

Carmelia Maria Silva

Diversidade morfológica e estudos moleculares de espécies aerofíticas
dos gêneros *Brasilonema*, *Petalonema* e *Scytonema* (Nostocales,
Cyanobacteria)

São José do Rio Preto

2011

Carmelia Maria Silva

Diversidade morfológica e estudos moleculares de espécies aerofíticas dos gêneros *Brasilonema*, *Petalonema* e *Scytonema* (Nostocales, Cyanobacteria)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, are de Biologia e Sistemática de Microrganismos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", *campus* de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Z. Branco

São José do Rio Preto

2011

Carmelia Maria Silva

Diversidade morfológica e estudos moleculares de espécies aerofíticas dos gêneros *Brasilonema*, *Petalonema* e *Scytonema* (Nostocales, Cyanobacteria)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biologia e Sistemática de Microrganismos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco
Professor Adjunto, UNESP, São José do Rio Preto (SP)

Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna
Pesquisador Científico VI, Instituto de Botânica, São Paulo (SP)

Prof. Dr. Orlando Necchi Jr.
Professor Titular, UNESP, São José do Rio Preto (SP)

São José do Rio Preto, 2011

*Aos meus queridos pais, Carlos e Eurica, às minhas irmãs,
Ana Paula e Laura, e à minha querida sobrinha, Cecília, pelo
apoio e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco pela orientação e pela oportunidade dada.

Ao Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior pelas colaborações ao trabalho.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar por autorizar o uso de seu laboratório para realização de etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Paula Rahal por ter autorizado o uso do Laboratório de Estudos Genômicos para o sequenciamento das amostras.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas, pela amizade e pela união no trabalho de cada dia.

A todos os amigos do Laboratório de Fitovirologia pela ajuda neste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Estudos Genômicos pelo auxílio no sequenciamento das amostras.

A todos os amigos que passaram por esse período comigo, estando longe ou perto.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Introdução.....	08
Hipóteses	12
Objetivos.....	13
Material e métodos	13
Cultura	15
Estudo morfológico	15
Abordagem molecular.....	16
Resultados e discussão.....	20
Estudo taxonômico com base na morfometria.....	20
Família Microchaetaceae.....	20
<i>Petalonema alatum</i> Berkeley.....	20
<i>Petalonema densum</i> (A. Braun) Migula,	21
<i>Petalonema velutinum</i> (Rabenhorst) Migula.....	22
<i>Petalonema</i> sp.1	22
<i>Petalonema</i> sp.2.....	23
Família Scytonemateceae	25
<i>Brasilonema sennae</i> Sant'Anna et al. 2011	25
<i>Brasilonema</i> sp.1	26
<i>Brasilonema</i> sp.2	27
<i>Scytonema burmanicum</i> Skuja	28
<i>Scytonema</i> cf. <i>guyanense</i> Bornet et Flahault	29
<i>Scytonema hofmanii</i> West & West.....	29
<i>Scytonema javanicum</i> (Kützing) Bornet ex Bornet et Flahault	30
<i>Scytonema millei</i> Bornet ex Bornet et Flahault	31
<i>Scytonema</i> cf. <i>mirabile</i> (Dillwyn) Bornet.	32
<i>Scytonema ocellatum</i> Lyngbye ex Bornet et Flahault	32
<i>Scytonema pseudopunctatum</i> Skuja	33
<i>Scytonema punctatum</i> Gardner	34
<i>Scytonema samoense</i> Wille	35
<i>Scytonema</i> sp.1	35
<i>Scytonema</i> sp.2	36
<i>Scytonema</i> sp.3	37
<i>Scytonema</i> sp.4	38
Cultivos	45
Avaliação molecular.....	45
Conclusão.....	56
Literatura citada.....	58
Anexos	68

Resumo

Embora com hábito primariamente aquático, a flora de algas terrestres, em especial de cianobactérias, é relativamente luxuriante e tais organismos desempenham papel ecológico importante. Dentre estes organismos, *Scytonema* é um dos gêneros mais frequentes, abundantes e diversificados em ambientes terrestres e a taxonomia infragenérica tem se revelado problemática. Considerando-se a importância e representatividade do gênero, tornam-se necessárias investigações para melhor definição e distinção de espécies de *Scytonema*, bem como um melhor estabelecimento dos limites com gêneros próximos (*Petalonema* e *Brasilonema*, por exemplo). Tal estudo tem como objetivos aprofundar os estudos taxômicos dos gêneros *Brasilonema*, *Petalone* e *Scytonema*; comparar espécies de *Scytonema* de ambientes aerofíticos brasileiros com registros das espécies encontradas em diferentes ambientes mundiais inicialmente quanto a características morfológicas e, em alguns casos, segundo características moleculares; reavaliar critérios taxonômicos utilizados na classificação; avaliar relações biogeográficas de espécies selecionadas. Os trabalhos de campo resultaram na coleta de 44 amostras com a presença de 22 táxons pertencentes às Nostocales com ramificações falsas. Foram identificadas 14 populações como *Scytonema*, três como *Brasilonema* e cinco como *Petalonema*, sendo descritas morfolologicamente e apresentadas as condições ambientais de ocorrência. Na tentativa de se obter culturas desses organismos, foram utilizados diferentes meios de cultivo, diferentes temperaturas e irradiância, entretanto não foi uma etapa bem sucedida. As análises moleculares foram positivas para sete populações, com sequências de aproximadamente 600 pb. As análises revelaram que há grande similaridade molecular entre espécies do gênero *Brasilonema* e aqueles inicialmente identificados como *Scytonema* no presente estudo. Algumas populações estudadas foram incompatíveis entre as identificações com base na morfologia e com base nos estudos moleculares. Possivelmente as sequências geradas não garantem a identidade das populações, sendo o trecho do rRNA 16S amplificado insuficientemente variável. Os critérios adotados para identificação de Scytonemataceae necessitam de estudos mais aprofundados, pois observou-se elevada

similaridade genética entre organismos identificados como pertencentes a gêneros distintos com base na morfologia. Observou-se uma tendência ao agrupamento de espécies tropicais, fato que deve ser melhor explorado em trabalhos futuros.

Introdução

Devido ao hábito primariamente aquático, parece quase paradoxal a existência de uma flora de algas terrestres relativamente exuberante (PRESCOTT 1984). Porém, vários grupos estão presentes sobre a terra, troncos de árvore ou pedras sendo que os mais comuns são as cianobactérias, as clorofíceas, as diatomáceas e as xantofíceas (METTING 1981, STARKS et al. 1981, JOHANSEN & SHUBERT 2001). A ocorrência quantitativa e qualitativa de tais algas nos diferentes ambientes está relacionada às condições locais (STARKS et al. 1981).

O papel ecológico das algas que se desenvolvem em ambientes aerofíticos é considerado bastante relevante. Como colonizadores primários, constituem a sinúsia inicial em substratos recentemente expostos, onde promovem o desgaste de minerais e criam condições ligeiramente ácidas, devido à produção de ácido carbônico gerado através da fotossíntese (METTING 1981). Algas aerofíticas também são consideradas fatores estabilizadores e melhoradores das propriedades físicas e químicas dos solos pela agregação de partículas (STARKS et al. 1981). A capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico em formas biologicamente assimiláveis torna as cianobactérias elemento de extrema importância nos mais diferentes sistemas ecológicos (BELNAP 2002, ZACKRISSON et al. 2004).

Alguns estudos têm destacado a utilização de certas cianobactérias aerofíticas para a produção de substâncias de alto interesse medicinal. Cianobactérias, por exemplo, representam uma fonte potencial de metabólitos secundários ativos (KREITLOW et al. 1999). Para este mesmo grupo, investigações realizadas nas últimas décadas têm identificado diversos compostos com atividade citotóxica, antifúngica e antiviral (PATTERSON & NOLIS 1997, KUMAR et al. 2000, BOKESCH et al. 2003).

Segundo Johansen & Shubert (2001), um conjunto dissociado de monografias recentes sobre diferentes grupos foi organizado na forma de um tratado taxonômico sobre os eucariotos terrestres por Ettl & Gärtner (1995). Infelizmente, não existe um trabalho

comparável para os táxons de cianobactérias (JOHANSEN & SHUBERT 2001), mesmo considerando-se que este é um dos principais grupos constituintes das comunidades de cianobactérias de ambientes terrestres.

Embora em um número de estudos aquém do necessário, as cianobactérias aerofíticas têm sido abordadas principalmente sob o aspecto taxonômico. Alguns dos trabalhos mais extensos encontrados em literatura enfocaram, em sua maioria, as algas azuis de regiões tropicais do mundo, podendo-se citar os estudos de Sarthou et al. (1995), Büdel et al. (1997, 2002) e Couté et al. (1999). No Brasil, os trabalhos sobre tais organismos são escassos e quase limitados aos de Sant'Anna (1984), Azevedo (1991), Sant'Anna et al. (1991) e Branco et al. (2009). O conhecimento ainda insuficiente da cianoflora de ambientes terrestres revela-se pela relativa frequência de artigos publicados com o único objetivo de descrever novos táxons provenientes de ambientes aerofíticos como, por exemplo, os de Hoffmann (1991), Azevedo & Sant'Anna (1994a, b), Asencio et al. (1996), Flechtner et al. (2002), Komárek (2003), Branco et al. (2006a, b), Fiore et al. (2007), Sant'Anna et al. (2007), Aguiar (2007) e Sant'Anna et al. (2011).

Outro aspecto que deve ser considerado é que a taxonomia de cianobactérias ainda apresenta muitos problemas (HOFFMANN et al. 1999). Tradicionalmente, cianobactérias têm sido classificadas com base em sua morfologia. Esses dados, entretanto, nem sempre são confiáveis (TENEVA et al. 2005), pois estes organismos apresentam grande variabilidade de formas e dimensões. Discute-se que as classificações baseadas apenas nas características morfológicas podem não refletir relacionamentos filogenéticos verdadeiros, já que alguns dos caracteres morfológicos utilizados são fenotipicamente plásticos e podem variar com as condições ambientais (HENSON et al. 2002). Desta maneira, o tratamento botânico tradicional pode resultar em atribuições taxonômicas errôneas (NELISSEN et al. 1995, NEILAN et al. 1997) e até mesmo árvores filogenéticas incongruentes obtidas em trabalhos experimentais podem ser consequência de identificações genéricas ou específicas arbitrárias (HOFFMANN et al. 1999).

Mais recentemente, as características ambientais passaram a ser incluídas nas análises taxonômicas, procurando-se dar robustez às identificações. Tal emprego alicerça-se no conceito de que diferentes unidades taxonômicas morfológicamente definidas possuem adaptabilidade ecológica restrita (KOMÁREK 1985). A ideia de ubiquidade das espécies de cianobactérias não corresponde à realidade, visto que diferentes genomas resultam em amplitudes ecofisiológicas limitadas e, portanto, em uma distribuição ecológica específica.

