de uma banda por linhagem ou de bandas na mesma região do gel, por exemplo bandas 1, 3, 5 e 11 (Figura 25). A ocorrência de múltiplas bandas pode ser explicada pela existência de mais de uma cópia do RNAr 16S e/ou pela formação de "heteroduplex" (CROSBIE; POCKL; WEISSE, 2003, NIKOLAUSZ et al., 2005). Em se tratando de culturas puras, a presença de mais de uma banda de RNAr 16S nos géis de DGGE pode significar que os organismos possuem mais de uma cópia deste gene em seus genomas. Em cianobactérias, duas cópias do gene que codifica para o RNAr 16S foram observadas em quatro diferentes gêneros (N. muscorum, Synechocystis PCC6803 e PCC7002, Synechococcus PCC6301 e P. marinus SS120) (CHEN; WIDGER, 1993; KANEKO et al., 1996a, b; STREHL et al., 1999). Recentemente, constatou-se a presença de até cinco cópias desse gene no genoma de cianobactérias heterocitadas (ITEMAN et al., 2002; RAJANIEMI et al., 2005), que podem superestimar o grupo de organismos em análises por DGGE (ACINAS et al., 2004). Assim, a amplificação da região 359-781 do RNAr 16S não resultou em uma única banda para a maioria das morfoespécies de Anabaena avaliadas neste estudo. Contudo, as análises

103

BLAST para essas linhagens revelaram que a região analisada apresenta informação genética semelhante àquela do RNAr 16S total (~ 1500 pb), mostrando-se um bom marcador molecular.

de ger de ponacmanida, apos DGGE					
Linhagem/amostra	Banda	Organismo resultante do alinhamento por Blast	Tamanho do fragmento (pb)	% C / % I	
A. aphanizomenoides CENA188	1	Aph. aphanizomenoides ANA235C	424	92 / 97	
		Aph. aphanizomenoides ANA217A		92 / 97	
		Aph. aphanizomenoides ANA237D		92 / 97	
A. circinalis CENA193	2	A. sigmoidea 0tu38s4	341	99 / 98	
		A. sigmoidea 0tu36s7		99 / 98	
		A. circinalis EH-4		99 / 97	
A. crassa CENA195	3	A. smithii TAC450	396	92 / 94	
		A. smithii TAC432		92 / 94	
		A. smithii TAC431		92 / 94	
	4	<i>Anabaena</i> sp. não cultivada clone Okaro10	405	92 / 85	
		A. circinalis ACMB13		92 / 85	
		A. flos-aquae EH-1		92 / 85	
		A. ucrainica TAC449		92 / 85	
A. crassa CENA200	5	A. smithii TAC450	384	99 / 97	
		A. smithii TAC432		99 / 97	
		A. smithii TAC431		99 / 97	

A. smithii TAC450

A. smithii TAC432

A. smithii TAC431

6

Tabela 20 - Similaridades (%) das sequências de RNAr 16S com outras sequências do GenBank de bandas excisadas<br/>de gel de poliacrilamida, após DGGE(continua)

96/98

96/98

96/98

350

104

Linhagem/amostra	Banda	Organismo resultante do alinhamento por Blast	Tamanho do fragmento (pb)	% C / % I	
A. crassa CENA206	7	A. smithii TAC450	395	96 / 95	
		A. smithii TAC432		96 / 95	
		A. smithii TAC431		96 / 95	
A. cf. fallax CENA208	8	Aph. issatschenkoi 2312	382	99 / 98	
·		Aph. issatschenkoi 2386		99 / 98	
		Aph. issatschenkoi 2389		99 / 98	
	9	Aph. issatschenkoi LMECYA190	400	95 / 89	
		Aph. issatschenkoi LMECYA163		95 / 89	
		Anabaena sp. LMECYA178		95 / 89	
A. flos-aquae UTCC64	10	A. variabilis ATCC29413	404	93 / 89	
v 1		Bactéria não cultivada clones SILK9 e SILK50		93 / 89	
		Anabaena sp. CH1		93 / 89	
		A. variabilis KCTC AG10059		93 / 89	
A. planctonica CEBA211	11	A. smithii TAC450	418	93 / 97	
1		A. smithii TAC432		93 / 97	
		A. smithii TAC431		93 / 97	
Microcystis wesenbergii SPC774	12	M. aeruginosa NIES-101	400	81 / 86	
		M. aeruginosa NIES-298		81 / 86	
		Cianobactéria não cultivada clone NK2 CYA!5		81 / 86	

Tabela 20 - Similaridades (%) das sequências de RNAr 16S com outras sequências do GenBank de bandas excisadas<br/>de gel de poliacrilamida, após DGGE(continuação)

Tabela 20 - Similaridades (%) das sequências o	de RNAr 16S com	outras sequências do	GenBank de bandas	excisadas
de gel de poliacrilamida, após DG	GE			

				(conclusão)
Linhagem/amostra	Banda	Organismo resultante do	Tamanho do	% C / % I
_		alinhamento por Blast	fragmento (pb)	
<i>Nostoc commune</i> UTEX584 (CENA74)	13	N. punctiforme PCC73102	401	92 / 79
		A. variabilis ATCC29413		71 / 79
		Nostoc sp. PCC7120		71 / 79
Phormidium sp. CENA76	14	P. tergestinum CCALA155	425	90 / 84
		P. autumnale UTEX1580		90 / 84
		Oscillatoria tenuis		83 / 84
Salto Grande 1 (natureza)	15	<i>M. aeruginosa</i> NIES-298 Cianobactéria não cultivada clones NK2 CYA15, TH h73 e TH q25	398	91/83
Billings 1 (natureza)	16	Synechococcus sp. 0BB26S03	383	96/93
	10	Synechococcus sp. 0BB22S0	200	96/92
		Cianobactéria não cultivada clone TH1-80		97 / 92
	17	M. aeruginosa PCC7806	403	91/95
		M. aeruginosa NIES-101		91/95
		M. aeruginosa NIES-298		91 / 95

Nota: C – cobertura; I - identidade
A fim de comparar o perfil eletroforético de linhagens do gênero Anabaena com o de cianobactérias de outros gêneros, bandas únicas e mais intensas foram observadas para Cylindrospermum sp. CENA33 (linha 13), Fischerella sp. CENA19 (linha 14), Microcystis novacekii SPC775 (linha 15), M. panniformis SPC702 (16), M. viridis SPC660 (linha 17), M. weseebergii SPC855 (linha 19) e Phormidium sp. CENA76 (linha 21). Já as linhagens M. wesenbergii SPC774 (linha 18), Nostoc commune UTEX584/CENA74 (linha 20), Pseudanabaena galeata SPC772 (linha 22) e P. mucicola SPC782 (linha 23) apresentaram uma banda intensa e outras de menor intensidade (Figura 25). Dentre as bandas seqüenciadas (12, 13 e 14), houve correspondência entre as sequências das linhagens avaliadas (Microcystis wesenbergii SPC774, Nostoc commune UTEX584/CENA74 e Phormidium sp. CENA76) com organismos dos mesmos gêneros, com base na análise BLAST. (Tabela 20). As sequências com maior similaridade resultantes dessa comparação foram M. aeruginosa NIES-298, N. punctiforme PCC73102 e P. tergestinum CCALA155 (Tabela 20), mostrando assim, o grande potencial de identificação em nível de gênero da região 359-781 do RNAr 16S.

As bandas sequenciadas das amostras da natureza revelaram a presença de genótipos relacionados à *Microcystis aeruginosa* (banda 15) na amostra de Salto Grande e à Synechococcus sp. e *M. aeruginosa* na amostra do Reservatório Billings (bandas 16 e 17). Isso está de acordo com a especificidade dos iniciadores CYA359F e CYA781a/b (NÜBEL; GARCIA-PICHEL, MUYZER, 1997) para cianobactérias, desenhados principalmente para detecção em amostra da natureza (BOUTTE et al., 2006). Além disso, as duas bandas da natureza (15 e 17) referentes à *Microcystis aeruginosa* apresentaram-se na mesma posição das bandas das linhagens *M. viridis* e *M. wesenbergii*, confirmando o potencial desta região para identificação de gêneros.

As árvores filogenéticas construídas usando fragmentos seqüenciados das bandas extraídas do DGGE (Figura 26) mostraram certa congruência com árvores obtidas por meio das sequências completas (~ 1500 pb) do RNAr 16S (Figuras 20-22). Independente da origem do fragmento, considerando diferentes cópias do RNAr 16S ou produto de heteroduplex, a região analisada possui informação genética similar àquela utilizada para a construção das árvores filogenéticas do RNAr 16S completo. Essa verificação confirma a possibilidade de uso da região 359-781 do RNAr 16S como marcador molecular para cianobactérias em estudos de ecologia. A árvore obtida por meio do sequenciamento dos fragmentos do RNAr 16S, usando os iniciadores



Figura 26 – Árvore filogenética do fragmento do gene do RNAr 16S (421 pb) referente às bandas do DGGE. Está representada a árvore por análise *neighbor-joining* – NJ (Kimura 2-parâmetro). Os valores de bootstrap referem-se às análises por NJ e *maximum parsimony* (MP). As bandas da natureza foram identificadas com os nomes dos organismos mais próximos (Tabela 20) após análise por BLAST (NCBI)

CYA359F e CYA781Ra,b (NÜBEL; GARCIA-PICHEL, MUYZER, 1997), mostram a formação de um agrupamento único para os gêneros *Anabaena* e *Nostoc*, representantes da ordem Nostocales, com altos valores de reamostragem (98% - NJ e 94% - MP) (Figura 26). Da mesma forma, as Figuras 22- 24 mostram a formação de um agrupamento único para *Synechococcus* e *Microcystis*, como comumente verificado para integrantes das ordens Chroococcales.

A região 359-781 do RNAr 16S de cianobactérias mostrou potencial para diferenciação em nível de gêneros, ou até mesmo de espécies, quando submetida à análise por DGGE. Isso foi confirmado pelas análises BLAST e filogenética das bandas excisadas do DGGE. Há, portanto, grande suporte aos trabalhos ecológicos baseados nessa metodologia e ao desenvolvimento de outras técnicas utilizando essa região. Porém, problemas como número de cópias do gene estudado, assim como padronização da técnica (gradiente de desnaturação, tempo de corrida, quantidade de amostra aplicada no gel, formação de heteroduplex) devem ser levados em consideração. Como sugestão para cianobactérias, outras regiões além do RNAr 16S poderiam ser testadas como os genes *rpoC1*, *rbcLX* e *gyrB* para a obtenção de marcadores moleculares específicos (GILL, 2006).

## **3 CONCLUSÕES**

O isolamento das linhagens de *Anabaena* contribuiu para uma melhor análise das características morfológicas e moleculares, além de fornecer informações referentes à fisiologia desses organismos com base nas suas exigências nutricionais (meios de cultura). As estratégias de isolamento de linhagens de *Anabaena*, pescaria e transferência direta dos tricomas para meio de cultivo e inoculação de alíquota da amostra ambiental para posterior isolamento, permitiram o cultivo desse gênero de cianobactéria. As morfoespécies apresentaram demanda nutricional distinta, crescendo em diferentes meios de cultura (AA/4, BGN, BG50 e BGS) e na presença de vitamina B12. Com isso, o presente estudo define estratégias que auxiliarão as pesquisas futuras de isolamento de linhagens de *Anabaena*, o que é importante, principalmente na toxicologia de *Anabaena* presentes nas florações.

As características morfológicas analisadas possibilitaram a diferenciação das morfoespécies *A. aphanizomenoides*, *A. circinalis*, *A. crassa*, *A. cf. fallax* e *A. planctonica*, sendo as dimensões da espira (RES), célula vegetativa (RV), heterócito (RHT), acineto (comprAC) e bainha (diamBA) diacríticos para diferenciação das linhagens brasileiras. No presente, até que novas características sejam analisadas e discriminadas como diacríticas, os caracteres tradicionalmente utilizados na identificação de *Anabaena* devem permanecer válidos.