No entanto, nem sempre a limitação ecológica implica em limite geográfico restrito (KOMÁREK 1985, 1994). A distribuição biogeográfica das espécies de cianobactérias não é um tema de fácil abordagem, pois aspectos metodológicos, como áreas de amostragem, conceito de espécie utilizado e identificações taxonômicas duvidosas, tornam o trabalho de avaliação biogeográfica pouco preciso (HOFFMANN 1994) e, até o momento, restrito às espécies mais bem delimitadas (HOFFMANN 1994, 1996, 1999).

Com o desenvolvimento dos estudos, a utilização de ferramentas moleculares associada ao emprego das abordagens tradicionais tem sido altamente indicada para finalidades taxonômicas e filogenéticas, pois poderão esclarecer diversos hiatos ainda observados na sistemática do grupo. Análises moleculares podem esclarecer quais características taxonômicas são realmente importantes para identificações e alterar ou confirmar a taxonomia baseada apenas em dados morfológicos e/ou ecológicos e têm demonstrado resultados muito positivos.

Henson et al. (2002) trabalharam com a diferenciação molecular dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena* e concluíram que realmente são entidades distintas, confirmando o resultado de análises morfológicas e ecológicas previamente realizadas. Gugger & Hoffmann (2004) estudaram as relações filogenéticas entre os membros de Stigonematales e demonstraram que o tipo de ramificação (falsa ou verdadeira) não é uma característica relevante na filogenia das cianobactérias, como se acreditava até então. Estudos semelhantes (GARCIA-PICHEL et al. 1996, BOYER et al. 2002, CASAMATTA et al. 2005, TENEVA et al. 2005) têm sido realizados com diversas abordagens, buscando estabelecer as relações entre

características morfológicas e moleculares e fornecendo subsídios para a construção de um sistema de classificação mais robusto e bem alicerçado.

A partir dos resultados apresentados por vários dos estudos taxonômicos (p.ex. GARDNER 1927, HOFFMANN 1986, SARTHOU et al. 1995, COUTÉ et al. 1999, BÜDEL et al. 2002, BRANCO et al. 2009), observa-se que *Scytonema* é um dos gêneros mais frequentes, abundantes e diversificados em ambientes terrestres. Suas espécies são comuns especialmente em regiões tropicais (HOFFMANN et al. 1999).

Características taxonômicas como tipo da massa de filamentos, diâmetro dos filamentos e tricomas, comprimento celular, constrição, estrutura e coloração da bainha e posição do heterócito são muito usadas na identificação específica. Do mesmo modo, recomenda-se uma descrição precisa do ambiente, para poder limitar e caracterizar melhor cada espécie. No entanto, variáveis como idade dos indivíduos e características particulares do ambiente podem influenciar e alterar o aspecto morfológico, dificultando a identificação das espécies do gênero. Hoffmann et al. (1999), ao enfatizarem a necessidade de utilização de um esquema de estudo que integre dados morfológicos, ecológicos, biogeográficos, bioquímicos e moleculares, também chamam a atenção para a necessidade de realização de trabalhos mais detalhados para uma melhor definição das espécies de *Scytonema*.

Além da dificuldade de reconhecimento de entidades específicas dentro do próprio gênero, deve-se considerar sua proximidade com outros gêneros e a incerteza em seus limites taxonômicos.

Scytonema é morfológicamente semelhante ao gênero *Petalonema* e as características morfológicas que separam esses dois gêneros são o tamanho, coloração e estrutura da bainha (BOURRELLY, 1985). Segundo este autor, as ramificações são muito similares às de *Scytonema*, mas frequentemente os ramos solitários possuem, em sua base, heterócitos unipolares, como no gênero *Tolypothrix*. Esta proximidade leva a diferentes interpretações sobre a validade dos dois gêneros. Bourrely (1985) inclui ambos em *Scytonema* (em diferentes Seções), pois as variações morfológicas que comumente ocorrem não permitem uma correta distinção taxonômica entre os organismos. Este ponto

de vista é compartilhado por Kukk et al. (2001), que estudaram abundante material encontrado em lagos da Finlândia e observaram grande variação de formas e dimensões, impossibilitando a separação efetiva dos táxons. Geitler (1932), Sant'Anna (1988) e Komárek & Anagnostidis (1989), entretanto, propõem a separação dos dois gêneros principalmente baseada no tipo de ramificação simples com um heterócito na base, frequentemente encontrada nas populações, indicando heteropolaridade dos filamentos. Esta mesma razão levou Komárek & Anagnostidis (1989) a posicionarem *Scytonema* e *Petalonema* em famílias distintas (Scytonemataceae e Microchaetaceae, respectivamente).

Fiore et al. (2007), a partir de estudos de cianobactérias subaéreas em florestas úmidas subtropicais e tropicais do sudeste do Brasil, propuseram o novo gênero *Brasilonema*, morfológicamente similar às espécies de *Scytonema*, mas diferenciando-se deste pela presença de filamentos reunidos em fascículos, geralmente eretos, e ocorrência bastante esporádica de ramificações falsas. Embora as características morfológicas não sejam profundamente distintas, as espécies de *Brasilonema* apresentam uma diferenciação genética (16S rRNA) bastante evidente, posicionando-se em clados distintos daqueles das espécies de *Scytonema* (FIORE et al. 2007, AGUIAR et al. 2008).

Hipóteses

Segundo dados disponíveis em literatura, alguns resultados são esperados como conclusões do presente trabalho: 1. Observação de elevadas riqueza e frequência de ocorrência de espécies do gênero *Scytonema*; 2. Populações de *Brasilonema* e *Petalonema* deverão ser encontradas, mas com frequência de ocorrência mais restrita e menor riqueza de espécies; 3. São esperados registros de novas ocorrências de espécies dos gêneros estudados para os territórios paulista e brasileiro; 4. É possível considerar a descoberta de espécies novas para os gêneros estudados; 5. A análise molecular deverá corroborar os dados sobre filogenia atualmente disponíveis na literatura especializada.

Objetivos

O presente trabalho é proposto com os seguintes objetivos: 1. aprofundar os estudos taxonômicos do gênero *Scytonema*, *Brasilonema* e *Petalonema*; 2. comparar espécies de *Scytonema* de ambientes aerofíticos brasileiros com registros das espécies encontradas em diferentes ambientes mundiais quanto a características morfológicas e moleculares; 3. reavaliar critérios taxonômicos utilizados na classificação; 4. avaliar relações biogeográficas de espécies selecionadas.

Material e métodos

O principal contingente de material biológico estudado foi proveniente de amostras de cianobactérias coletadas na região de mata atlântica ao longo do litoral paulista, na Serra do Mar, e a vegetação pode ser formalmente descrita como floresta ombrófila densa. Foram incluídas também amostras coletadas no Parque Nacional de Itatiaia- RJ.

Parte do material já se encontra disponível na coleção do Laboratório de Ficologia (IBLCE/UNESP – DZB), sendo que novas coletas poderão ser realizadas para acréscimo de novos táxons. A metodologia básica para coleta consistiu de recolhimento de crescimentos visíveis utilizando-se espátula ou canivete. Após o recolhimento, as amostras foram mantidas secas (em temperatura ambiente) em sacos de papel. Além das características macroscópicas das massas, os seguintes parâmetros ambientais foram também anotados para algumas amostras: posição global e altitude (GPS Garmin eTrek Vista), temperatura do ar e da massa de cianobactérias e umidade do ar e da massa de cianobactérias (termohigrômetro Hana Instruments HI8564), pH (papel marcador de pH Merck; leitura a partir de solução do substrato macerado em água deionizada) e irradiância (quantômetro Li-Cor com sensor esférico). Estas características ambientais serviram para prover informações adicionais sobre a descrição ecológica dos táxons.

Tabela 1: Amostras coletadas com organismos de interesse e respectivas coordenadas geográficas e altitude.

Amostra	Município	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
S01, S02	Mogi das Cruzes	23°41'09,0"	46°05'52,0"	787
S03	São Sebastião	23°46'14,0"	45°43'14,0"	22
S04	São Sebastião	23°47'49,0"	45°32'37,0"	53
S05	São Sebastião	23°49'28,0"	45°27'06,0"	1
S06	Caraguatatuba	23°31'15,0"	45°32'15,0"	791
S07	Ubatuba	23°29'39,0"	45°08'38,0"	66
S08, S09, S10, S11	Ubatuba	23°23'06,0"	45°07'19,0"	122
S12, S13	Ubatuba	23°22'02,0"	45°07'24,0"	760
S14, S15, S16	Ubatuba	23°22'37,0"	45°07'07,0"	309
S17, S18, S19	Ubatuba	23°24'50,0'	45°01'43,0"	77
S20	Parati	23°11'54,0"	44°50'00,0"	1034
S21, S22	Cunha	23°09'54,0"	44°50'21,0"	1460
S23, S24, S25	Ubatuba	23°30'34,8"	45°07'54,2"	8
S26	Bertioga	Nd	Nd	Nd
S27	São Sebastião	23°46'15,"	45°42'11,8"	43
S28	São Sebastião	23°46'15,1"	45°42'12,0"	43
S29, S30	São Sebastião	23°46'15,4"	45°42'12,1"	43
S31	Caraguatatuba	23°37'09,3"	45°25'49,4"	17
S32, S33	Caraguatatuba	23°31'16,1"	45°32'14,4"	773
S34	Caraguatatuba	23°35'52,9"	45°26'06,4"	132
S35, S36	Caraguatatuba	23°21'37,6"	45°46'35,7"	160
S37, S38	Ubatuba	23°21'23,0"	44°52'47,6"	90
S39	Caraguatatuba	23°35'24,4"	45°26'30,6"	413
S41	Itatiaia	22°27'32,4"	44°36'25,3"	787
S42	Itatiaia	Nd	Nd	Nd
S43	Ubatuba	23°20'27,5"	44°50'15,6"	50
S44	Itatiaia	Nd	Nd	Nd
S45	Itatiaia	Nd	Nd	Nd

Nd = dados não disponíveis

Cultura

Os organismos, quando necessário, foram hidratados por período de 12 a 24 horas a fim de retomarem a atividade metabólica normal. Após este período, sob lupa, espécimes das diferentes espécies foram selecionados, caracterizados (por meio de medições e registro fotográfico) e previamente limpos para serem inoculados.

As culturas foram realizadas utilizando-se meio BG11 (RIPPKA et al. 1979), líquido e sólido, desprovido de nitrogênio ou com teor reduzido do nutriente para a obtenção de amostras unialgais. Os cultivos foram mantidos em estufas incubadoras sob temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e irradiância ($60\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) constantes com regime de 14:10 horas claro/escuro. Em função da necessidade de obtenção de melhores resultados com o cultivo destes organismos, foram também testados outros meios de cultivo (Bold e água-solo) e temperaturas (15°C e 25°C).

O objetivo principal das culturas é a obtenção de crescimentos unialgais que poderão ser utilizados nos estudos morfológicos e moleculares. Portanto, os inóculos foram periodicamente analisados quanto à presença de contaminantes e, quando necessário, procedimentos para a purificação das culturas (limpeza, repiques, lavagens, etc.) foram realizados. Em função da dificuldade de obtenção de cultivos destes organismos, esta etapa foi realizada tentativamente.

Estudo morfológico

Os táxons abordados foram caracterizados segundo os critérios que incluem parâmetros quali e quantitativos. As observações foram feitas no material proveniente diretamente do campo.

As populações foram estudadas, caracterizadas e fotografadas sob microscópio estereoscópico Carl Zeiss Jena (modelo Laboval 3), microscópio fotônico Carl Zeiss Jena (modelo Jenamed), com câmara clara acoplada ao sistema óptico, microscópio fotônico Olympus (modelo BX-50) com câmara Olympus (modelo PM-20) e também com o uso de

câmera fotográfica Sony (modelo Cyber Shot W320) a partir da imagem geradas nas oculares.

Para as descrições foram observadas características da massa, disposição e cor dos filamentos; foram feitas medidas de diâmetro de filamentos e de tricomas, comprimento de células, diâmetro e largura dos heterócitos, além de observação de coloração e aspecto granular. Para esses dados foram feitas de quatro a cinco lâminas com a amostra a ser estudada e foram medidos trinta filamentos escolhidos aleatoriamente. As ramificações foram descritas como frequentes quando a maioria dos filamentos observados apresentava as mesmas; ocasionais quando os filamentos ramificados observados na lâmina não predominavam; e raras quando ramificações eram observadas com baixíssima frequência.

As abreviaturas compr. (comprimento) e diâm.(diâmetro) e o símbolo n (número de ocorrências da populações dos diferentes táxons nas áreas amostradas) foram usadas para as descrições e detalhes de ocorrência ambiental.

Abordagem molecular

Caracterização molecular das linhagens usando o rRNA 16S

A metodologia utilizada no estudo molecular das espécies de cianobactérias baseou-se nos trabalhos de Neilan et al. (1997) e Lane (1991), considerando-se a utilização de cultivos unialgais. Quando da utilização de material proveniente do campo, adaptações necessárias foram introduzidas.

1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com espécies provenientes da natureza, depois de uma cuidadosa limpeza e separação de outros organismos que eventualmente estivessem ocorrendo em conjunto. A quebra celular foi realizada primeiramente por maceração mecânica, utilizando-se nitrogênio líquido para facilitar o procedimento. Depois do congelamento, a amostra de cianobactéria foi então macerada com auxílio de pistilo de

plástico autoclavado. A quantidade de biomassa utilizada corresponde a aproximadamente ao fundo do *eppendorf*.

Para a extração, foi utilizado rotineiramente o kit Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MoBio Laboratories), segundo as especificações do fabricante.

As amostras foram estocadas à temperatura de -20°C até a próxima etapa.

2. Amplificação do gene rRNA 16S

Nessa primeira etapa do projeto, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para cianobactérias CYA106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'), CYA781R(a) (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') e CYA781R(b) (5'-GACTACAGGGG TATCTAATCCCTTT-3'), descritos por NÜBEL et al. (1997), para obtenção de sequências de aproximadamente 600 pb. A amplificação do rRNA 16S foi realizada utilizando-se o kit "Pure Taq Ready To-Go PCR Beads" (GE Life Science), seguindo-se os protocolos do fabricante.

A termociclagem obedeceu as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Variações destas condições foram empregadas dependendo da necessidade de adequação do protocolo a diferentes situações. A concentração dos produtos amplificados foi avaliada por corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium) e em tampão TBE 1,5x. A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi realizada por meio de comparação com o padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) em sistemas de análise de imagem (fotodocumentador e transiluminador MiniBISPro DNR) e a quantificação, utilizando-se o aparelho Qubit Fluorometer (Invitrogen) com reagentes a partir de 1 μL da amostra do produto de PCR. O produto obtido foi purificado com Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega).

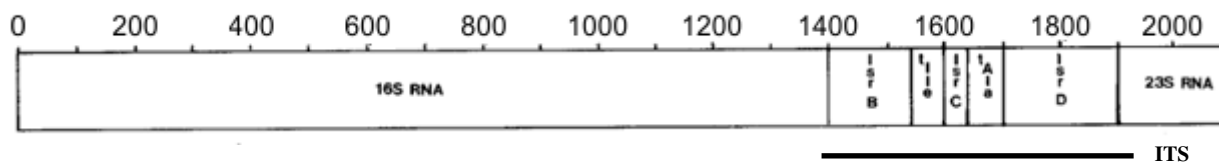


Figura 1: Mapa do *operon* rRNA 16S-23S demonstrando os genes rRNA 16S, a região dos ITS (Espaçadores Transcritos Internos) contendo os genes ISR-B, ISR-C, e ISR-D intercalados pelos genes de tRNA isoleucina (tIle) e alanina (tAla) e o gene rRNA 23S, respectivamente (adaptado de BOYER et al. 2001).

3. Sequenciamento do rRNA 16S

Os *amplicons* foram processados por PCR para sequenciamento usando o “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a reação foram utilizados 200 ng de cada *amplicon*, 5 pmol.μL⁻¹ dos *primers* CYA106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'), CYA781R(a) (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') e CYA781R(b) (5'-GACTACAGGGG TATCTAATCCCTTT-3'), descritos por NÜBEL et al. (1997).

A reação de termociclagem para sequenciamento foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação dos fragmentos parciais de interesse, a precipitação dos mesmos será realizada conforme manual de instruções do kit. Posteriormente, os microtubos com as reações precipitadas foram transferidos para o sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), para o sequenciamento dos fragmentos de DNA por aproximadamente 2,5 horas. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing - Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para detecção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20). Os fragmentos parciais sequenciados foram

alinhados e editados para obtenção dos *contigs* utilizando-se recurso disponibilizado em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>, que se trata de uma versão *online* do programa PHRED/PHRAP/CONSED. Posteriormente foi realizada verificação manual do alinhamento, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999).

As sequências produzidas foram comparadas com outras previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Os registros mais próximos às populações sequenciadas neste estudo foram selecionados para integrar a matriz de dados, visando a análise de semelhança entre os genótipos encontrados e a elaboração da árvore filogenética. A sequência de *Gloeobacter violaceus* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) uma vez que representa um organismo mais primitivo em relação aos abordados neste trabalho.

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software PAUP 4.0b8 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* – SWOFFORD, 2003). Foi construída uma matriz de alinhamento com 29 sequências, incluindo as geradas neste estudo (sete) e as obtidas do GenBank (22). As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de distância (*neighbor joining* – NJ), máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB). Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados como valores de suporte de *bootstrap* com 100 réplicas de buscas heurísticas, para MV, e de probabilidade posterior com duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 500.000 gerações com amostragem a cada 10 gerações, para AB, gerando árvores de consenso com o critério de > 50% de semelhança nos ramos das árvores. O modelo apropriado de evolução do DNA (substituição nucleotídica) foi definido pelo programa Modeltest 3.0 (POSADA & CRANDALL 1998, http://inbio.byu.edu/Faculty/kac/crandall_lab/Computer.html) por meio do critério de Akaike. As análises de MV e AB foram, então, conduzidas com uso do modelo GTR + I + G (*General Time Reversible* com correções para caracteres invariáveis e taxa de variação entre “sites”), com os seguintes parâmetros: distribuição gama = 0,5624; proporção de sítios invariáveis = 0,4036; frequência de bases A

= 0,2632, C = 0,2238, G = 0,3166, T = 0,1964; e matriz da taxa de substituição A-C = 0,9733, A-G = 1,5467, A-T = 1,4316, C-G = 0,3541, C-T = 3,3635. As análises foram realizadas com uso do pacote *MacIntosh Genetic Data Environment* (Mac GDE, Steven Smith) versão 2.4.

A edição das árvores foi realizada utilizando-se o programa *TreeView* v.1.6.1 (PAGE, 1996).

Resultados e discussão

Estudo taxonômico com base na morfometria

As amostras coletadas (n = 45, Tabela 1) resultaram na obtenção de 22 espécies pertencentes à ordem Nostocales e dotadas de ramificações falsas, organismos de interesse do presente estudo. Do total de amostras, 22 táxons foram inicialmente identificados, do ponto de vista de sua morfologia, sendo cinco pertencentes ao gênero *Petalonema*, três ao gênero *Brasilonema* e quatorze a *Scytonema*. Algumas populações não puderam ser identificadas em nível infragenérico devido a incompatibilidades com organismos já descritos em literatura ou necessidade de melhor detalhamento das características dos espécimes.

Família MICROCHAETACEAE

Petalonema alatum Berkeley, Glean. Brit. Alg., 23, 1883.

(Figuras: 2-3)

Massas de filamentos prostrados, emaranhados, verde-acastanhada; filamentos 45,0-70,0 µm diam.; ramificações simples frequentes, duplas ocasionais; bainhas espessas, lamelação divergente, hialinas a amareladas; tricomas constrictos, 8,0-15,0 µm diam.; células arredondadas, 5,0-10,0 µm compr., 0,4 a 1,0 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, esverdeado; heterócitos arredondados, intercalares, 8,0-10,0 µm compr., 5,0-15,0 µm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrências: S23, S24 e S25.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 4-5, irradiância: 100%, temperatura do ar: 24,0°C, porcentagem de irradiância na massa: dados não disponíveis, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 95%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentários: As populações observadas apresentam características métricas e morfológicas de acordo com a descrição para a espécie contida em Uher (2010). As características de bainha descritas por Desikachary (1959) e Uher (2010) também foram observadas nas populações estudadas, apresentando lamelação nitidamente divergente e sem pigmentação (hialinas) nos filamentos jovens e amareladas nas partes mais velhas.

Petalonema densum (A. Braun) Migula, Krypt.-Fl., 2(1): 132, 1907.