As análises filogenéticas do gene de RNAr 16S, *rpoC1*, *rbcL* e *tufA* confirmaram a estabilidade das morfoespécies, corroborando, portanto, com a separação das linhagens pelos caracteres morfológicos. Estudos futuros devem solucionar o problema da linhagem *A*. cf. *fallax* CENA208 que está em um ramo separado, porém próximo de *Aph. issatschenkoi*. Atualmente, o gene de RNAr 16S é utilizado para diferenciar os gêneros de cianobactérias e isso ajudará num melhor posicionamento da linhagem CENA208 dentro de *Anabaena/Aphanizomenon*.

A técnica de PCR-DGGE para a região 359-781 do RNAr 16S possibilitou a formação de banda única para *A. circinalis* no PCR-DGGE. Porém, mais de uma banda foi verificada para outras linhagens de *Anabaena*, reforçando a idéia de diversas cópias do RNAr 16S no genoma. Além disso, problemas da técnica como formação de heteroduplex devem ser levados em consideração nas análises de amostras ambientais. A técnica de PCR-DGGE utilizando os iniciadores CYA359F e CYA781Ra/b mostrou-se confiável, pois os fragmentos obtidos possuem informação semelhante àquela do gene do RNAr 16S com ~1410 pb.

## REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M.; WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic. **Nature Reviews**, London, v.6, p. 431-440, 2008.

ACINAS, S.G.; MARCELINO, L.A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. **Journal Bacteriology**, Washington, v.186, p.2629-2635, 2004.

AGUJARO, L. F. Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso: Reservatório de Salto Grande, Americana, SP. 2007. 221 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ALLEN, M.M.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae: I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 30, p. 366-372, 1955.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington: APHA/WEF/AWWA, 1998, 1137 p.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 1-Introduction. Algological Studies, Stuttgart, v.38/39, p.291-302, 1985.

\_\_\_\_\_. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 – Stigonematales. Algological Studies, Amsterdam, v. 59, p. 1-73, 1990.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, Washington, v. 55, p. 539-552, 2006.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio-Médicas. Belém, Pára, Brasil, 2007.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, Dordrecht, v.6, p.261-265, 1994.

BAGATINI, I.L. Associação de Bactérias à Cápsula de Anabaena spiroides (Cyanobacteria) em cultura. 2008. 70 p. Dissertação (Mestre em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

BAKER, P.D.; HUMPAGE, A.R. Toxicity Associated with Commonly Occurring Cyanobacteria in Surface Waters of the Murray-Darling Basin, Australia. Australian Journal of Marine & Freshwater Research, Melbourne, v.45, p.773-86, 1994.

BARROS, L.P.C.; MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S. Determination of optimized protocols for the extraction of anticholinesterasic compounds in environmental samples containing cyanobacteria species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.23, p.883-889, 2004.

BELTRAN, E.C.; NEILAN, B.A. Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.4468-4474, 2000.

BEN-PORATH, J.; ZEHR, J. P. Detection and Characterization of Cyanobacterial nifH Genes. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, p.880-887, 1994

BERGMAN, B.; RAI, A.N.; RASMUSSEN, U. Cyanobacterial associations. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. (Ed.). Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht: Spring, 2007. p.257-301.

BERGSLAND, K.J.; HASELKORN, R. Evolutionary relationships among Eubacteria, Cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. Journal of Bacteriology, Washington, v.173, p.3446-3455, 1991.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research Microbiology**, Amsterdam, v.154, p.157-164, 2003.

BEYRUTH, Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; CARVALHO, M.C.; PEREIRA, H.A.S.L. Toxic algae in freshwaters of São Paulo state. In: CORDEIRO-MARINO, M.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; TOMITA, N.; PLASTINO, S. (Ed.). Algae and environment: a general approach. São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 1992. p. 53-64.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1513-1518, 1979.

BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J.; GORHAM, P.R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Ottawa, v.37, p.453-471, 1959.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C.; YUNES, J.S. Cianobactérias tóxicas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.23, p.44-47, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrilamyde Gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v.8, p.93-99. 1987.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 721p, 2001.

BOTES, D.P.; TUIMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, S.J. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Chemical Society **Perkin Transactions 1**, London, p.2311-2318, 1984.

BOTES, D.P.; WESSELS, P.L.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.T.C.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; BARNA, J.C.J.; WILLIAMS, D.H. 1985. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and - YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1, London, p.2747-2748, 1985.

BOURRELLY, P. Les Algues d'eau Douce. Initiation à la systématique III. Les algues bleus et rouges, les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines. Paris : N. Boubée. 1970. 512p.

BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; WILMOTTE, A. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.65, p.542–550, 2006.

BRASIL. Portaria Nº 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. p. 70.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.R.; GORHAM, P.R.; HARADA, K.-I.; YU, M.-J.; KRISHNAMURTHY, T.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.L.; RUNNEGAR, M.T.C.; SKULBERG, O.M.; WATANABE. M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, Oxford, v.26, p. 971-973, 1988.

CARVALHO, M. C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de Reservatórios no Estado de São Paulo**. 2003. 167 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CASTENHOLZ, R. W. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 474-487.

CASTENHOLZ, R.W. Culturing methods for cyanobacteria. Methods in Enzymology, New York, v. 167, p. 68-93, 1988.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria, group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J.Y.; BRYANT, M.P.; PFENNING; N; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bateriology,** Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. v.3.

CHEN, X.; WIDGER, W.R. Physical genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7002. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.5106-5116, 1993.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water, a guide to public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, WHO, 1999.

CHRISTOFFERSEN, K. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. **Phycologia**, Amsterdam, v.35, p.42-50, 1996.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 37, p.1181-1185. 1995.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.203, p.264-272, 2005.

COLEMAN, M.L.; SULLIVAN, M. B.; MARTINY, A. C.; STEGLICH, C.; BARRY, K.; DELONG, E. F.; CHISHOLM, S. W. Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. **Science**, Gardenvale, v. 311, p.1768-1770, 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Considerações sobre aspectos limnológicos do Reservatório Jundiaí. São Paulo:CETESB, 1996. Série Relatórios.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo,** São Paulo:CETESB, 2003. (Série Relatórios).

COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. **Iheringia - Série Botânica**, Porto Alegre, v.45, p.69-74, 1994.

CRONBERG, G.; KOMÁREK, J. Some nostocalean Cyanoprokaryotes from lentic habitats of Eastern and Southern Africa. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.78, 71-106, 2004.

CROSBIE, N. D., M. POCKL AND T. WEISSE. Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p.361-370, 2003.

CURRIER, T.C.; HAURY, J.F.; WOLK, P. Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous cyanobacterium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, p. 1556-1562, 1977.

CYBIS, L.F.A.; BENDATI, M.M.; MAIZONAVE, C.R.M.; WERNER, V.R.; DOMINGUES, C.D. **Manual para estudos de cianobactérias planctonicas em mananciais de abastecimento público**: caso da represa lomba do sabão e lago Guaíba. Porto Alegre, Rio Grande Do Sul. Porto Alegre: Palotti, 2006. v. 1. 64 p.

DEBERDT, G.L.B. **Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia** (**Reservatório Salto Grande – Americana – SP**). 2002. 207 p. Tese (Doutorado em Ci) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2002.

DELWICHE, C.F.; KUHSEL, M.; PALMER, J.D. Phylogenetic Analysis of *tufA* Sequences Indicates a Cyanobacterial Origin of All Plastids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v.4, p.110-128, 1995.

DESIKACHARY, T.V. Cyanophyta. Monograph on Algae. New Delhi: ICAR, PREM NATH. 1959. 686p.

DOW, C.S.; SWOBODA, U.K. 2000. Cyanotoxins. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. The ecology of Cyanobacteria. The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. p. 613-632.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Research, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL. M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERGUSSON, K.M.; SAINT, C.P. Molecular Phylogeny of *Anabaena circinalis* and Its Identification in Environmental Samples by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.4145-4148, 2000.

FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183, 2007.

FEWER, D.P.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; ROUHIAINEN, L.; KRISTENSEN, T.; ROHRLACK, T.; JAKOBSEN, K.S.; SIVONEN, K. Natural occurrence of microcystin synthetase deletion mutants capable of producing microcystins in strains of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria). **Microbiology**, Reading, v.154, p.1007-1014, 2008.

FIORE, M.F.; ETCHEGARAY, A.; LORENZI, A.S.; SILVA, C.S.P. Monitoramento de cianobactérias produtoras de toxinas através de métodos moleculares. In: PEREIRA, R.C.; NASSAR,C. A.G.; MENEZES, M.; TEIXEIRA, V.L. (Ed.). Reunião Brasileira de Ficologia: Formação de Ficólogos, um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2005. p.33-56.

FIORE, M.F.; GENUÁRIO, D. B.; SILVA, C. S. P.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; CANTÚSIO NETO, R.; SILVA-STENICO, M. E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus Fischerella. **Toxicon**, Oxford, 2009. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.010

FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N<sub>2</sub> por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v.1, p.69-96.

FIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 39, p. 159-169, 2000.

FONSECA, I.A.; RODRIGUES, L. Cianobactérias perifíticas em dois ambientes lênticos da planície de inundação do alto Rio Paraná, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, p.821-834, 2005.

FRÉMY, P. Les Myxophycées de L'Afrique Équatoriale Française. Extrait dês Archives de Botanique, Caen, Tome III (1929) Mémoire 2, Caen, 1930. 508p.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In *Rabenhorst's Kryptogamenora*,. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932. v. 14, p. 1-1196.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN de PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews**, London, v.3, p.733-739, 2005.

GILL, A. Molecular characterization of potential geosmin-producing cyanobacteria from lake Ontario. 2006. 186 p. Thesis (Master of Science in Biology) – University of Waterloo, Ontario, 2006.

GILLIS, M.; VANDAMME, P.; DE VOS, P.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. 2001. Polyphasic Taxonomy. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, p.43-48.

GIOVANNARDI, S.; POLLEGIONI, L.; POMATI, F.; ROSSETTI, C.; SACCHI, S.; SESSA, L.; CALAMARI, D. Toxic cyanobacterial blooms in lake Varese (Italy): a multidisciplinary approach. In: LIU, D.L.; Dutka, B.J. **Environmental Toxicology, Special Issue of Cyanobacterial Toxins**, v.14, n.1. John Wiley & Sons, Inc., 1999. p.127-134.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORHAM, P.R.; McLACHLAN, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen der Internationalen Vereiningung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie, Stuttgart, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. Algae. Upper Saddle River: Benjamim-Cummings, 1999. 640p.

GUGGER, M.; LYRA, C.; HENRIKSEN, P.; COUTÉ, A.; HUMBERT, J.-F.; SIVONEN, K. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.1867–1880, 2002.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, Washington, v. 52, p. 696-704, 2003.

HALINEN, K.; FEWER, D.P.; SIHVONEN, L.M.; LYRA, C.; ERONEN, E.; SIVONEN, K. Genetic diversity in strains of the genus *Anabaena* isolated from planktonic and benthic habitats of theGulfof Finland (Baltic Sea). **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v.64, p.199–208, 2008.

HALINEN, K; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K. Direct evidence for production of microcystins by Anabaena strains from the Baltic Sea. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p.6543–6550, 2007.

HENSON, B.J.; HESSELBROCK, S.M.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.493–497, 2004.

HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Characterization of a 4 kb Variant of the *nifD* Element in *Anabaena* sp. Strain ATCC 33047. **Current Microbiology**, New York, v.50, p.129-132, 2005.

HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular Differentiation of the Heterocystous Cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, Based on Complete *Nif*D Sequences. **Current Microbiology**, New York, v.45, p.161-164, 2002.

HINDÁK, F. Morphological variation of four planktic nostocalean cyanophytes-members of the genus *Aphanizomenon* or *Anabaena*? **Hydrobiologia**, Amsterdam, v. 438, p. 107–116, 2000.

HINDÁK, F.; MOUSTAKA, M. T. Planktonic Cyanophytes of Lake Volvi, Greece. Algological Studies, Stuttgart, v. 50–53, p. 497–528, 1988.

HOFFMANN, L. List of generic names of Cyanophyceae/Cyanobacteria in "common use" Version June 22 2007. Prepared for discussion at IAC2007.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. Algological Studies (Cyanobacterial Research 6), Stuttgart, v.117, p.95-115, 2005.

HONDA, R.Y.; MERCANTE, C.T.J.; SANTOS, J.M.V.; ESTEVES, K.E.; CABIANCA, M.A.A.; AZEVEDO, M.T.P. Cianotoxinas em Pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo. In: ESTEVES, K.E.; SANT'ANNA, C.L. **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. Um estudo na Região Metropolitana de São Paulo**. São Carlos: Editora RiMa, 2006. p.105-120.

HORECKÁ, M.; KOMÁREK, J. Taxonomic position of three planctonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. **Preslia**, Praha, v. 51, p. 289–312, 1979.

HUGHES, E. O.; GORHAM, P. R.; ZEHNDER, A. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, Saskatoon, v.4, p.225-236, 1958.

HUMPAGE, A. R.; ROSITANO, J.; BRETAG, A.; BROWN, R.; BAKER, P.; NICHOLSON, B. C.; STEFFENSEN, D. A. Paralytic shellfish poisons from Australian blue-green algal (cyanobacterial) blooms. Australian Journal of Marine & Freshwater Research, Melboune, v.45, p.767-771, 1994.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N. T.; HERDMAN, M. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 481–496, 2002.

JANSON, S.; GRANÉLI, E. Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.1397–1404, 2002.

JARDIM, F.A.; VIANA, T.H. Análise das algas-cianobactérias e cianotoxinas como parâmetro de controle do tratamento da água para abastecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais...** Joinvile: ABES, 2003. 1 CD-ROM.

JARDIM, F.A.; ROLLA, M.E.; VIANNA, L.N.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Primeira detecção de cianobactérias tóxicas em uma represa da CEMIG-São Simão-MG/GO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 8., 2001a, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2001a. 1 CD-ROM.

JARDIM, F.A.; FONSECA, Y.M.F.; VIANNA, L.N.L.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CISCOTTO, P.H.C. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA-Minas Gerais-Brasil. **Bios. Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas**, Belo Horizonte, v. 9, p. 83-91, 2001b.

JARDIM, F.A.; MACHADO, J.N.A.; SCHEMBRI, M.C.A.C.; AZEVEDO, S.M.F.O.; VON SPERLING, E. A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água – Minas Gerais - Brasil. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABES, 2000. 1 CD-ROM.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.35, p.1-9, 2001.

KANEKO, T.; MATSUBAYASHI, T.; SUGITA M.; SUGIURA, M. Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC6301 genome. **Plant Molecular Biology**, v.3, p.193-201, 1996a.

KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, v.3, p.109-136, 1996b.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p. 111-120, 1980.

KLOOS, W. E.; MOHAPATRA, N.; DOBROGOSZ, W.; EZZELL, J. W.; MANCLARK, C. R. Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading v. 31, p. 73–176, 1981.

KOMÁREK, J. The modern classification of cyanoprokaryotes (cyanobacteria). **Oceanological** and Hydrobiological Studies, Gdynia, v. XXXIV, p.5-17, 2005a.

\_\_\_\_\_. Studies on the cyanophytes (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota) of Cuba 11. Freshwater *Anabaena* species. **Preslia**, Praha, v. 77, p. 211-234, 2005b.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). Süsswasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

\_\_\_\_\_. Cyanoprokaryota. 2.Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). Süsswasserflora von Mitteleuropa. Munique: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.

\_\_\_\_\_. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 4. Nostocales. Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies, Stuttgart, v. 82, p. 247-345, 1989.

KOMÁREK J.; HAUER T. (2009). CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. -Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, Disponível em: http://www.cyanodb.cz. Acesso em: 08 fevereiro 2009.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. **Preslia**, Praha, v. 74, p.207-233, 2002.

KOMÁREK, J.; ZAPOMĚLOVÁ, E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus Anabaena = subg. Dolichospermum – 1. Part: coiled types. **Fottea**, Olomouc, v. 7, p. 1-31, 2007.

. E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus Anabaena = subg. *Dolichospermum* – 2. part: straight types. **Fottea**, Olomouc, v. 8, p. 1-14, 2008.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; ELORANTA, P. Planktic blue-green algae (Cyanophyta) from central Finland (Jyväskylä region) with special reference to the genus *Anabaena*. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 67, p. 103–133, 1992.

KONST, H.; MCKERCHER, P.D.; GORHAM, P.R.; ROBERTSON, A.; HOWELL, J. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, Gardenvale, v.29, p.221-228, 1965.

KOSAKOVSKY POND, S.L.; FROST, S.D.W.; MUSE, S.V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics**, Oxford, v.21, p.676-679, 2005.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. O.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: Wiley, 1991. p. 115-175.

LI, R.; WATANABE, M.; WATANABE, M.M. Taxonomic studies of planktic species of *Anabaena* based on morphological characteristics in cultured strains. **Hydrobiologia**, Amsterdam, v. 438, p. 117-138, 2000.

LI, R.; WATANABE, M.M. DNA base composition of planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) and its taxonomic value. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.48, p.77–82, 2002.

LORENZI, A.S. Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos potencialmente produtores de microcistinas. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LUUKKAINEN, R.K.; NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; RINEHART, K.L.; NIEMELA, S. I. Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp., structure of a new hepatotoxin. **Toxicon**, Oxford, v.32, p.133-139, 1994.

LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; GUGGER, M.; VEZIE, C.; SUNDMAN, P.; PAULIN, L.; SIVONEN, K. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.513–526, 2001.

MAIDEN, M.C.J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 60, p.561-588, 2006.

MORETTI, S.; WILM, A.; HIGGINS, D.G.; XENARIOS, I.; NOTREDAME, C. R-Coffee: a web server for accurately aligning noncoding RNA sequences. Nucleic Acids Research, Oxford, v.36, W10-3, 2008.

NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.327-330, 1991.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.693-697, 1997.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A.E. Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3875-3883, 1995.

NEUMANN, U.; CAMPOS, V.; CANTARERO, S.; URRUTIA, H.; HEINZE, R.; WECKESSER, J.; ERHARD, M. Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of *Microcystis* sp. from a Chilean lake. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.23, p.191-197, 2000.

NGUYEN, L.T.T.; CRONBERG, G.; LARSEN, J.; MOESTRUP, Ø. Planktic cyanobacteria from freshwater localities in Thuathien-Hue province, Vietnam. I. Morphology and distribution. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.85, p.1-34, 2007.

NIKOLAUSZ, M.; SIPOS, R.; RÉVÉSZ, S.; SZÉKELY, A.; MÁRIALIGETI, K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 385–390, 2005.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology,** Amsterdam, v. 302, p. 205-17, 2000.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3327-3332, 1997.

OLIVEIRA, M.S.B.; OLIVEIRA, N.A.; DAINESI, M.B.; CARDOSO, E.J.B.N. Ocorrência de algas cianofíceas em dois solos do Município de Piracicaba. **O Solo**, Piracicaba, v.72, p.62-64, 1980.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria. The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

PAERL, H.W. Marine plankton. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria**. The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. p. 121-148.

PALENIK, B.; HASELKORN, R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll-containing prokaryotes. **Nature**, London, v. 355, p. 265-267, 1992.

PAN, X.; CHANG, F.; KANG, L.; LI, G.; LI, D.; LIU, Y.; SHEN, Y.; WEI, Z. Morphological characteristics and phylogenetic relationship of *Anabaena* species from Lakes Dianchi and Erhai, China. **Hydrobiologia**, Amsterdam, v. 614, p. 353-362, 2008.

PARK, H.; NAMIKOSHI, M.; BRITTAIN, S.M.; CARMICHAEL, W.W.; MURPHY, T. D-Leu(1) microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.855-62, 2001.

PARK, H.; WATANABE, M.F. Toxic *Microcystis* in Eutrophic Lakes, Chapter 4. p. 57-78. In:WATANABE, M.F. **Toxic** *Microcystis*. Boca Raton: CRC Press, 1996.

POMATI, F.; BURNS, B.P.; NEILAN, B.A. Identification of an Na-dependent transporter associated with saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 70, p. 4711-4719, 2004.

PRASANNA, R.; KUMAR, R.; SOOD, A.; PRASANNA, B.M.; SINGH, P.K. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. **Microbiological Research**, Jena, v.161, p.187-202, 2006.

PÜHLER, G.; LEFFERST, H.; GROPP, F.; PALM, P.; KLENK, H.-P.; LOTTSPEICH, F.; GARRETT, R.A.; ZILLIG, W. Archaebacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 4569-4573, 1989.

RAJANIEMI, P.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of thegenera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 55, p. 11–26, 2005.

RAJANIEMI-WACKLIN, P. **Biodiversity and phylogeny of planktic cyanobacteria in temperate freshwater lakes** 2006. 69 p. Dissertação (Academic Dissertation in Microbiology), Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, 2006.

RIPPKA, R. Isolation and purification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology,** New York, v. 167, p. 3-27, 1988.

RIPPKA, R.; CASTENHOLZ, R.W.; HERDMAN, M. Subsection IV. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 562-589.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.111, p.1-61, 1979.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 686-692, 2004.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; JAKOBSEN, K.S. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 3453-3461, 1998.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K.S. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2593-2599, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÁNCHEZ-BARACALDO, P.; HAYES, P.K.; BLANK, C.E. Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. **Geobiology**, v. 3, p. 145-165. 2005.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. Algological Studies, Stuttgart, v. 126, p. 251-265, 2008.

SANT'ANNA, C.L.; MELCHER, S.S.; CARVALHO, M.C.; GEMELGO, M.P.; AZEVEDO, M.T. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 1-15, 2007.

SCHNEIDER, G.J.; HASELKORN, R. RNA polymerase subunit homology among Cyanobacteria, other Eubacteria, and Archaebacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.4136-4140, 1988.

SCHOPF, J.W. The fossil record: Tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (ed.).**The ecology of Cyanobacteria.** The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. p. 13-35.

SELA, S.; YOGEV, D.; RAZIN, S.; BERCOVIER, H. Duplication of the *tuf* Gene: a New Insight into the Phylogeny of Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington,v.171, p.581-584, 1989.

SEO, P.S.; YOKOTA, A. The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo. v.49, p.191-203, 2003.

SEVRIN-REYSSAC, J.; PLETIKOSIC, M. Cyanobacteria in fish ponds. Aquaculture, Amsterdam, v. 88, p. 1-20, 1990.

SHIMAMORI, Y.; ABE, T. SASAHARA, T. In vitro response of Anabaena cylindrica to different nitrogen, copper and oxygen levels. **Bulletin of the Yamagata University** (Agricultural Science), Tsuruoka, v. 11, p.757-762. 1993.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. London: E & FN Spon, Chapter 3, 1999. p. 41-112.

ŠMILAUER, P. CANODRAW user's guide v. 3.0. Microcomputer Power, Ithaca, New York. 1992.118p.

SMITH, J.K; PARRY, J.D.; DAY, J.G.; SMITH, R.J. A PCR technique based on the Hip1 interspersed repetitive sequence distinguishes cyanobacterial species and strains. **Microbiology**, Reading, v.144, p.2791–2801, 1998.

SOTERO-SANTOS, R.B.; CARVALHO, E.G; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; ROCHA, O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* Bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). **Harmful Algae**, Nwe York, v.7, p.590-598, 2008.

SOUZA, R.C.R.; CARVALHO, M.C.; TRUZZI, A.C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolloszynska) Seenayya et Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 13, p. 73-81, 1998.