(Figuras: 4-5)

Massas de filamentos prostrados, emaranhados, castanho-amareladas; filamentos 24,0-32,0 µm diam.; ramificações simples ocasionais, duplas frequentes; bainhas espessas, lamelação divergente, amarelo-acastanhadas, amareladas nos filamentos jovens; tricomas constrictos, 9,0-10,0 µm diam.; células arredondadas, 6,0-9,0 µm compr., 0,6 a 0,7 vez mais longas que largas; conteúdo celular homogêneo, verde-azulado; heterócitos arredondados, discoides, intercalares, 9,0-10,0 µm compr., 10,0-12,0 µm diam., conteúdo amarelo-esverdeado.

Ocorrência: S32.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 3, irradiância: 120 µmol fótons.m⁻².s⁻¹, porcentagem de irradiância na massa: dados não disponíveis, temperatura do ar: 23,0°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 92%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentários: Segundo a descrição de *Scytonema densum* em Sant'Anna (1984), a espécie apresenta elevada frequência de ramificações simples, do tipo *Tolypothrix* e bainha com lamelação divergente. As características descritas pela autora assemelham-se bastante às da população encontrada no presente trabalho e indicam uma grande proximidade com o

gênero *Petalonema*. Desse modo, em concordância com o proposto por Migula, adotamos a identificação da população como *P. densum*.

Petalonema velutinum (Rabenhorst) Migula, Krypt.-Fl., 2(1): 131, 1907.

(Figuras: 6-8)

Massas de filamentos prostrados dispostos paralelamente, marrom-acastanhadas; filamentos 30,0-35,0 μm diam.; ramificações simples e duplas frequentes; bainhas espessas, lamelação paralela, hialina a amarelo-acastanhadas; tricomas constrictos, 14,0-20,0 μm diam.; células discoides ou em forma de barril, 8,0-15,0 μm compr., 0,7 a 1,0 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, verde escuro; heterócitos arredondados a discoides, 11,0-12,0 μm compr., 12,0-16,0 μm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S06, S35.

Parâmetros ambientais: (n = 2) pH: 5, irradiância: 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porcentagem de irradiância na massa: 24%, temperatura do ar: 20,6°C, temperatura da massa: 19,5°C, umidade relativa do ar: 73%, umidade relativa da massa: 77%, substrato: rocha.

Comentário: As populações estudadas apresentam características bastante semelhantes às descritas por Geitler (1932) e Skinner & Entwisle (2001) para *Petalonema velutinum*, materiais provenientes da Europa e Austrália, respectivamente. Os organismos estudados, entretanto, podem alcançar maiores valores de diâmetro dos tricomas do que aqueles registrados por Geitler (1932; 9,0-15,0 μm diam.) e para Skinner & Entwisle (2001; (4-)6-8(-12) μm diam.). Essa espécie tem sido encontrada em ambiente terrestre úmido em diferentes regiões da Europa.

Petalonema sp.1

(Figuras: 9-10)

Massas de filamentos prostrados, emaranhados, marrons; filamentos 27,0-32,0(-40,0) μm diam.; ramificações duplas e simples frequentes; bainhas espessas, lamelação paralela, castanho-amareladas; tricomas levemente constrictos, 5,0-10,0 μm diam.; células quadráticas

a sub-quadráticas, 4,0-10,0 µm compr., 0,8 a 1,0 vez mais longa que largas; conteúdo celular homogêneo, verde-azulado; heterócitos arredondados, intercalares, 7,0-9,0 µm compr., 8,0-10,0 µm, conteúdo hialino a amarelado.

Ocorrência: S33.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 4, irradiância: dados não disponíveis, porcentagem de irradiância na massa: 100%, temperatura do ar: 23,0°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 92%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentário: A população tem características semelhantes às de *Petalonema densum* (A. Braun) Migula (Tabela 2), mas se diferencia pelas células quadráticas a sub-quadráticas e bainha mais escura, enquanto *P. densum* apresenta células mais arredondadas e bainha mais amarelada, o que pode ocorrer devido à idade dos filamentos.

Petalonema sp.2

(Figuras: 11-13)

Massas de filamentos prostrados, emaranhados, castanho-escuros; filamentos 15,0-21,0 µm diam.; ramificações simples frequentes, duplas raras; bainhas espessas, lamelação paralela, hialinas nas regiões mais jovens, amarelo-acastanhadas nas regiões mais velhas; tricomas pouco constrictos, 11,0-15,0 µm diam.; células quadráticas a alongadas, 13,0-15,0 µm compr., 1,1 a 1,2 vez mais longas que largas; conteúdo celular granulado, verde-azulado; heterócitos arredondados, discoides, 10,0-12,0 µm comp., 14,0-15,0 µm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S36.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 6, irradiância: dados não disponíveis, porcentagem de irradiância na massa: 100%, temperatura do ar: 23,8°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 98%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: solo e rochas úmidas.

Comentário: Não foi encontrada correspondência entre a população estudada e nenhuma espécie de *Petalonema* descrita em literatura. A população possui características métricas e morfológicas que se aproximam à descrição de Geitler (1932) para *Petalonema pulchrum* Frémy (1930), entretanto as células dos organismos analisados são mais longas do que da espécie (6,0-7,0 μm compr.). *Petalonema pulchrum* ocupa um habitat semelhante ao da população encontrada na mata atlântica (sobre rochas úmidas em florestas), embora em latitudes distintas.

Tabela 2: Comparação entre as espécies do gênero *Petalonema* encontradas no presente estudo. DF = diâmetro do filamento, DT = diâmetro do tricoma, CC = comprimento celular. Todas as medidas em μm .

	DF	DT	CC	Ramificação	Construção
<i>P. alatum</i>	45,0-70,0	8,0-15,0	5,0-10,0	simples frequentes, duplas ocasionais	Sim
<i>P. densum</i>	24,0-32,0	9,0-10,0	6,0-9,0	simples ocasionais, duplas frequentes	Sim
<i>P. velutinum</i>	30,0-35,0	14,0-20,0	8,0-15,0	simples e duplas frequentes	Sim
<i>Petalonema</i> sp.1	27,0-32,0 (-40,0)	5,0-10,0	5,0-10,0	simples e duplas frequentes	Sim
<i>Petalonema</i> sp.2	15,0-21,0	11,0-15,0	13,0-15,0	simples frequentes, duplas raras	Não

Família SCYTONEMATACEAE

Brasilonema sennae Sant'Anna et al., Rev. Bras. Bot. (2011)

(Figuras: 14-16)

Massas de filamentos prostrados dispostos paralelamente, marrom-acastanhadas; filamentos 15,0-18,0 μm diam.; ramificações simples e duplas raras; bainhas amplas, homogêneas ou com lamelação paralela, hialinas a amareladas; tricomas não a levemente constrictos, 11,0-14,0 μm diam.; células cilíndricas, 8,0-14,0 μm compr., 0,7 a 1,1 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, verde-azulado; heterócitos cilíndricos, quadráticos ou arredondados, raramente discoides, intercalares, 8,0-12,0 μm diam., 9,0-14,0 μm compr., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S29.

Parâmetros ambientais: dados não disponíveis.

Comentários: A população apresenta medidas de filamentos e tricomas compatíveis àquelas apresentadas na descrição da espécie (SANT'ANNA et al. 2011; 10,0-11,5(-20,0) μm e 6,0-7,7(-12,5) μm , respectivamente). O ambiente onde há a ocorrência dessa espécie (em nascentes sobre pedaços de madeira, pedras e substratos de ferro) assemelha-se ao

ambiente úmido onde a população descrita foi encontrada (em encostas rochosas). A espécie trata-se da recombinação de *Camptylonemopsis sennae* Komárek (KOMÁREK, 2003), agora incluída no gênero *Brasilonema*.

Brasilonema sp.1

(Figuras: 17-19)

Massas de filamentos cespitosos, emaranhados, marrom escuras; filamentos 20,0-25,0 µm diam.; ramificações simples e duplas raras; bainhas amplas, homogênea, hialinas a amareladas; tricomas não a levemente constrictos, 12,0-16,0 µm diam.; células cilíndricas, (6,0-)9,0-15,0 µm compr., 0,3 a 1,0 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, ocasionalmente com um grande vacúolo central, marrom-avermelhado; heterócitos quadráticos a arredondados, intercalares, 10,0-21,0 µm compr., 13,0-17,0 µm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S43.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradiância: dados não disponíveis, porcentagem de irradiância na massa: 20%, temperatura do ar: 24°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 92%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentários: *Brasilonema* sp.1 apresentou-se bastante semelhante a *B. bromeliae*, entretanto esta última possui filamentos com menor diâmetro (15,0-17,0 µm diam.; FIORE et al. 2007). *Brasilonema bromeliae* também diferencia-se da população estudada por ser encontrada crescendo sobre folhas de bromélias e de madeira úmida, enquanto os espécimes de *Brasilonema* sp.1 foram encontradas crescendo sobre substrato rochoso. Estudos mais detalhados são necessários para uma correta identificação específica da população.

Brasilonema sp.2

(Figuras: 20-22)

Massas de filamentos cespitosos, emaranhados, arranjados paralelamente em sua maioria, marrom escuras; filamentos de 16,0-22,4 μm diam.; ramificações duplas ocasionais, simples raras; bainhas delgadas, homogênea ou com lamelação paralela, incolor a acastanhada; tricomas constrictos, 11,2-20,0 μm diam.; células isodiamétricas, 8,0-21,6 μm compr., 0,4 a 1,4 vez mais longas que largas; conteúdo celular homogêneo a granuloso, as vezes com vacúolos, verde-azulado; heterócitos discoides, intercalares, quadráticos a cilíndricos, 5,6-17,6 μm compr., 12,0-13,6 μm diam., conteúdo amarelo-esverdeado.

Ocorrência: S42.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradiância: 41 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porcentagem de irradiância na massa: 47%, temperatura do ar: 22°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 86%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: tronco.

Comentários: O aspecto da massa de filamentos corresponde à descrição de *Brasilonema*, entretanto as características específicas não parecem ser compatíveis com nenhuma das espécies do gênero já descritas. *Brasilonema* sp.2 distingue-se de *B. sennae* (Tabela 3), pois todos os caracteres métricos de *Brasilonema* sp.2 apresentam-se maiores e a ocorrência de ramificações duplas é mais frequente, embora ocasional, na população estudada. *Brasilonema* sp.2 apresentou medidas semelhantes a *B. ornatum* descrita por Sant'Anna et al. (2011), distinguindo-se por apresentar características de bainha diferente, não apresentando ornamentação como descrito para *Brasilonema ornatum*.

Tabela 3: Comparação entre as espécies do gênero *Brasilonema* encontradas no presente estudo. DF = diâmetro do filamento, DT = diâmetro do tricoma, CC = comprimento celular. Todas as medidas em μm .