SPOOF, L.; BERG, K.A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTO, L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology,** New York. DOI 10.1002/tox.20216, p. 552-560, 2006.

STREHL, B.; HOLTZENDORFF, J.; PARTENSKY, F.; HESS, W.R. A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)(UAA) and a single copy of the rRNA operon. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.181, p.261-6, 1999.

STÜKEN, A.; CAMPBELL, R. J.; QUESADA, A.; SUKENIK, A.; DADHEECH, P. K.; WIEDNER, C. Genetic and morphologic characterization of four putative cylindrospermopsin producing species of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. Journal of **Plankton Research**. Oxford, Advance Access published on February 18, 2009; doi: doi:10.1093/plankt/fbp011.

TABITA, F.R.; HANSON, T.E.; LI, H.; SATAGOPAN, S.; SINGH, J.; CHAN, S. Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs, **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, p.576-599, 2007

TABOADA, E. ; MACKINNON, J. M.; LUEBBERT, C.C.; GANNON, V.P.J.; NASH, J. H.; RAHN, K. Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing:rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolatesof *Campylobacter jejuni*. **BMC Evolutionary Biology**, London. v.8, p. 229-240, 2008.

TAMAS, I.; SVIRCEV, Z.; ANDERSSON, S.G.E. Determinative Value of a Portion of the *nifH* Sequence for the Genera *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria). **Current Microbiology**, New York, v.41, p.197-200, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANABE, Y.; KASAI, F.; WATANABE, M.M. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa. **Microbiology**, Reading, v. 153, p. 3695-3703, 2007.

TER BRAAK, C.J. F.; ŠMILAUER, P. CANOCO **Reference manual and user's guide to canoco for windows**. Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998. 332 p.

TUCCI, A.; DEBERDT, G.L.B.; DEBERDT, A.J. Análise da comunidade de fitoplâncton do reservatório de Salto Grande (Americana, SP): uma revisão dos estudos desenvolvidos em um sistema eutrófico. In: ESPINDOLA, E.G., LEITE, A.M., DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo): caracterização, impactos e propostas de manejo.** São Carlos, Editora RiMa, 2004, p.107-153.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L.; GENTIL, R. C.; AZEVEDO, M. T. P. Fitoplâncton do Lago das Garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano e eutrófico. **Hoehnea** (São Paulo), São Paulo, v. 33, n. 2, p. 147-175, 2006.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.; CHEN, G.; CHEN, G.-C.; YU, S.-Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, Oxford, v.17, n.6, p.1317-1321, 1996.

VANDAMME, P.; HOMMEZ, J.; VANCANNEYT, M.; MONSIEURS, M.; HOSTE, B.; COOKSON, B. T.; WIRSING von Ko<sup>°</sup>nig, C. H.; KERSTERS, K.; BLACKALL. P. J. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.45, p.37–45, 1995.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

VASCONCELOS, V.; ARAÚJO, F.O. Cianobactérias, Um risco para o Ambiente e para a Saúde Humana. Portugal: Ministério da Saúde, 1994. 24p.

VASCONCELOS, V.M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms colected in Portuguese freshwaters. **Water Research**, Oxford, v.30, p.2377-2384, 1996.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C ; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER H. G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. International Journal of Systematic Bacteriology, Reading, v. 37, p. 463-464, 1987.

WEISE, G.; DREWS, G.; JANN, B.; JANN, K. Identification and analysis of lipopolysaccharide in cell walls of the blue green algae *Anacystis nidulans*. **Archives of Microbiology**, New York, v.71, p.89-98, 1970.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 2006. Disponível em: http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x. Acesso em: 08 maio 2006.

WERNER, V.R. **Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2002. 363 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

WEYANT, R. S.; HOLLIS, D. G.; WEAVER, R. E.; AMIN, M. F. M.; STEIGERWALT, A. G.; O'CONNOR, S. P.; WHITNEY, A. M.; DANESHVAR, M. I.; MOSS, C. W.; BRENNER. D. J. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicaemia. Journal of Clinical Microbiology, Washington v.33, p.1–7, 1995.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria. The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. 669p.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v.203, p. 201-218, 2005.

WILLAME, R.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; WILMOTTE, A.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. **Journal of Phycology**, Malden, v.42, p.1312-1332, 2006.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE D. R.; CASTENHOLZ R. W. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer, , v. 1, p. 487-493, 2001.

WILSON, K.M.; SCHEMBRI, M.A.; BAKER, P.D.; SAINT, C.P. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 332-338, 2000.

WOOD, S.A.; CROWE, A.L.M.; RUCK, J.G.; WEAR, R.G. New records of planktonic cyanobacteria in New Zealand freshwaters. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 43, p.479–492, 2005.

YOKOTA, T.; SUGISAKI, H.; TAKANAMI, M.; KAZIRO, Y. The nucleotide sequence of the cloned tufA gene of Escherichia coli. **Gene**, Louisiana, v.12, p. 25-31, 1980.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) toxins: a resource guide.: AWWARF and American Water Works Association, 1995. 229 p.

YUNES, J.S., CUNHA, N.T., BARROS, L.P., PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. **Comments on Toxicology**, London, v. 9, p. 103-115, 2003.

ZAGATTO, PA.; ARAGÃO, M.A.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. **Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas:** um problema ambiental e de saúde pública. Série Manuais 14/Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) - São Paulo, 1997.

ZAGATTO, PA.; ARAGÃO, M.A; DOMINGUES, D.F.; BURATINI, S.V.; ARAÚJO, R.P.A. Avaliação ecotoxicológica do Reservatório de Guarapiranga, SP, com ênfase nos problemas das algas tóxicas e dos algicidas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FICOLOGIA, 4., 1998, São Paulo. **Anais...**São Paulo, 1998.p. 63-81.

ZANATA, L.H.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Longitudinal processes in Salto Grande reservoir (Americana, SP, Brazil) and its influence in the formation of compartment system. **Brazilian** Journal of Biology, São Carlos, v.62, p. 347-361, 2002.

ZAPOMĚLOVÁ, E; HISEM, D.; ŘEHÁKOVÁ, K.; HROUZEK, P.; JEZBEROVÁ, J.; KOMÁRKOVÀ, J.; KORELUSOVÁ, J.; ZNACHOR, P. Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A*. *crassa* complex (cyanobacteria). Journal of Plankton Research, Oxford, v. 30, p. 1257-1269, 2008.

ZAPOMĚLOVÁ, E; ŘEHÁKOVÁ, K.; ZNACHOR, P.; KOMÁRKOVÁ, J. Morphological diversity of coiled planktonic types of the genus *Anabaena* (cyanobacteria) in natural populations – taxonomic consequences. **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 28, p. 353–371, 2007.

ZEHNDER, A. Isolation and cultivation of large cyanophytes for taxonomic purposes. Algological Studies, Stuttgart, v.38/39, p.281-289, 1985.

## **APÊNDICE 1**

Sequências geradas (RNAr 16S, rpoC1, rbcL e tufA) das linhagens de Anabaena.

#### SEQUÊNCIAS RNAr 16S

>Anabaena aphanizomenoides CENA188 16S rRNA sequence 1411 bp GATGAACGCTGG CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACTCTTCGGAGTTAGCGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTT GGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGATTTATCGCC TGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACC AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC GGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAGTGACGGTACTTGAGG AATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTACTGA AAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTCAACCCTGTAAGAGCAGTGGAAACT ACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGAC CGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGGAGTAC GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG ACATCCTGCGAATCTCGGTGAAAGCTGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGG CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC TAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCC CAACCGTTTGGAGGGGGGGGGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Anabaena crassa CENA207 16S rRNA sequence 1411 bp GATGAACGCTGGCG

GTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGG AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGGGGGGGAAAGGCTTGCTGCCTG AAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGACTACCAA GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAGGAGAGCACTGGGGAATCTCCGCAA AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGG GTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGAGGAAT AAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGCGGTAATACGGAGGATGCAA GCGTTATCCGGAATGATTGGGCCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCAATGAAG TCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACA AAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGA GACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCC CAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCGACC CGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCA GGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA TGTCACGAATCCTGTAGAAATATAGGAGTGCCTTAGGGAGCGTGAACACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCAC TCTAGAGAGACTGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA AGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACG GACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGC TCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTA GTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCCA ACCGCAAGGGGGGGGGGGGCTGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena cf. fallax CENA208 16S rRNA sequence 1411 bp GATGAACGCTGG

CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTTTTAGGACATAGTGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACCACT GGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCC TGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCTTACC AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC GGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAAATGACGGTACCTGAGG AATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGTAGTGA AAGTCTGCTGTTAAAGAGTCACGCTCAACGTGATGAGAGCAGTGGAAACT ACACAACTAGAGTACGGTTGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTCTGCTAGAC CTGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTATCG ACCCGAGCCGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGGAGTAC GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG ACATGTCACGAATTTCATTGAAAGATGGAAGTGCCTTAGGGAGCGTGAAC ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTATTTAGTTGCCAGCATAAAGATGGG CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAGTCAGCATGCCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTC CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCATAAACCGGG GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC TAGTAATTGCGGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCC CAACCTTTTGGGGGGGGGGGGGCTGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena crassa CENA196 16S rRNA sequence 1410 bp GATGAACGCTGGCG

 GTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGAGGAAT AAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA GCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAG TCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACA AAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGA GACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCC CAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCGACC CGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCA GGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTCGACA TGTCACGAATCCTGTAGAAATATAGGAGTGCCTTAGGGAGCGTGAACACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCAC TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA GTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG ACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGCT CAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAG TAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCCAA CCGCAAGGGGGGGGGGGGCTGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena crassa CENA205 16S rRNA sequence 1410 bp
GATGAACGCTGG

CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTTCAGGTCGGGGGACAACCACT GGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCC TGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGACTACC AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC GGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGAGGA ATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGC AAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAA AGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTA CAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCC GAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAC CCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCGA CCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACG CAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA CATGTCACGAATCCTGTAGAAATATAGGAGTGCCTTAGGGAGCGTGAACA CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGC ACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTAC GGACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAG CTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCT AGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTAC ACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCC AACCGCAAGGGGGGGGGGGGGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena flos-aquae UTCC64 16S rRNA sequence 1413 bp GATGAACGCTGGCG GTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTCGGATTTAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTCTAGGTCGGGGACAACCACTGG AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGATTTATTGCCTA GAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAA GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGG GTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAA TAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA AGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCACTGTAA GTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTCAACCTTGTAAAGGCAGTGGAAACTAC AGAGCTAGAGTACGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCG TAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACC CCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGAC CCGAGCCGTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGC ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG AGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGAC ATGTCGCGAATCTTCTTGAAAGGGAAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACAC AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCA CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA AGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACG GACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGTAAACCGTAGC TCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTA GTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGCAACGCCCGAAGTCATTACTCCA ACCATTCGTGGGGGGGGGGGGGGCCTAAGGCAGTGCTGGTGACTGGGGGTGAA

>Anabaena crassa CENA206 16S rRNA sequence 1415 bp GATGAACGCTGGCG

GTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGG AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTG AAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGACTACCAA GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGG GTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGAGGAAT AAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA GCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAG TCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACA AAGCTAGAGTTTGGTCGGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGA GACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCC CAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCGACC CGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCA GGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA TGTCACGAATCCTGTAGAAATATAGGAGTGCCTTAGGGAGCGTGAACACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCAC TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA GTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG ACAAAGGGCAGCGACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGCT CAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAG TAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCCAA CCGCAAGGGGGGGGGGTGCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAAGTCG Т