	DF	DT	CC	Ramificação	Constrição
<i>B. sennae</i>	15,0-18,0	11,0-14,0	8,0-14,0	simples e duplas raras	Sim
<i>Brasilonema</i> sp.1	20,0-25,0	12,0-16,0	(6,0-)9,0-15,0	simples e duplas raras	Sim
<i>Brasilonema</i> sp.2	16,0-22,4	11,2-20,0	8,0-21,6	simples raras, duplas ocasionais	Sim

Scytonema burmanicum Skuja, Susswasseralgenflora Burmas, 34, 1948.

(Figuras: 23-25)

Massa de filamentos cespitosos, emaranhados, verde-amarelados; filamentos 12,0-15,0 μm diam.; ramificações duplas e simples ocasionais; bainhas delgadas, lamelação paralela, hialinas a amarelo acastanhadas; tricomas levemente constrictos, 8,0-12,0 μm diam.; células cilíndricas, 5,0-12,0 μm compr.; 0,5 a 1,0 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso; verde-azulado; heterócitos cilíndricos, arredondados a discóides, 8,0-12,0 μm compr., 6,0-10,0 μm diam.

Ocorrência: S34.

Parâmetros ambientais: (n =1) pH: 5, irradiância: dados não disponíveis, porcentagem de irradiância na massa: 100%, temperatura do ar: 22,5°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 95%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentário: As características da população se enquadram na descrição de Desikachary (1959) para *Scytonema burmanicum* Skuja, a partir de amostras da Europa, entretanto apresentam medidas de heterócito menores (6,0-16,0 μm compr. e 5,0-16,0 μm diam). As populações descritas por Rai & Misra (2010), provenientes de ambientes lênticos e lóticos do leste do Nepal, diferenciam-se do material estudado por apresentarem células mais curtas (6,0-9,0 μm compr.) Essa espécie é próxima de *S. hofmanii* C. Agardh, distinguindo-se pelas medidas dos tricomas (5,0-12,5 μm diam.) e células (4,0-8,0 μm compr.).

Scytonema cf. guyanense Born. et Flah., Ann. Sci. nat., 7(5): 94, 1887.

(Figuras: 26-28)

Massas de filamentos emaranhados e prostrados, verde acinzentadas; filamentos 15,0-23,0 μm diam.; ramificações simples e duplas frequentes; bainhas homogêneas com lamelação paralela, hialinas, amarelas ou amarelas acastanhadas; tricomas levemente constrictos, 5,0-14,0 μm diam.; células (4,0-)7,0-17,0(-20,0) μm compr., (0,4-)0,6 a 1,6(-4) vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, as vezes com largos vacúolos, verde claro, verde acinzentado ou violeta claro; heterócitos cilíndricos a arredondado, 7,0-13,0 μm diam., 10,0-22,0 μm compr.

Ocorrência: S05, S06, S07, S13, S15, S16, S44.

Parâmetros ambientais: (n =5) pH: 4-6, irradiância: 2-120 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (45 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), porcentagem de irradiância na massa: 5-84% (39%), temperatura do ar: 19,6-27,7°C (23,0°C), temperatura da massa: 19,1-23,5°C (21,5°C), umidade relativa do ar: 73-92% (83%), umidade relativa da massa: 25-95% (76%), substrato: rocha, solo, sedimentos do solo na estrada e casca de árvore.

Comentários: Pelas dimensões e tipo de habitat, as populações estudadas são morfologicamente mais próximas a *S. guyanense*, entretanto não formam feixes de filamentos eretos, como observado tipicamente na espécie, fato que impede uma identificação específica segura. Essas populações são produtoras de ficoeritrina, demonstrado pela coloração avermelhada comumente encontrada no conteúdo das células e também em indivíduos típicos de *S. guyanense*.

Scytonema hofmanni West & West, J. Linn. Soc. (Bot.) Lond., 30: 270, 1895.

(Figuras: 29-30)

Massas de filamentos eretos, organizados em feixes ou agrupados, ou crescimentos isolados em massas gelatinosas de outros cianobactérias; filamentos (6,4-)7,2-14,0 μm diam.; ramificações simples e duplas; bainhas com lamelação paralela, hialinas na parte externa, amarelas na parte interna; tricomas não a levemente constricto, as vezes o ápice

apresenta-se entumescido, 5,0-12,5 μm diam.; células cilíndricas, 4,0-8,0 μm compr., (0,5-1,3 a 3,2 vezes mais longas que largas; conteúdo celular bastante granulado, verde claro a verde azulado; heterócitos cilíndricos, 4,0-12,0 μm compr., 5,6-8,8(-12,8) μm diam.

Ocorrência: S09, S18, S22.

Parâmetros ambientais: (n = 3) pH: 5-10 (8), irradiância: 3-340 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (146 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), porcentagem de irradiância na massa: 4-78% (37%), temperatura do ar: 19,6-27,7°C (23,0°C), temperatura da massa: 17,9-26,4°C (22,7°C), umidade relativa do ar: 63-90% (78%), umidade relativa da massa: 71-93% (82%), substrato: rocha.

Comentários: Essas populações são caracterizadas por seus tricomas heteromórficos verde-azulados e correspondem à descrição de *Scytonema hofmanni*. Em alguns casos, foram encontrados filamentos crescendo em pequenos grupos, ou isolados na mucilagem de outras algas, que difere da típica massa vegetal ereta fasciculada da espécie, embora tais variações tenham sido encontradas em ocorrências da espécie para diferentes localidades (GEITLER 1932).

Scytonema javanicum (Kutz) Bornet ex Born. et Flah., Ann. Sci. nat., 7(5): 95. 1887.

(Figuras: 31-33)

Massas de filamentos cespitosos, reunidos em feixes, verde-azulados; filamentos 10,0-13,0(-15,0) μm diam.; ramificações simples e duplas raras; bainhas delgadas, homogêneas, hialinas; tricomas em geral não constrictos ou levemente constrictos nas regiões meristemáticas, (5,0-)9,0-10,0 (-12,0) μm diam.; células discoides a quadráticas, 7,0-10,0 μm compr., 1,2 a 2,2 vezes mais longas que largas e em regiões meristemáticas 0,5 a 0,7 vezes mais longas que largas; conteúdo celular homogêneo, verde-azulado; heterócitos cilíndricos, intercalares, 7,0-12,0 μm compr., 8,0-10,0 μm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S26, S27 e S39.

Parâmetros ambientais: (n = 2) pH: 5, irradiância: dados não disponíveis, porcentagem de irradiância na massa: 100%, temperatura do ar: 24,5-25°C, temperatura da massa: dados

não disponíveis, umidade relativa do ar: 86%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentário: Os indivíduos das populações estudadas apresentam características morfológicas semelhantes a *Scytonema javanicum*, segundo Bornet et Flahault (1887), além de ocuparem habitats semelhantes (entre musgos). Também foram semelhantes à descrição em Azevedo et al (1996), sendo que a população era de origem edáfica e também apresentava-se em feixes.

Scytonema millei Bornet ex Born. et Flah., Notes Alg., 2: 147, 1880.

(Figuras: 34-37)

Massas de filamentos cespitosos, dispostos paralelamente, marrom-escuro a esverdeados; filamentos 15,0-20,0 μm diam.; ramificações duplas raras; bainhas firmes, delgadas, lameladas, amarelo-acastanhadas; tricomas constritos, 15,0-18,0 μm diam.; células cilíndricas, 10,0-13,0 μm compr., 0,5 a 0,9 vez mais longa que larga; conteúdo celular pouco granuloso, verde-azulado; heterócitos quadráticos a arredondados, discoides, intercalares, 9,0-12,0 μm compr., 9,0-13,0 μm diam., conteúdo amarelo-acastanhado.

Ocorrência: S20, S30 e S31.

Parâmetros ambientais: (n = 3) pH: 5, irradiância: 341 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porcentagem de irradiância na massa: 57%, temperatura do ar: 20,1°C, temperatura da massa: 23,5°C, umidade relativa do ar: 90%, umidade relativa da massa: 91%, substrato: rocha.

Comentário: As populações estudadas assemelham-se à descrição da espécie em Desikachary (1959), destacando-se a constrição dos filamentos. Aproximam-se também a *S. schmidtii* Gomont, da qual diferem, entretanto, por possuírem maiores dimensões de diâmetro de filamentos e tricomas (10,0-12,0 μm e 9,0-12,0 μm em *S. schmidtii*, respectivamente).

Scytonema cf. mirabile (Dillwyn) Born., Bull. Soc. Bot. Fr. 36: 155, 1889.

(Figuras: 38-39)

Massas de filamentos emaranhados, prostrados, marrom escuro a marrom escuro amarelado; filamentos 18,0-26,0 μm diam., ramificações simples e duplas ocasionais; bainhas espessas, lamelação divergente, algumas regiões com lamelação paralela, marrom amareladas; tricomas constrição muito variável, 12-14,5 μm diam.; células cilíndricas, 5,0-15,0 μm compr., geralmente mais curtas que largas, 0,4 a 1,0(-1,2) vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, as vezes com vacúolos largos, verde claro a verde azulado; heterócitos cilíndricos, mais curtos ou mais longos que largos, 7,0-16,0 μm compr., 13,0-14,8 μm diam.

Ocorrência: S17.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradiância: 14 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, porcentagem de irradiância na massa: 47%, temperatura do ar: 25,1°C, temperatura da massa: 25,5°C, umidade relativa do ar: 86%, umidade relativa da massa: 89%, substrato: rocha.

Comentários: Essa população assemelha-se a *Scytonema mirabile* devido à semelhança das características da bainha e às características métricas. Entretanto, a população estudada distingue-se da espécie pelas menores dimensões dos tricomas (6,0-12,0 μm diam.) e das células (cilíndricas) de *S. mirabile* (Tabela 4).

Scytonema ocellatum Lyngbye ex Born. et Flah., Ann. Sci. nat., 7(5): 95. 1888.

(Figuras: 40-43)

Massas de filamentos prostrados, emaranhados, longos, acastanhados; filamentos 12,0-16,0 μm diam.; ramificações simples e duplas raras; bainhas delgadas, não lameladas, hialinas a amareladas; tricomas não constrictos, 11,0-15,0 μm diam.; células cilíndricas 8,0-10,0 μm compr. quando quadráticas, 0,5 a 0,7 vez mais longas que largas; células mais longas ocasionais 18,0-35,0 μm compr., em zona meristemática de 2,0-5,0 μm diam.; conteúdo celular granuloso, marrom-avermelhado a violeta; heterócitos cilíndricos, quadráticos, discoides, 10,0-15,0 μm compr., 10,0-19,0 μm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S37 e S38.

Parâmetros ambientais: dados não disponíveis.

Comentários: As populações estudadas correspondem às descrições de Gardner (1927) e de Sant'Anna (1984) para a espécie. Variedades taxonômicas são descritas, sendo que *S. ocellatum* var. *purpureum* tem características também encontradas nos espécimes brasileiros, como as células com coloração roxa ou violeta pálido (GARDNER 1927). Entendemos, contudo, que a coloração pode não ser uma característica taxonômica muito estável e optamos por nomear as populações estudadas apenas no nível específico. O ambiente de ocorrência de *S. ocellatum* é bastante próximo ao das populações amostradas.

Scytonema pseudopunctatum Skuja, Zur Susswass. Bur., 38, 1949.

(Figuras: 44-45)

Massas de filamentos emaranhados e prostrados, marrom amareladas; filamentos 18,4-30,4 µm diam., ramificações simples e duplas ocasionais; bainhas homogêneas ou com lamelação paralela, hialinas a marrom amareladas; tricomas predominantemente levemente constrictos, (10,0-)12,0-17,0 diam.; células (4,0-)8,0-22,0 µm compr., (0,2-)0,4 a 1,8 vez mais longa que larga; conteúdo celular granuloso, as vezes com vacúolos largos, azul esverdeada clara, levemente avermelhada a violeta; heterócitos longos, quadráticos ou cilíndricos, 12,8-26,4 µm compr., 12,0-18,4 µm diam.

Ocorrência: S09.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 10, irradiância: 340 µmol fótons.m⁻².s⁻¹, porcentagem de irradiância na massa: 78%, temperatura do ar: 24,6°C, temperatura da massa: 26,4°C, umidade relativa do ar: 80%, umidade relativa da massa: 83%, substrato: rocha.

Comentários: De acordo com a descrição de Desikachary (1959), a população estudada corresponde bem à descrição da espécie, que é caracterizada pelo conteúdo celular rico em ficoeritrina, além das características morfológicas e fatores ecológicos. Em *Scytonema pseudopunctatum* foram observados filamentos com 18,4-30,4 µm diam., medidas maiores que a descrição de Desikachary (1959; 15,0-25,0 µm diam.), o que pode ocorrer com a

variação de condições ambientais onde a espécie foi encontrada, de acordo Bharadwaja (1934).

Scytonema punctatum Gardner, Mem. New York Bot. Gard. 7: 75, 1927.

(Figuras: 46-47)

Massas de filamentos emaranhados arranjados em feixes eretos, escuras a marrom amareladas, ou, mais raras, em pequenos grupos ou filamentos isolados em crescimentos de massas gelatinosas de outras cianobactérias; filamentos (9,0-)13,0-22,5(-24,5) μm diam., ramificações simples e duplas; bainhas espessas, homogêneas ou com lamelação paralela, hialinas a amareladas a marrom amareladas; tricomas (5,0-)7,0-14,0 μm diam, heteromórficos, não constrictos, ocasionalmente levemente constrictos; células 5,0-18,4(-20,0) μm comp., 0,5 a 2,0 vezes mais longa que largas; conteúdo celular granuloso, as vezes com vacúolos largos, verde azulada clara a forte; heterócitos quadráticos a cilíndricos alongados, (4,0-)8,0-18,4(-19,2) μm comp., 7,5-14,0 μm diam.

Ocorrência: S01, S02, S03, S04, S09, S10, S11, S12, S16, S19, S21 e S22.

Parâmetros ambientais: (n = 12) pH: 5-10 (6,6), irradiância: 4-2200 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (310 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), porcentagem de irradiância na massa: 4-92%(51%), temperatura do ar: 19,6-31,0°C (23,5°C), temperatura da massa: 17,9-38,0°C (24,6°C), umidade relativa do ar: 62-92% (79%), umidade relativa da massa: 68-141% (87%), substrato: rocha, solo, sedimentos e casca de árvore.

Comentário: Nas populações estudadas foram observados tricomas com medidas menores que as descritas por Gardner (1927; 14,0-18,0 μm diam.). Tal característica pode variar de acordo com as condições ambientais onde a espécie ocorre. Essas populações foram identificadas como *Scytonema punctatum*, pois se enquadraram nas características descritas por Gardner (1927).

Scytonema samoense Wille, Denkschr. Ak. Wiss. Wien, *Rechinger, Bot. Zool. Ergebn.* 6(1), 1914.

(Figuras: 48-49)

Massas de filamentos cespitosos, emaranhados, amarela- acastanhada; filamentos 12,0-15,0 μm diam.; ramificações simples ocasionais, duplas raras; bainhas espessas, lamelação paralela, hialina a amarelo-acastanhadas; tricomas predominantemente constrictos, 5,0-7,0 μm diam.; células cilíndricas, 11,0-14,0 μm compr., 1,5 a 2,8 vezes mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, verde-claro; heterócitos cilíndricos, alongados, 10,0-13,0 μm compr., 5,0-7,0 μm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S41.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradiância: 25,5 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porcentagem de irradiância na massa: 14%, temperatura do ar: 19°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 69,5%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: rocha.

Comentário: A população encontrada se encaixa nas características descritas por Geitler (1932) para *S. samoense*. O trabalho de Frémy (1930) compara esta espécie a *Scytonema mirabile* (Dillwyn) Bornet, mas esta última caracteriza-se por possuir bainha levemente divergente e tricomas com constrição variável, diferentemente de *S. samoense*, que possui bainha lamelada paralelamente e tricomas predominantemente constrictos.

Scytonema sp.1

(Figuras: 50-51)

Massas de filamentos emaranhados, prostrados, as vezes em pequenos grupos filamentos isolados em crescimentos de massas gelatinosas de outras cianobactérias, marrom escuras a marrom amarelados; filamentos 12,8-18,0 μm diam., predominantemente não constrictos; células 4,0-14,5 μm compr., 0,4 a 1,7 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, as vezes com vacúolos largos, verde claro a verde azulado; heterócitos 8,0-22,5 μm compr., 7,0-15,2 μm diam., achatado, quadráticos ou cilíndrico-alongados.

Ocorrência: S08, S09, S10 e S15.

Parâmetros ambientais: (n = 4) pH: 4-10 (6), irradiância: 30-340 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (177 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), porcentagem de irradi\u00e2ncia na massa: 46-78%(57%), temperatura do ar: 22,3-24,6°C (24,0°C), temperatura da massa: 21,7-26,6°C (25°C), umidade relativa do ar: 80-92% (83%), umidade relativa da massa: 83-95% (88%), substrato: rocha e solo.

Coment\u00e1rios: Essas popula\u00e7\u00f5es n\u00e3o correspondem bem a qualquer esp\u00e9cie descrita. S\u00e3o similares a *Scytonema guyanense* (Montagne) Bornet et Flahault, mas as dimens\u00f5es dos filamentos (14,0-21,0 μm) e tricomas (10,0-16,0 μm) s\u00e3o maiores do na popula\u00e7\u00e3o brasileira. Al\u00e9m disso, n\u00e3o h\u00e1 forma\u00e7\u00e3o de feixes na massa de plantas da mata atl\u00e2ntica, ao passo que est\u00e3o presentes em *S. guyanense*.

Scytonema sp.2

(Figuras: 52-53)

Massas de filamentos em pequenos grupos ou isolados em crescimentos de massas gelatinosas de outras cianobact\u00e9rias; filamentos 12,0-14,0 μm diam., ramifica\u00e7\u00f5es simples e duplas; ramos 8,0-8,5 μm diam.; bainhas relativamente espessas, lamela\u00e7\u00e3o paralela, amarelas a marrom amareladas; tricomas constrictos, 7,0-8,0 μm diam., tricomas dos ramos 2,5-3,0 μm diam.; c\u00e9lulas 5,0-7,0(-9.5) μm compr., 0,6 a 1,3(-3,2) vezes mais longas que largas; conte\u00fado celular granuloso, verde azulado, heter\u00f3citos quadr\u00e1ticos ou cil\u00edndricos, 7,0-9,0 μm compr., 7,5-10,5 μm diam.

Ocorr\u00eancia: S14.

Par\u00e2metros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradi\u00e2ncia: 43 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (177 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), porcentagem de irradi\u00e2ncia na massa: 66%, temperatura do ar: 22,3°C, temperatura da massa: 21,5°C, umidade relativa do ar: 92%, umidade relativa da massa: 94%, substrato: solo.

Coment\u00e1rios: Em *Scytonema* sp.2 foram observadas caracter\u00edsticas semelhantes \u00e0 descri\u00e7\u00e3o de Desikachary (1959) para *S. multiramosum* Gardner. Entretanto, em *Scytonema* sp.2 n\u00e3o foi observada bainha divergente e suas c\u00e9lulas s\u00e3o mais curtas que as de *S.*

multiramosum. Estudos mais detalhados são necessários para obter uma avaliação fiel dessa espécie.

Scytonema sp.3

(Figura: 54-55)

Massas de filamentos cespitosos, verdes; filamentos de 14,4-19,5 µm diam.; ramificações duplas frequentes, simples raras; bainhas delgadas, homogênea, incolor a acastanhada; tricomas constrictos, 6,4-16,8 µm diam.; células cilíndricas, discoides a alongadas, 7,2-16,8 µm compr., 0,8 a 1,8 vez mais longas que largas; conteúdo celular granuloso, verde-azulado; heterócitos quadráticos, 8,4-19,2 µm compr., 9,2-12 µm diam., conteúdo amarelo-esverdeado.

Ocorrência: S45.

Parâmetros ambientais: (n = 1) pH: 5, irradiância: não disponível, porcentagem de irradiância na massa: 26%, temperatura do ar: 21°C, temperatura da massa: dados não disponíveis, umidade relativa do ar: 61%, umidade relativa da massa: dados não disponíveis, substrato: tronco.

Comentário: A população encontrada tem características próximas à descrição de *Scytonema pseudoguyanense* Bharadwaja, segundo Desikachary (1959). Entretanto, *Scytonema* sp.3 apresenta células 0,8 a 1,8 vez mais longas que largas, diferenciando-se de *Scytonema pseudoguyanense* que apresenta células longas (até 4 vezes mais longas que largas). Outra característica que não permite caracterizá-la como *S. pseudoguyanense* é que não possui ramos mais delgados que os filamentos principais. Mais estudos serão necessários para a caracterização da espécie.

Scytonema sp.4

(Figuras: 56-58)

Massas de filamentos cespitosos, eretos, verde-escuros; filamentos 9,6-15,2 μm diam.; ramificações duplas frequentes, ocasionalmente simples; bainhas espessas, lamelação paralela, castanho escuras, em ramificações amarelada, superfície com aspecto trincado; tricomas não a levemente constrictos, 6,4-8,0 μm diam.; células cilíndricas, (2,4-)8,0-15,0 μm compr., 1,8 a 2,3 vezes mais longas que largas, e em regiões meristemáticas 0,3 a 0,8 vezes mais longas que largas ; conteúdo celular granuloso, com vacúolos, verde-azulado; heterócitos quadráticos a arredondados, intercalares, 9,5-15,0 μm de compr., 7,0-10,0 μm diam., conteúdo amarelo.