>Anabaena crassa CENA202 16S rRNA sequence 1436 bp
GATGAACGCTAGCG

GCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAGTTACTTTCGGGTAATGAGA CCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTTTACAGGGGAAT AGCCCAGAGAAATTTGGATTAATGCCCCATAGTATTATTGAATGGCATCA TTTAATAATTAAAGTTCCAACGGTAAAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGT TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGGGTAGGGGTCCTGA GAGGGAGATCCCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG AGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT ACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGA AGAAGAAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGT AAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCA ACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGA AGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCT AGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATG GATACTAGGCGTAGCTCGTATCGACCCGAGCTGTGCCGGGGCTAACGCGT TAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAAC GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCACGAATCCTGTAGAAATATA GGAGTGCCTTAGGGGGGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTT TTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGG GCTACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGACACAGCGATG TGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACT CGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAG TGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTT TAGGACTGATGGCTGGGGTGAA

>Anabaena circinalis CENA190 16S rRNA sequence 1410 bp GATGAACGCTGGCG

GTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGG AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGGGGTGAAAGGCTTGCTGCCTG AAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGACTACCAA GGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTTGG GTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGAGGAAT AAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA GCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAG TCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGAGCAGTGGAAACTACA AAGCTAGAGTTTGGTCGGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGA GACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCC CAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCGACC CGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCA GGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA TGTCACGAATCCTGTGGAAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAACACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCAC TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA GTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG ACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTAGCT CAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGGGGAATCGCCAG TAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCCAA CCTTTTGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena circinalis CENA191 16S rRNA sequence 1410 bp GATGAACGCTGGCGGTATGCTT

AACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAATCTACCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA GAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTA AGAGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA AGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCT CAGGGAAGAAGAATGACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGG TGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGAGCAGTGGAAACTA CAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGGCAGAGGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACG AAAGCTAGGGGGGGGGATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATA CTAGGCGTAGCTCGTATCGACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCT GGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCACGA ATCCTGTGGAAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCG TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCTTTTAG TTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG AGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTAC GGACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAG ATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATA CTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTC ACGCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACT GGGGTGAA

>Anabaena circinalis CENA193 16S rRNA sequence 1410 bp GATGAACGCTGGCGGTATGCTT

AACACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAATCTACCTTCAGGTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA GAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTA AGAGACTACCAAGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA AGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCCCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCT CAGGGAAGAAGAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGG TGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGAGCAGTGGAAACTA CAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACG AAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGCCCTAGCCGTAAACGATGGATA CTAGGCGTAGCTCGTATCGACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCCGCCT GGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCACGA ATCCTGTGGAAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCG TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAG TTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTAC GGACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAG ATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATA CTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTC ACGCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACT GGGGTGAA

>Anabaena crassa CENA199 16S rRNA sequence 1410 bp GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA

CACATGCAAGTCGAACGATGTCTTAGGACATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGA ATCTACCTTCAGGTCGGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGA GGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAG AGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAG CCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCA GGGAAGAAGAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTG GCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACA AAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT CAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACGAA AGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACT AGGCGTAGCTCGTATCGACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG GGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCACGAAT CCTGTAGAAATATAGGAGTGCCTTAGGGAGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTT GCCAGCATTAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG ATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG ACAAAGGGCAGCGACACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGCTCAGTTCAGAT CGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACT GCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCAC GCCCGAAGTCGTTACCCCAACCGCAAGGGGGGGGGGTGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGG GGTGAA

>Anabaena planctonica CENA209 16S rRNA sequence 1411 bp GATGAACGCTGG

CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTTTTAGGAGACAGTGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCCTCAGGTCGGGGACAACCACT GGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCGGCC TGGGGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGGCTACC AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC GGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGG AATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGA AAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAAAGCAGTGGAAACT ACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGC CGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG ACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG ACATGTCACGAATCCTGTGGAAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAAC ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGG CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTA GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC TAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCC CAACCGCAAGGGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAA

>Anabaena planctonica CENA210 16S rRNA sequence 1424 bp GATGAACGCTGG

```
CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTTTTAGGAGACAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCCTCAGGTCGGGGACAACCACT
GGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCC
TGGGGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGAGACTACC
AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
GGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGG
AATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG
CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGA
AAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACT
ACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGC
CGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA
CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG
ACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATGTCACGAATCCTGTGGAAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCC
CAACCGCAAGGGGGGGGGGGTGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTAATC
ACTAGTGAATTC
```

### SEQUÊNCIAS rpoC1

>Anabaena crassa CENA207 rpoC1 sequence 610 bp TGAAGT

>Anabaena crassa CENA196 rpoC1 sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAACT

>Anabaena crassa CENA199 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAACT

> Anabaena circinalis CENA193 rpoC1 sequence 604 bp TAACAAAACCAGAAACAATTAATTACCGGACTCTCAAGCCAGAAATGGAC GGTTTGTTCTGTGAGCGGATTTTTGGACCGGCCAAGGACTGGGAGTGTCA CTGTGGTAAATATAAGCGTGTTCGCCATAGAGGTATAGTTTGCGAGCGCT GTGGTGTGGAAGTAACGGAGTCTCGTGTCCGTCGTCACAGGATGGGGCTTT ATTAAGTTAGCTGCTCCGGTGGCTCATGTTTGGTATCTCAAGGGGATTCC TAGTATATGCTATTCTCTTGGATATGCCGCTGCGAGATGTGGAGCAGAT TGTTTATTTCAATTCTTACTGTGTGTACGACCGGGTAATGCGGATACTT TGACTTATAAACAATTGCTGAGTGAGGACCAATGGCTAGAAATTGAGGAT GCTATCTATAGTGAAGATTCTCAGTTAGAGGGTGTGGAAGTGGGGTATTGG TGCGGAGGCACTGTTACGGCTTTTGGCGGATATTAATTTGGAGCAGGAG CGGAATCTCTACGGGAGAAATTATTGGCGCTAAGGGACAAAAGCGGGCG AAGTTGATTAAACGTTTGCGGGTGATTGATAATTTCATTGCTACTGGTTC TAAG

>Anabaena circinalis CENA190 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAACAATTAAT

>Anabaena circinalis CENA191 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAA

CAATTAATTACCGGACTCTCAAGCCAGAAATGGACGGTTTGTTCTGTGAGCGGATTTTTG GACCGGCCAAGGACTGGGAGTGTCACTGTGGTAAATATAAGCGTGTTCGCCATAGAGGTA TAGTTTGCGAGCGCTGTGGGTGTGGAAGTAACGGAGTCTCGTGTCCGTCGTCACAGGATGG GCTTTATTAAGTTAGCTGCTCCGGTGGCTCATGTTTGGTATCTCAAGGGGATTCCTAGTT ATATTGCTATTCTCTTGGATATGCCGCTGCGAGATGTGGAGCAGATTGTTTATTTCAATT CTTACTGTGTGTTACGACCGGGTAATGCGGATACTTTGACTTATAAACAATTGCTGAGTG AGGACCAATGGCTAGAAATTGAGGATGCTATCTATAGTGAAGATTCTCAGTTAGAGGGTG TGGAGGTGGGTATTGGTGCGGAGGCACTGTTACGGCTTTTGGCGGATATTAATTTGGAGC AGGAGCCGAATCTCTACGGGGGGAAATTATTGGCGCTAAGGGGACAAAAGCGGGCGAAGT TGATTAAACGTTTGCGGGTGATTGATAATTTCATTGCTACTGGTTCTAAG

>Anabaena crassa CENA205 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAAC TATTAATTACCGGACTCTGAAGCCGGAAATGGATGGTTTGTTCTGTGAGCGGATTTTTGG ACCGGCTAAGGACTGGGAGTGTCACTGTGGTAAATATAAGCGTGTTCGGCATAGAGGTAT AGTTTGCGAGCGCTGTGGGTGTGGAAGTAACGGAGTCTCGTGTCCGTCGTCACAGGATGGG CTTTATTAAATTAGCTGCTCCGGTGGGCTCATGTTTGGTATCTCAAGGGTATTCCTAGTTA TATTGCTATTCTCTTGGATATGCCGCTGCGGGATGTGGAGCAAATTGTTTATTTCAATTC TTACTGTGTATTACGACCGGGTAATGCGGATACTTTAACTTATAAACAACTGCTGAGTGA GGATCAATGGCTAGAGATTGAGGATGCTATCTATAGTGAGGATTCTCAGTTGGAGGGTGT GGAAGTGGGTATTGGTGCGGAGGCACTATTACGGCTTTTGGCGGATATTAATTTGGAGCA GGAACCGGAGGCTTTACGGGAGGAAATTGCTAATGCGAAGGGACAAAAGCGGGCGAAGTT GATTAAACGTTTGCGGGTGATTGATAATTTCATTGCTACTGGTTCTAAG

# >Anabaena crassa CENA206 rpoC1 sequence 610 bp TGAAGTAACAAAACCAGAAACTATTAATTACCGGACTCTG

>Anabaena cf. fallax CENA208 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTTACAAAGCCAGAAA

CTATAAATTACCGTACTTTAAAACCGGAGATGGATGGCTTGTTCTGCGAGCGCATCTTTG GTCCGGCTAAAGATTGGGAATGCCATTGTGGTAAGTATAAGAGAGTTCGTCACAGAGGAA TTGTGTGTGAGCGCTGTGGCGTAGAAGTGACTGAATCACGAGTGCGCCGCCATCGCATGG GTTACATTAAACTCGCCGCACCTGTCGCTCACGTTTGGTACCTCAAAGGCATTCCCAGCT ATATCTCCATCCTGCTAGATATGCCCTTACGGGATGTGGAGCAAATCGTTTATTTCAATT CCTATGTTGTTCTTAGTCCCGGCAATGCTGAAACTTCAACTTACAAGCAGTTACTGAGTG AAGACCAGTGGCTGGAAATCGAAGACCAAATTTATAGCGAGGGTTCTACACTTCGAGGGG TAGAGGTTGGTATTGGTGCAGAAGCCTTGTTGCGATTACTCGCCGATATCCACTTAGAAG AAGAAGCTGAATCCTTGCGGGAAGAAATTGGTACCGCCAAAGGTCAAAAGCGGGCAAAGC TCATTAAACGGCTACGGGTGATTGACAACTTCATCGCCACTGGTTCTAAG

>Anabaena planctonica CENA209 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTGA

>Anabaena planctonica CENA210 *rpoC1* sequence 610 bp TGAAGTGA

 GTGTAGAAGTTACCGAATCCCGTGTTCGTCGTCACAGGATGGGCTTTATT AAGTTGGCTGCTCCTGTGGCTCATGTTTGGTATCTCAAGGGGATTCCTAG TTATATTGCTATTCTCTTGGATATGCCTTTACGAGATGTGGAGCAAATTG TTTATTTTAATTCTTACTGCGTGTTGCGTCCGGGTAATGCGGATACTTTG ACTTATAAGCAACTCTTGAGTGAGGATCAATGGCTGGAAGTTGAGGATGC TATTTATAGTGAAGATTCTCAATTGGAAGGTGTGGAAGTGGGGTGTTGGTG CAGAAGCACTATTACGGCTTTTGGCGGATATTAATTTGGAAGCAGGAGGCG GAGTCTCTACGGGAGAAATTGCTAACGCGAAGGGACAAAAGCGGGCGAA GTTAATTAAACGTTTGCGGGTAATTGATAATTTATCGCTACTGGTTCTA AG