Ocorrência: S28.

Parâmetros ambientais: dados não disponíveis.

Comentários: *Scytonema schmidtii* Gomont (segundo Desikachary, 1959) é a espécie que mais se assemelha à população estudada. Diferenciam-se, entretanto, pois *S. schmidtii* possui medidas de filamentos (10,0-12,0 μm diam.), tricomas (9,0-12,0 μm diam.) e células (2,0-6,0 μm compr.), distintas das de *Scytonema* sp.4. Com essas diferenças métricas não se pode assegurar a identificação de *Scytonema* sp.4 com *S. schmidtii*.

Tabela 4: Comparação entre as espécies do gênero *Scytonema* encontradas no presente estudo. DF = diâmetro do filamento, DT = diâmetro do tricoma, CC = comprimento celular. Todas as medidas em μm .

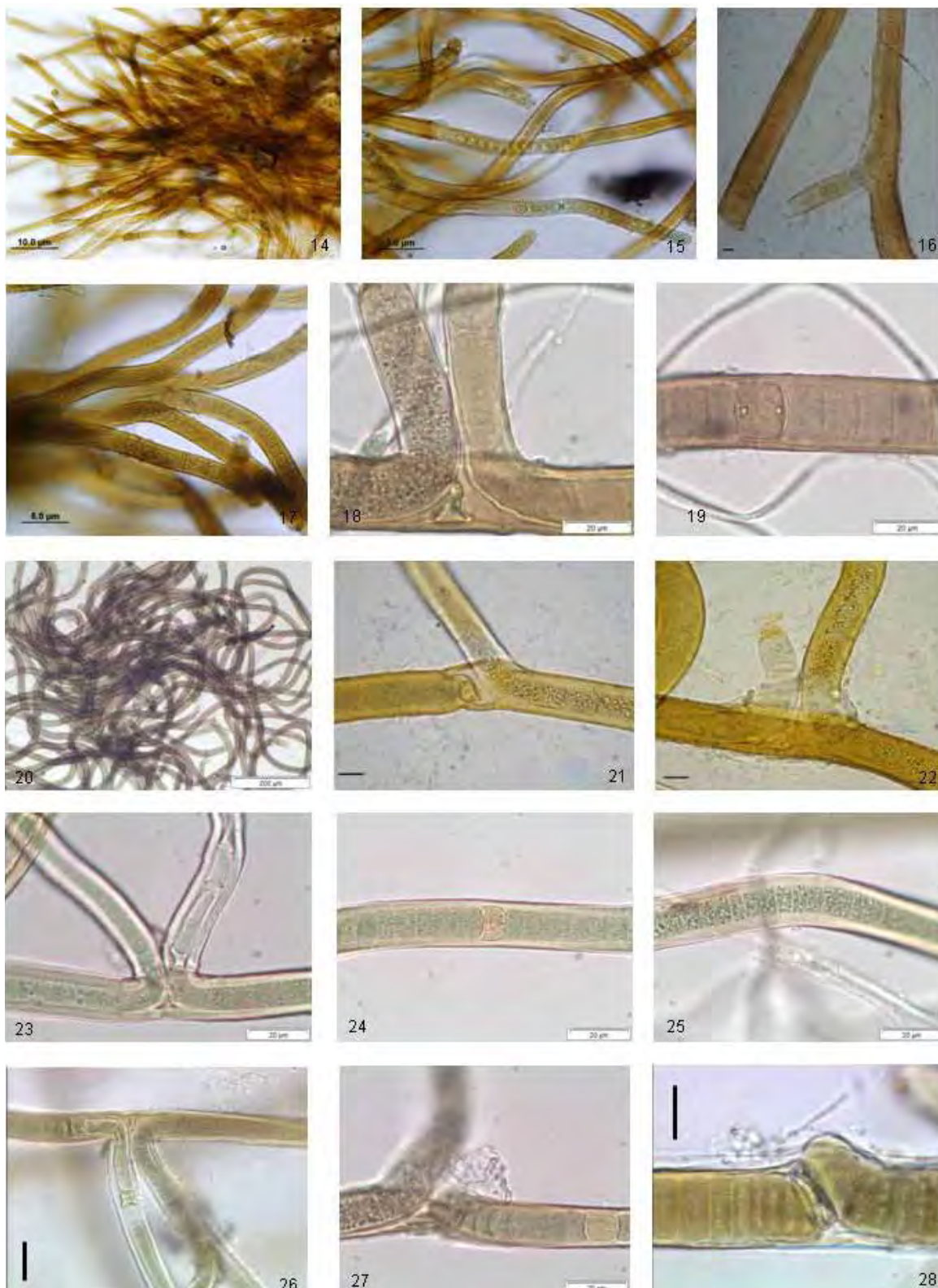
	DF	DT	CC	Ramificação	Construção
<i>S. burmanicum</i>	12,0-15,0	8,0-12,0	5,0-12,0	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>S. cf. guyanense</i>	15,0-23,0	5,0-14,0	(4,0-)7,0-17,0(-20,0)	simples e duplas frequentes	Sim
<i>S. hofmanii</i>	(6,4-)7,2-14,0	?	4,0-8,0	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>S. javanicum</i>	10,0-13,0 (-15,0)	9,0-10,0 (-12,0)	7,0-10,0	simples e duplas raras	Sim
<i>S. millei</i>	15,0-20,0	15,0-18,0	10,0-13,0	simples ocasionais, duplas raras	Sim
<i>S. cf. mirabile</i>	18,0-26,0	12,0-26,0	5,0-15,0	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>S. ocellatum</i>	11,0-16,0	12,0-15,0	8,0-10,0	simples e duplas raras	Não
<i>S. pseudopunctatum</i>	18,0-30,4	(10,0-)12,0-17,0	(4,0-)8,0-22,0	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>S. punctatum</i>	(9,0-)13,0-22,5 (-24,5)	(5,0-)7,0-14,0	5,0-18,4(-20,0)	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>S. samoense</i>	12,0-15,0	5,0-7,0	11,0-14,0	simples ocasionais, duplas raras	Sim
<i>Scytonema</i> sp.1	12,8-18,0	?	4,0-14,5	simples e duplas ocasionais	Sim

Tabela 4: continuação.

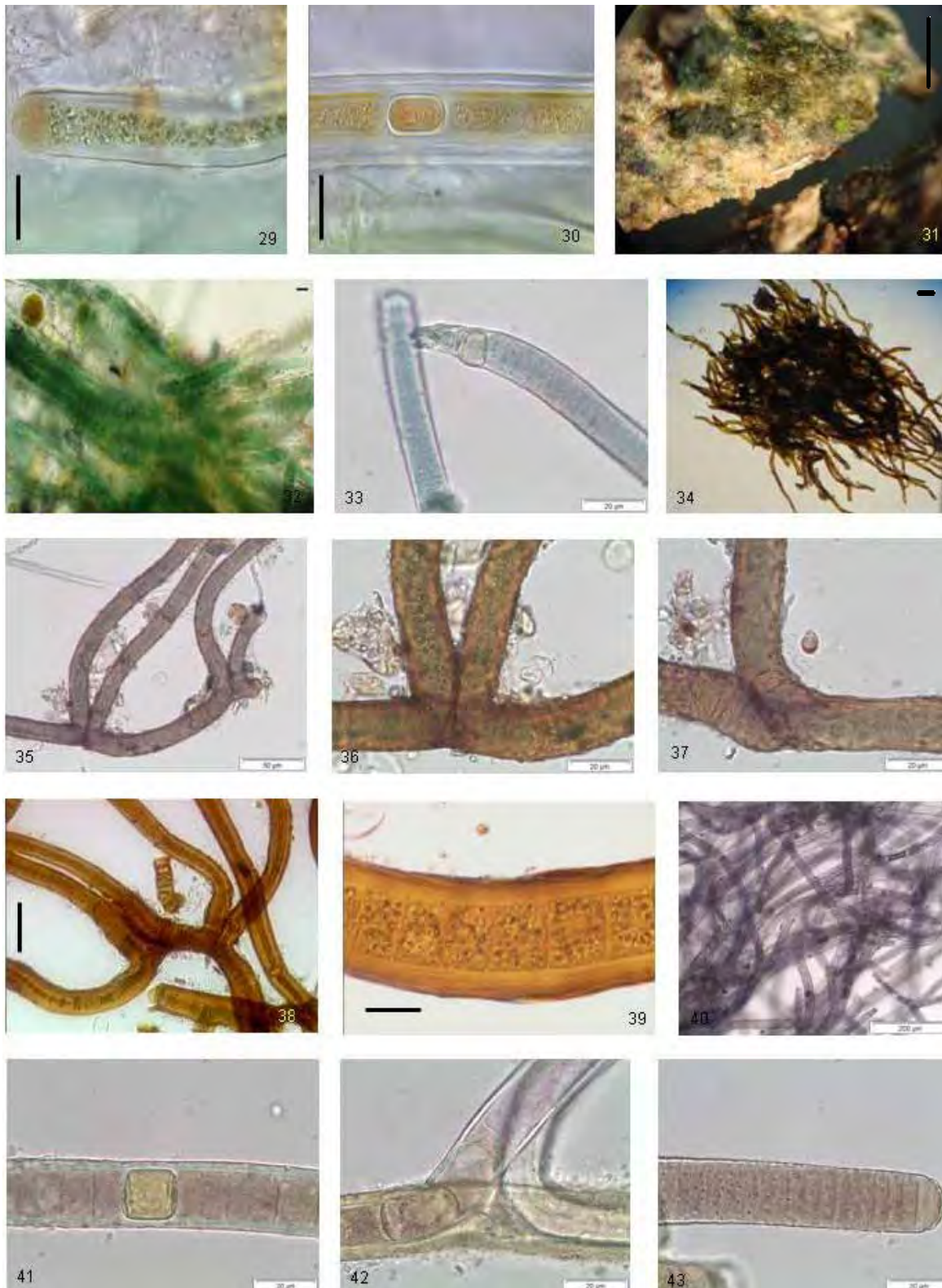
	DF	DT	CC	Ramificação	Construção
<i>Scytonema</i> sp.2	12,0-14,0	7,0-8,0	5,0-7,0(-9.5)	simples e duplas ocasionais	Sim
<i>Scytonema</i> sp.3	14,4-19,5	6,4-16,8	7,2-16,8	simples raras, duplas frequentes	Sim
<i>Scytonema</i> sp.4	9,6-15,2	6,4-8,0	8,0-15,0	simples ocasionais, duplas frequentes	Sim



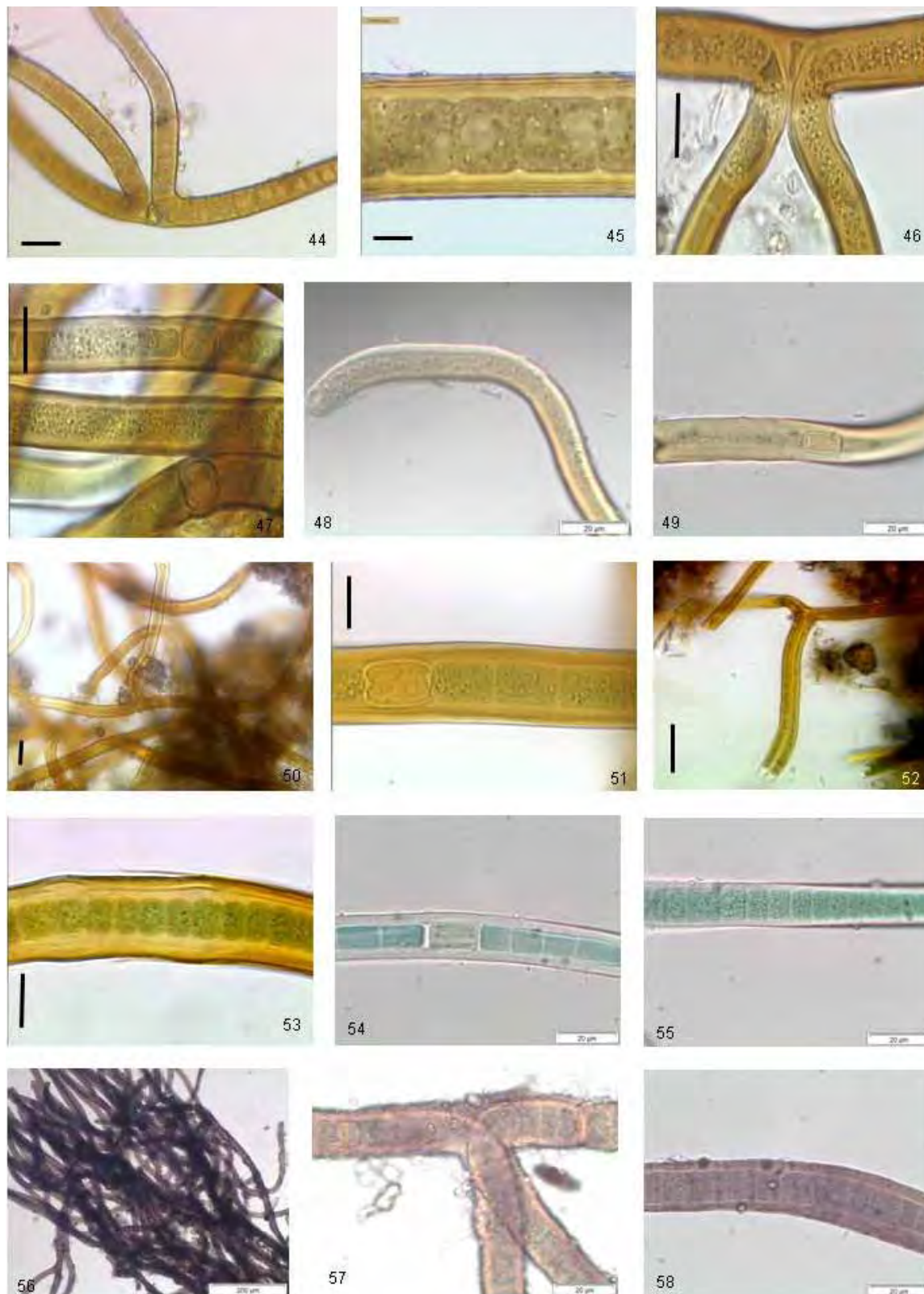
Figuras 2-13: 2-3 *Petalonema alatum*; 4-5 *P. densum*; 6-8 *P. velutinum*; 9-10 *Petalonema* sp.1; 11-13 *Petalonema* sp.2. (Escala: 2-5 e 9-11: 10 µm).



Figuras 14-28: 14-16 *Brasilonema sennae*; 17-19 *Brasilonema* sp.1; 20-22 *Brasilonema* sp.2; 23-25 *Scytonema burmanicum*; 26-28 *S. cf. guyanense*. (Escala: 21-22,28: 10 μ m; 26: 20 μ m).



Figuras 29-43: 29-30 *Scytonema hofmanii*; 31-33 *S. javanicum*; 34-37 *S. millei*; 38-39 *S. cf. mirabile*; 40-43 *S. ocellatum*. (Escala: 29-30, 32, 34, 39: 10 µm; 38: 50 µm; 31: 1 cm).



Figuras 44-58: 44-45 *Scytonema pseudopunctatum*; 46-47 *S. punctatum*; 48-49 *S. samoense*; 50-51 *Scytonema* sp.1; 52-53 *Scytonema* sp.2; 54-55 *Scytonema* sp.3; 56-58 *Scytonema* sp.4. (Escala: 44-47, 51 e 53: 10 μm ; 50 e 52: 50 μm .)

Cultivos

Embora tenham sido tentadas diversas variações nas condições de cultura, por meio da utilização de diferentes meios de cultivo (BG11, BG11₀, Bold e água-solo), diferentes temperaturas e diferentes irradiâncias, não obtivemos sucesso no crescimento artificial de nenhuma das amostras.

Não é possível indicar o fator exato para o insucesso desta etapa, mas algumas observações podem ser feitas.

Os organismos aerófitos parecem ter requisições ambientais muito específicas, como já observado em trabalhos anteriores para outras cianobactérias, como as Stigonematales, por exemplo, Ferreira (2009). Provavelmente em função desta característica, essas cianobactérias têm o crescimento bastante limitado em condições de laboratório. Como consequência do crescimento lento, foi muito comum observar o desenvolvimento abundante de outras cianobactérias contaminantes (principalmente unicelulares e algumas filamentosas homocitadas), aparentemente mais competitivas, inibindo ainda mais o desenvolvimento dos organismos de interesse.

Desse modo, não foram produzidos cultivos em quantidade e qualidade adequada para utilização nos estudos moleculares, obrigando a realização do trabalho de extração de DNA a partir de material proveniente do campo. Isso, por sua vez, implicou na utilização de *primers* específicos para cianobactérias.

Avaliação molecular

Do total de 22 espécies de cianobactérias descritas, doze foram selecionadas para a análise molecular, pois apresentaram boas condições (filamentos vivos abundantes, apresentando células e bainhas não degradadas). Após as extrações, todas as amostras foram amplificadas em triplicata e foram verificadas quanto a sua qualidade em eletroforese em gel de agarose (Figura 59).

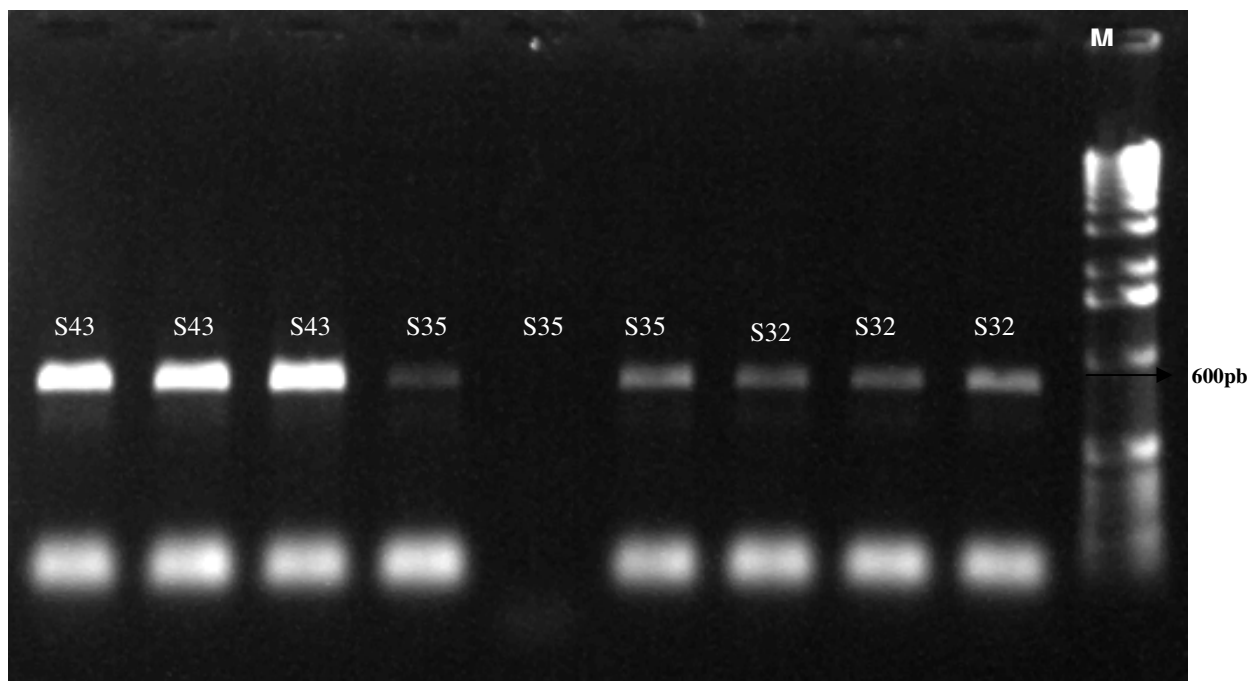


Figura 59: Gel representativo dos produtos de amplificação (PCR) do gene rRNA 16S. M - marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen).

Visto que algumas amostras não apresentavam concentração suficiente (S25 e S35) de DNA para serem sequenciadas, foi necessária a realização de múltiplas reações de amplificação, para a obtenção de uma quantidade adequada de DNA após sua purificação (Tabela 5).

Tabela 5: Quantificação das reações de PCR das espécies analisadas.

Amostras	n° reações de PCR	Quantificação do produto ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
S25	7	42,5
S26	2	13,1
S28	4	20,8
S32	2	15,5
S34	6	27,1
S35	10	17,3
S41	6	15,2
S42	6	34,4
S43	6	54,5
S44	3	55,6
S45	6	21,7

Nd = dados não disponíveis

Os diferentes produtos de PCR obtidos resultaram em sequências que foram processadas pelo programa Phred/Phrap/Consed para verificação da sua qualidade, sendo que sete amostras resultaram em produto satisfatório para os dois *primers* usados. As sequências obtidas para as diferentes espécies variaram de 