#### SEQUÊNCIAS rbcL

> Anabaena aphanizomenoides CENA188 rbcL sequence 766 bp CAACTCTG

CTCCTTTCCAACGTTGGAGAGACCGTTTCTTGTTTGTAGCAGAAGCGATC GAAAAAGCACAAGCAGAAACCGGCGAAATCAAAGGTCACTACTTAAACGT AACCGCGCCTACCTGCGAAGAAATGCTCAAGCGTGCTGAGTTCGCTAAAG AACTCGAAATGCCCATCATCATGCACGACTACTTGACCGCAGGTTTCACC GCTAACACCACCTTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAACGGTCTGTTGTTGCA CATCCACCGCGCGATGCACGCTGTAATTGACCGTCAAAAGAACCGCGGTA TCCACTTCCGTGTATTAGCTAAAACCCTGCGGATGTCCGGTGGTGACCAC ATCCACACTGGTACTGTTGTGGGTAAATTGGAAGGTGAACGCGGCATCAC AATGGGCTTCGTTGACTTGCTACGTGAAAACTATGTTGAGCAAGACAAGT CTCGTGGTATCTACTTTACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATG GCAGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATATGCCCGCATTGGTTGA AATCTTCGGTGATGACTCTGTATTACAATTTGGTGGTGGTACACTTGGTC ACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCTAACCGCGTAGCATTAGAA GCTTGTATCCAAGCCCGTAACGAAGGACGCAACTTGGCTCGTGAAGGTAA CGACATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAACTAGCTGTTGCTT GCGAACTG

>Anabaena crassa CENA207 rbcL sequence 722 bp TAGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCAAGCGGAAACCGGCGAAATCAAAGGT CACTACCTCAACGTTACCGCCCCCCCCCCGCGAAGAAATGTTGAAACGGGC TGAGTACGCTAAAGAACTCAAACAGCCCATCATCATGCACGACTACCTGA CCGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAAC GGTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTCA GAAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTTGT CTGGTGGTGATCACATCCACACTGGTACAGTTGTTGGTAAATTAGAAGGT GAACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTACGT TGAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCTT TACCTGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATATG CCCGCGTTGGTTGAGATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGG TGGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAACC GCGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATG GCTCGTGAAGGTAACGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGA GTTGGCTGTTGCTTGCGAACTA

>Anabaena cf. fallax CENA208 rbcL sequence 756 bp CCTTTCCAAAGATGGCGCGATCGCTTCTTGTTCGTAGCTGAAGCTATTAA TAAAGCACAAGCAGAAACCGGCGAAATCAAAGGTCACTACCTCAACGTTA CCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGGGCTGAGTACGCTAAAGAA CTCAAACAGCCCATCATCATGCATGACTACCTAACCGCAGGTTTCACCGC TAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAACGGTATTCTGTTGCACA TTCACCGGGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTCAGAAAAACCACGGTATC CACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTTGTCTGGTGGTGATCACAT
CCACACCGGTACAGTTGTTGGTAAGTTGGAAGGTGAACGCGGTATCACTA TGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTACGTTGAGCAAGACAAGTCT CGTGGTATTTACTTCACCCAAGACTGGGCTTCTTTACCTGGTGTAATGGC CGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATATGCCCGCGTTGGTGGAGA TCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGGTGGTACTCTTGGACAC CCTTGGGGTAACGCTCCTGGTGCTACAGCTAACCGCGTAGCTTTAGAAGC TTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATGGCTCGTGAAGGTAACG ATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAGTTGGCTGTTGC GAACTG

>Anabaena crassa CENA196 rbcL sequence 732 bp TTCTTGTTCGTAGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCAAGCGGAAACCGGCGA AATCAAAGGTCACTACCTCAACGTTACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGT TGAAACGGGCTGAGTACGCTAAAGAACTCAAACAGCCCATCATCATGCAC GACTACCTGACCGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTG TCGTGATAACGGTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAA TTGACCGTCAGAAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCT CTCCGCTTGTCTGGTGGTGATCACATCCACACTGGTACAGTTGTTGGTAA ATTAGAAGGTGAACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTG AAAACTACGTTGAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGAC TGGGCTTCTTTACCTGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGT ATGGCATATGCCCGCGTTGGTTGAGATCTTCGGTGATGACTCCGTATTAC AATTCGGTGGTGGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCT ACAGCTAACCGCGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGG ACGTAACATGGCTCGTGAAGGTAACGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGT GGTCTCCTGAGTTGGCTGTTGCTTGCGAACTA

>Anabaena circinalis CENA190 rbcL sequence 758 bp CACCATTCCAAAGATGGCGCGATCGCTTTTTGTTCGTAGCTGAAGCTATC AACAAAGCCCAAGCAGAAACCGGCGAAATCAAAGGTCACTACCTCAACGT TACCGCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGGGCTGAGTACGCTAAAG AACTCAAAATGCCCATTATCATGCACGACTACCTAACCGCAGGTTTCACC GCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAACGGTATTCTGTTGCA CATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTCAGAAAAACCACGGTA TCCACTTCCGCGTATTGGCTAAAGCTCTCCGCTTGTCTGGTGGTGATCAC ATCCACCCGGTACAGTAGTTGGTAAATTAGAAGGTGAACGCGGTATCAC CATGGGCTTCGTTGACCTGTTACGTGAAAACTACGTTGAGCAAGACAAGT CTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCTTTACCGGGTGTAATG GATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGGTGGTACTCTTGGAC ACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAACCGCGTAGCTCTAGAA GCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATGGCTCGTGAAGGTAA CGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAGTTGGCTGTTGCTT GCGAACTG

GATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGGTGGTACTCTTGGAC ACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAACCGCGTAGCTCTAGAA GCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATGGCTCGTGAAGGTAA CGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAGTTGGCTGTTGCTT GCGAACTG

>Anabaena crassa CENA199 rbcL sequence 723 bp GTAGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCAAGCGGAAACCGGCGAAATCAAAGG TCACTACCTCAACGTTACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGGG CTGAGTACGCTAAAGAACTCAAACAGCCCATCATCATGCACGACTACCTG ACCGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAA CGGTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTC AGAAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTTG TCTGGTGGTGATCACATCCACACTGGTACAGTTGTTGGTAAATTAGAAGG TGAACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTACG TTGAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCT TTACCTGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATAT GCCCGCGTTGGTTGAGATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTG GTGGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACCCTCCTGGCGCTACAGCTAAC CGCGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACAT GGCTCGTGAAGGTAACGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTG AGTTGGCTGTTGCTTGCGAACTA

>Anabaena crassa CENA202 rbcL sequence 721 bp AGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCCAAGCGGAAACCGGCGAAATCAAAGGTC ACTACCTCAACGTTACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGGGCT GAGTACGCTAAAGAACTCAAACAGCCCATCATCATGCACGACTACCTGAC CGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAACG GTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTCAG AAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTTGTC TGGTGGTGATCACATCCACACTGGTACAGTTGTTGGTAAATTAGAAGGTG AACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTACGTT GAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCTTT ACCTGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATATGC CCGCGTTGGTTGAGATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGGT GGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAACCG CGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATGG CTCGTGAAGGTAACGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAG TTGGCTGTTGCTTGCGAACTA

>Anabaena circinalis CENA193 rbcL sequence 727 bp GTTCGTAGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCAAGCAGAAACCGGCGAAATCA AAGGTCACTACCTCAACGTTACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAA CGGGCTGAGTACGCCAAAGAACTCAAAATGCCCATTATCATGCACGACTA CCTAACCGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTG ATAACGGTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGAC CGTCAGAAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTGGCTAAAGCTCTCCG CTTGTCTGGTGGTGATCACATCCACACCGGTACAGTAGTTGGTAAATTAG AAGGTGAACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTGTTACGTGAAAAC TACGTTGAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGC TTCTTTACCGGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGC ATATGCCCGCGTTGGTTGAGATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTC GGTGGTGGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGC TAACCGCGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTA ACATGGCTCGTGAAGGTAACGATATTAACCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCT CCTGAGTTGGCTGTTGCTTGCGAACTG

>Anabaena crassa CENA205 rbcL sequence 724 bp CGTAGCTGAAGCTATCAACAAAGCCCCAAGCGGAAACCGGCGAAATCAAAG GTCACTACCTCAACGTTACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGG GCTGAGTACGCTAAAGAACTCAAACAGCCCATCATCATGCACGACTACCT GACCGCAGGTTTCACCGCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATA ACGGTATTCTGTTGCACATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGT CAGAAAAACCACGGTATCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTT GTCTGGTGGTGATCACATCCACACTGGTGCAGTTGTTGGTAAATTAGAAG GTGAACGCGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTAC GTTGAGCAAGACAAGTCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTC TTTACCTGGTGTAATGGCCGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATA TGCCCGCGTTGGTTGAGATCTCCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGT GGTGGTACTCTTGGACACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAA CCGCGTAGCTCTAGAAGCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAGGGACGTAACA TGGCTCGTGAAGGTAACGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCT GAGTTGGCTGTTGCTTGCGAACTA

>Anabaena crassa CENA206 rbcL sequence 758 bp CACCATTCCAAAGATGGCGCGATCGCTTCTTGTTCGTAGCTGAAGCTATC AACAAAGCCCAAGCGGAAATCGGCGAAATCAAAGGTCACTACCTCAACGT TACCGCCCCCACCTGCGAAGAAATGTTGAAACGGGCTGAGTACGCTAAAG AACTCAAACAGCCCATCATCATGCACGACTACCTGACCGCAGGTTTCACC GCTAACACCACATTGGCTCGTTGGTGTCGTGATAACGGTATTCTGTTGCA CATTCACCGTGCTATGCACGCTGTAATTGACCGTCAGAAAAACCACGGTA TCCACTTCCGCGTATTAGCTAAAGCTCTCCGCTTGTCTGGTGGTGATCAC ATCCACACTGGTACAGTTGTTGGTAAATTAGAAGGTGAACGCGGTATCAC CATGGGCTTCGTTGACCTATTACGTGAAAACTACGTTGAGCAAGACAAGT CTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCTTTACCTGGTGTAATG GATCTTCGGTGATGACTCCGTATTACAATTCGGTGGTGGTACTCTTGGAC ACCCATGGGGTAACGCTCCTGGCGCTACAGCTAACCGCGTAGCTCTAGAA GCTTGTATCCAAGCTCGTAACGAAGGACGTAACATGGCTCGTGAAGGTAA CGATATTATCCGCGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAGTTGGCTGTTGCTT GCGAACTA

>Anabaena flos-aquae UTCC64 rbcL sequence 757 bp ACCATTCCAAAGATGGCGCGATCGCTTCCTGTTTGTGTCTGATGCTATCA GCAAAGCACAAGCAGAAACAGGCGAAATCAAAGGTCACTACCTCAACGTG ACAGCTCCTACCTGTGAAGAAATGTTGAAGCGGGCTGAGTACGCTAAAGA GCTCAATCAGCCCATCATCATGCACGACTACCTAACAGCAGGTTTCACCG CTAACACCACCTTGGCTCGTTGGTGTCGTGACAACGGCGTTCTACTGCAC ATCCACCGCGCGATGCACGCAGTAATCGACCGTCAAAAGAACCACGGTAT CCACTTCCGTGTATTAGCTAAAGCCCTACGTCTATCTGGTGGTGACCACA TCCACACCGGTACCGTAGTAGGTAAATTGGAAGGTGAACGCGGTATCACA ATGGGCTTCGTTGACCTATTGCGTGAAAACTACGTTGAACAAGACAAGTC TCGCGGTATCTACTTTACCCAAGACTGGGCTTCTTTACCTGGTGTAATGG CAGTTGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCATATGCCCGCGTTGGTAGAA ATCTTCGGTGATGACTCCGTACTGCAATTTGGTGGTGGTACACTCGGACA CCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCTAACCGTGTAGCTTTGGAAG CTTGCGTCCAAGCGCGTAACGAAGGTCGTAACTTGGCTCGTGAAGGTAAC GACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAATTGGCTGTCGCTTG CGAACTG

>Anabaena planctonica CENA209 rbcL sequence 766 bp CAACTCAG CACCATTCCAAAGATGGCGCGATCGTTTCTTGTTCGTAGCTGAAGCTATC AACAAAGCCCAAGCAGAAACCGGCGAAATTAAAGGTCACTACCTCAACGT 

#### SEQUÊNCIAS tufa

> Anabaena aphanizomenoides CENA188 tufA sequence 830 bp ACTATGTGAAAAACATGAT

CACAGGTGCGGCACAAATGGACGGTGGTATCCTTGTAGTGGCTGCTACTGATGGTCCTAT GCCCCAAACTCGTGAACACACTCCTGTTGGCAAAACAAGTAGGTGTTCCCAGCTTGGTTGT CTTCTTGAACAAAGAAGATTTGATGGATGACCCAGAACTTCTGGAATTAGTAGAACTGGA ACTGCGGGAACTACTTACTAGCTATGATTTCCCCGGTGATGACATCCCCATTATCAAAGG TCCTGGTCTACAAGCTTTGGAAGCAATGACTAAGAATCCTAAACTCCCAAAAAGGAGAAAA CCCTGGGTAGATAAAATCTACGAATTGATGGATGCTGTAGATTCCTACATCCCCACTCC TGAGCGTGATGTTGATAAACCCTTCTTGATGGCAGTAGAAGACGTATTCACCATCACAGG TCGTGGTACAGTGGCTACTGGCCGGATTGAACGTGGTAAAGTTAAGGTTGGCGATACAGT TGAGCTAATTGGACTCAAAGATACCCGGAGTACGGCTGTAAACGTGGCGATACAGT GAAGAGTCTCGAAGAAGGTATGGCTGGAGATAGCGCTGGTAACCGGTATCGAGATGTTCAA AAAAGAAGATATTGAACGCGGTATGGACAGCGCTGGTGTATTGCTACGTGGTCTCAA AAAAGAAGATATTGAACGCGGTATGGACAACGCTGGAAAACCCTGGTCCAACC TCAATTTGAAGGTGAAGTTTACGTATGACTGAGAAAGAAGGTGGTCGGAAAACACCATT TTCCGCAGGTTATCGTCCTCAGTTCTATGTACGGACAACTGATGTAACTGGTACTATCA AAAGCAACATCTGATGATGGTAGCGCTGTA

>Anabaena crassa CENA207 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACAGGCGCGGCGCAAATGGATGGAGGCATTCTTGTAG TTGCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG GCAAAACAGGTGGGTGTTCCTAGTCTGGTCGTCTTCTTGAACAAAGAAGA TTTGATGGATGACCCAGAATTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTACGATTTTCCTGGTGATGACATCCCCATTATCAAA >Anabaena planctonica CENA209 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACTGGTGCGGCGCAAATGGATGGAGGCATCCTCGTAG TTGCAGCTACGGATGGTCCTATGCCTCAAACCCGTGAACACATCCTTTA TATGATGGACGATGAAGAATTGATGGAATTGGTAGAACTAGAACTGCGGG AACTGCTCACCAGCTATGATTTTGATGGTGACAATATCCCCATTATCAAA GGTTCAGGTCTCAAGGCTCTGGAAAAAATGACCGCTAATCCCAAAACTCA ACGGGGTGAAGATCCTTGGGTAGACAAAATCTACGAACTCATGGACGCTG TAGATTCTTACATTCCCACTCCTGAGCGGGCTATAGACAAACCATTCTTG ATGGCTGTGGAAGATGTGTTCACCATTACAGGTCGTGGGACTGTGGCTAC TGGACGGATCGAACGCGGTAAAGTTAAGGTTGGCGATACTGTTGAGCTAA TTGGCATCAGAGATACCCGCAGTACAGCCGTGACTGGGATCGAAATGTTT AAGAAGAGTCTTGAAGAAGGTCTGGCTGGCGACAACGCTGGTGTGCTACT GCGCAGTATAAAAAAAGAAGACATTGAGCGCGGTATGGTAATTGCTAAAC CGGGTTCAATTACACCTCATACTCAGTTTGAAGGGGAAGTTTACGTTTTA ACTGAGAAAGAAGGTGGTCGAAAAACACCATTTTTCGCAGGTTATCGTCC TCAGTTTTATGTGCGGACAACTGATGTAACAGGTACAATCAAAGCCTTTA CCTCTGATGACGGTGCAGATGTG

>Anabaena crassa CENA196 tufA sequence 830 bp ACTATGTGA

AGAACATGATCACAGGCGCGGCGCAAATGGATGGAGGCATTCTTGTAGTT GCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTGGC AAAACAGGTGGGTGTTCCTAGTCTGGTCGTCTTCTTGAACAAAGAAGATT TGATGGATGACCCAGAATTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAGAA CTGCTTTCCAGCTACGATTTTCCTGGTGATGACATCCCCATTATCAAAGG ATCAGGTCTCCAAGCTCTCCAAGCAATGACCGCAAATCCCAAAACTCAGC GCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAATGGACGCTGTA GATTCTTATATCCCCACCCCAGAGCGAGCTATAGATAAGCCATTCTTGAT GGCTGTAGAAGACGTATTCTCGATCACAGGTCGTGGTACAGTTGCCACTG GTCGGATTGAACGGGGCGTGGTCAAAGTCGGTGATAACGTAGAGTTGGTA GGTATTAAAGATACCCGCGCTACTACCGTTACTGGGATCGAAATGTTCAA GAAGAGTCTTGATGAAGGTCAAGCAGGAGATAATGCGGGTGTACTCCTGC GAGGTATCCAAAAAGCTGATATTGAACGGGGAATGGTAATCGCTAAACCA AAATCAATTACCCCTCATACTCAGTTTGAAGGTGAAGTTTACGTTTTAAC TGAAAAAGAAGGTGGACGGAAAACTCCATTTTTCTCTGGCTACCGTCCTC AGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCACAGCGTTTACC GCTGATAATGGTGATGCCGCA

>Anabaena planctonica CENA210 tufA sequence 830 bp ACTATGTGA AGAACATGATCACTGGTGCGGCGCAAATGGATGGAGGCATCCTCGTAGTT GCAGCTACGGATGGTTCTATGCCTCAAACCCGTGAACACATCCTTTTAGC >Anabaena circinalis CENA191 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACAGGTGCGGCGCAAATGGATGGAGGTATCTTGGTAG TTGCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG TATGATGGACGATGAAGAGTTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTATGATTTCCCCGGTGATGATATTCCTATCATCAAA **GGTTCCGGTCTGAAAGCTCTCGAAGCAATGACTGCTAATCCCAAAACTCA** GCGCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAATGGACGCTG TAGATTCTTATATCCCCACCCTGAGCGGGCTATAGACAAACCATTCTTG ATGGCTGTAGAAGATGTGTTCACCATCACAGGTCGTGGGACTGTGGCTAC TGGACGGATCGAACGCGGTAAGGTTAAGGCTAACGATAACGTTGAGTTGA TTGGGATCAGAGAAACCCGTAGTACCACTGTTACCGGGATCGAGAGGTTC AAGAAGAGTCTTGATGAAGGTATGGCTGGTGATAACGCTGGTGTACTACT ACGCGGTATGAAAAAAGAAGACATTGAGCGCGGCATGGTAATCGCTAAAC CAGGCTCAATTACACCTCACACTCAGTTTCAAGGTGAAGTGTACGTTTTA ACTGAGAAAGAAGGTGGTCGGAAAACACCATTTTTCGCTGGTTATCGTCC TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCAAGGCCTTTA CTTCTGATGAAGGTGCAAATGTG

```
>Anabaena crassa CENA202 tufA sequence 830 bp
ACTATGT
```

GAAGAACATGATCACAGGCGCGGCGCAAATGGATGGAGGCATTCTTGTAG TTGCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG GCAAAACAGGTGGGTGTTCCTAGTCTGGTCGTCTTCTTGAACAAAGAAGA TTTGATGGATGACCCAGAATTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTACGATTTTCCTGGTGATGACATCCCCATTATCAAA GGATCAGGTCTCCAAGCTCTCCAAGCAATGACCGCAAATCCCAAAACTCA GCGCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAATGGACGCTG TAGATTCTTATATCCCCACCCCAGAGCGAGCTATAGATAAGCCATTCTTG ATGGCTGTAGAAGACGTATTCTCGATCACAGGTCGTGGTACAGTTGCCAC TGGTCGGATTGAACGGGGCGTGGTCAAAGTCGGTGATAACGTAGAGTTGG TAGGTATTAAAGATACCCGCGCTACTACCGTTACTGGGATCGAAATGTTC AAGAAGAGTCTTGATGAAGGTCAAGCAGGAGATAATGCGGGTGTACTCCT GCGAGGTATCCAAAAAGCTGATATTGAACGGGGAATGGTAATCGCTAAAC CAAAATCAATTACCCCTCATACTCAGTTTGAAGGTGAAGTTTACGTTTTA ACTGAAAAAGAAGGTGGACGGAAAACTCCATTTTTCTCTGGCTACCGTCC TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCACAGCGTTTA CCGCTGATAATGGTGATGCCGCA

>Anabaena circinalis CENA193 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACAGGTGCGGCGCAAATGGATGGAGGTATCTTGGTAG TTGCGGCTACGGGTGGTCCTATGCCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG TATGATGGACGATGAAGAGTTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTATGATTTCCCCGGTGATGATATTCCTATCATCAAA GGTTCCGGTCTGAAAGCTCTCGAAGCAATGACTGCTAATCCCAAAACTCA GCGCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAATGGACGCTG TAGATTCTTATATCCCCACCCTGAGCGGGCTATAGACAAACCATTCTTG ATGGCTGTAGAAGATGTGATCACCATCACAGGTCGTGGGACTGTGGCTAC TGGACGGATCGAACGCGGTAAGGTTAAGGTTAACGATAACGTTGAGTTGA TTGGGATCAGAGAAACCCGTAGTACCACTGTTACCGGGATCGAGATGTTC AAGAAGAGTCTTGATGAAGGTATGGCTGGTGATAACGCTGGTGTACTACT ACGCGGTATGAAAAAAGAAGAACATTGAGCGCGGCATGGTAATCGCTAAAC CAGGCTCAATTACACCTCACACTCAGTTTCAAGGTGAAGTGTACGTTTTA ACTGAGAAAGAAGGTGGTCGGAAAACACCATTTTTCGCTGGTTATCGTCC TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCAAGGCCTTTA CTTCTGATGAAGGTGCAAATGTG

>Anabaena crassa CENA205 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACAGGCGCGCGCGCAAATGGATGGAGGCATTCTTGTAG TTGCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG GCGAAACAGGTGGGTGTTCCTAGTCTGGTCGTCTTCTTGAACAAAGAAGA TTTGATGGATGACCCAGAATTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTACGATTTTCCTGGTGATGACATCCCCATTATCAAA GGATCAGGTCTCCAAGCTCTCCAAGCAATGACCGCAAATCCCAAAACTCA GCGCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAATGGACGCTG TAGATTCTTATATCCCCACCCCAGAGCGAGCTATAGATAAGCCATTCTTG ATGGCTGTAGAAGACGTATTCTCGATCACAGGTCGTGGTACAGTTGCCAC TGGTCGGATTGAACGGGGCGTGGTCAAAGTCGGTGATAACGTAGAGTTGG TAGGTATTAAAGATACTCGCTCTACTACCGTTACTGGGATCGAAATGTTC AAGAAGAGTCTTGATGAAGGTCAAGCAGGAGATAATGCGGGTGTACTCCT GCGCGGTATCCAAAAAGCTGATATTGAACGGGGAATGGTAATCGCTAAAC CAAAATCAATTACCCCTCATACTCAGTTTGAAGGTGAAGTTTACGTTTTA ACTGAAAAAGAAGGTGGACGGAAAACTCCATTTTTCTCTGGCTACCGTCC TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCACAGCGTTTA CCGCTGATAATGGTGATGCCGCA

>Anabaena cf. fallax CENA208 tufA sequence 830 bp ACTATGT

TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCAAAGCCTTTA CTTCTGATGAAGGTGCAAATGTG

>Anabaena flos-aquae UTCC64 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAATATGATCACAGGTGCGGCTCAGATGGATGGAGCAATTCTCGTAG TTGCTGCTACCGACGGCCCTATGCCTCAAACCCGTGAACACATCCTACTA TATGATGGAAGACGCTGAACTACTAGAACTAGTAGAACTGGAATTAAGAG AACTGTTGACCGAATACGAATTCGATGGTGATGATATTCCCATCGTTAGA GGTTCAGGTTTGCAAGCTCTCGACGTTATGACCAAGAATCCTAAGACCCA TAGATTCTTATATTCCTGATCCAGAGCGGGGATATAGATAAACCATTCCTG ATGGCGGTAGAAGACGTGTTCTCTATTACCGGTCGTGGTACAGTTGCTAC CGGTCGGATTGAGCGTGGTAAGGTGAAAGTTGGTGATGTTGTAGAACTAG TAGGTATTAGAGATACACGCAACAACTGTTACCGGGATCGAGATGTTC AAGAAGAGTCTCGATGAAGGTATGGCTGGAGACAACGCCGGTGTACTGTT ACGTGGTATTCAAAAAACTGATATTGAACGGGGTATGGTTTTAGCCAAGC CTGGTTCCATCACTCCTCACACCCAATTTGAAGGCGAAGTTTACGTTCTC ACCGAAAAAGAAGGTGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCGCTGGCTACCGTCC TCAATTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATTAAAGCCTTTA CTTCCGATGAAGGTGAAGCAGTA

>Anabaena circinalis CENA190 tufA sequence 830 bp ACTATGT

GAAGAACATGATCACAGGTGCGGCGCAAATGGATGGAGGTATCTTGGTAG TTGCGGCTACGGATGGTCCTATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCTTG TATGATGGACGATGAAGAGTTGCTGGAATTGGTAGAACTAGAACTACGAG AACTGCTTTCCAGCTATGATTTCCCCGGTGATGATATTCCTATCATCAAA GGTTCCGGTCTGAAAGCTCTCGAAGCAATGACTGCTAATCCCAAAACTCA GCGCGGCGAAAATGAGTGGGTAGACAAAATCTACGAATTAGTGGACGCTG TAGATTCTTATATCCCCACCCCTGAGCGGGCTATAGACAAACCATTCTTG ATGGCTGTAGAAGATGTGTTCACCATCACAGGTCGTGGGACTGTGGCTAC TGGACGGATCGAACGCGGTAAGGTTAAGGTTAACGATAACGTTGAGTTGA TTGGGATCAGAGAAACCCGTAGTACCACTGTTACCGGGATCGAGATGTTC AAGAAGAGTCTTGATGAAGGTATGGCTGGTGATAACGCTGGTGTACTACT ACGCGGTATGAAAAAAGAAGACATTGAGCGCGGCATGGTAATCGCTAAAC CAGGCTCAATTACACCTCACACTCAGTTTCAAGGTGAAGTGTACGTTTTA ACTGAGAAAGAAGGTGGTCGGAAAACACCATTTTTCGCTGGTTATCGTCC TCAGTTCTATGTGCGGACAACTGATGTAACTGGTACAATCAAGGCCTTTA CTTCTGATGAAGGTGCAAATGTG

ATGTAACTGGTACAATCACAGCGTTTACCGCTGATAATGGTGATGCCGCA

# **APÊNDICE 2**

## Sequências das bandas excisadas do DGGE

>Banda 1 Anabaena aphanizomenoides CENA188 424 pb

>Banda 2 Anabaena circinalis CENA193 341 pb

AAGAAGAAATNGACGGTTACCTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGC AAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGGTTTGGCTCAAC CAAATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGGCAGAGGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGC GAATGGGATTAGATACCCCAGNTAGTCAC

>Banda 3 Anabaena crassa CENA195 396 pb

TTCTGCTANGCCGACACTGACACTGAGNGGACGAANGCTANGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCTNGTANTCATTG GGCCTT

>Banda 4 Anabaena crassa CENA195 405 pb

TCCTGGGTCGTNAACCTCTTTTCTTCAGGGAAGAAGAAATGACGCGTTANCTGCTCGAATAAGCATCGGNTAACTTCC GTGCCAGGCAGCCGNTGTAATACNGGAGGATGCAAGCGTTATCCCGGAATGATTGGGCGTAACACGGGTCCGTCAGGT GGNATTGAAATGTCTGNCTGTTAAAGAGTCTATCTCAACTAGNATAANAGCAGTGGAAACTACAAAGCTANAGTTTGG TCGGGGGCANANGGAATTCCTGGTGTACCGGTGAANTTGCGTANATATCACGAANAACACCNCTGNTCGAAGGCGCNTC TGCCACCGCCGANACTTGACACTGANGGACGAAANCTACGGNACCGAATGGGATTANACTACCCAGCTNCCTCACCT NCTCTGGCCNGTTCT

#### >Banda 5 Anabaena crassa CENA200 384 pb

GAGNGAGGAATGGCTCTTGNGGTTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGGAAGAAGAAATGACGGTACCTGANGAATAAGCA TCGGCTAACTCCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTC CGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGAGT TTGGTCGGGGCCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTT CTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGNTAGTCA

#### >Banda 6 Anabaena crassa CENA200 350 pb

AGNGGNAAGAAGAAATTGACGGTTACCTNGTAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTA GCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGGACGAAAGCTA GGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCAACTC

#### >Banda 7 Anabaena crassa CENA206 395 pb

GATTTGCTCTTGNGTGTTTGTAAACCTNCTTTTTTCTTCAGGGGAAGAACGAAATGACGGTACCTGGATTGAATAAGC ATCGGCTAACTCCGCTGCCAGCAGCCGCGGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGG TCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTATATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGA GTTTGGTCGGGGCANAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCAGGTGGCGAAGGC GTTCTGCTAGGCCGANACTGACACTGAGGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCATTNT TTTGG

#### >Banda 8 Anabaena cf. fallax CENA208 382 pb

>Banda 9 Anabaena cf. fallax CENA208 400 pb

GCTCTTGCGGTTTGTAAAGCCTCTCTTCTCTCTCTCAGGTAATAACNAAAATGACCGGTTACCTGAAGCGAATAANNCAT CGTGCTAATCTCCGTGCCAGCATGCCGNGGTTAATACGGAGGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGG TCCTGCAGGTGGTAGTGAAAGTCTGCTGTTAAANAGTCACGCTCAACGTGATNAGAGCAGTGGAAACTACNCNANTAN AGTACGGTAGGGGCAGAAGGAATCCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTANATATCAGGAANAACACCGGTGGCGAAAGC NTCTCTGNCTANACCTGTACTGACACTGANGGACGAAANCTAGGGGAGCGAATGGGATTANATACCCCANNNACTCAG CNNTTCCCCG

>Banda 10 Anabaena flos-aquae UTCC64 404 pb

ATNGCTCTTGCGGGTTGTNAACCTGCTTTTNCTCAGGGAGATAAGCAAAGGTGANCGTNCCTGAGGAATAAGCATCGG NTAAGNTCCGTGCCATGCANCCGNGGTTAATACGTGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAACGCGTC CGCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGGTTAAAGAGCAAGGCTCANCCTTGGTAAAGGCNGTGGAAACTACANAGCTATA GTACGTTCGGGGCANAGGGAATTCCTGGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGANTAACACCGGTGGCGAAAGC GCTCTGNCTATGCCGTNACTGANACTGANGGACGAAANCTAGGGGAGCCAATGGGATTACATACCCCAGCTNGTCANC NGCCNCNCTCTATT

#### >Banda 11 Anabaena planctonica CENA211 418 pb

CAATNACCTNNCCTTNGNAGCTNAACCCGCGNTGAGNGGAGGAATNGCTCTTGNGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGG GAAGAAAAAATGACCGTACCTGNGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGGAATACGGAGGAGGATGCA AGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACT AGATAAGAGCAGTGGAAACTACAAAGCTAGAGTTTGGTCGGGGCAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG AATGGGATTAGATACCCCAGNTAGTCAC

>Banda 12 Microcystis wesenbergii SPC774 400 pb

NGAATTGTCTTTTGTGATTCGTAAATCCTCNNCCTCTCAATGGCAAGAACNCTNCTTGNCGNTACTNTGATGAATCAG ACCTCGGTCTAANCTCCGTTGTCCAACANCCGCGGTAATACGGGGTGAGGCAANANTTATCCGGAATTATTGNGCGTA AACGCGTCCGCANGTGGTCACCCNANTCTGTCGTCNAATCAGGTTGCTTAACNACCTANNGGCGGTGNAAACTGGCAT ACTACANAGCAGTAGGGGTAGCANGAATCCCCCANTGTATCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCNGTGGCN AAAGCGTGCTACTTGGGTCTGTATCTGACNCTCACGGCACCAAANCTACGGGAGCGAAAGGGNTTATATACCCCTNNT ACTCACTGNC

>Banda 13 Nostoc commune CENA74 401 pb

CCGAATTGCTTTNNNGNNCCTGNAAACCTCTNNTGTCAGNGGAATAACCACNATTGACNGTGTNCCTGNTGAATANCC ATCGGCGAACCCCGCNTCCNACNCANCCCGCGGTAATACGGAGGATGCNAGCCGTGTCTCCGGAATGATCGGGCNCTA ANGCGTCCGCAGGTGGNNATGTTACTCNGCCGTTAAATAGTCTAGCTCAAGTAGATNNGACCAGTGGAANCTNNATAG CTAGAGTATGTNTNTNGGGNANAGGGANTNCCTGGTGTAGNGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAATAACACNATTGGC CNAANCGCGCTCTGCTAGGTCCGTAACTGACACTGAGGGATTANAGCCNACGGGAGCCNAATGGGATTNAGATACGCC CANGNNCTNAC

>Banda 14 Phormidium sp. CENA76 425 pb

>Banda 15 Amostra ambiental Salto Grande 1 398 pb

GTCTTNGGGATTTGTNAACCTTCTCTTTTGTTCANGGAAGAAGTTTCTGACTCGTACNTGTTTCGAATCANNCTNNGC CTANCTCCGTGCCANCCAGCCGCGGCTAATACNGGGTGANTGCAAGACGTTATCCGGAATTATTNGCGGCGTAACAGC GTCCGGAGGTGGTCAGNCANGTCTGCCGGTCAAATCAGGTNGCTTACCGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGNTCANACT ATANAGCATTAGGGGTAGNANGAATTCCCAGTTGTAGCGGGGAAATGCGTAGAGATTGNGAAGAACATCGGTGGCTAA NGCGTGTCTACTGGNCTGNATCTGACNCNCAGGGACTAAAGTCTATGGNAGCNAAAGGGATTACATANCCCTGNTNGT TAGNCCNG

### >Banda 16 Amostra ambiental Billings 1 383 pb

CTCTNCGGGCTGTAAACCTCTTTTTCTCCACGGAANNAANATCTGACCNTACTTNNGGAATAAANCCACGGNCTAATT CCGTGTCCAGCAGCCGCGGCTAATACTNGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCG GTCTTGCTAAGTCTGTCNTNAAAGCGTGGAGCTTACCTCCATTTCAGCGATGGAAACTGCNAGACTAGAGTGTGGTAG GGGCAGAGGGAATTCCCGGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGGTGGCGAAGGCGCTCTGCT GGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCACGGCG

```
>Banda 17 Amostra ambiental Billings 1 403 pb
```

CTTTGGATTGTAAACCTCTTTTTNTCAAGGAAGAAGTTCTGACCGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAATCTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCA ACGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTANAGAGCAGTANGGGTAGCA NGAATTCCCAGTGTANCGGTGAAATGCGTANANATTGGGAACGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTAT CTGACACTCANGGCACGAAAGCTAGGGGANCGAAAGGGATTATATACCCCTGTAGNCACGTCGTNTNNTGNGGTNCNN NNNCNCCCNTTTT

# Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo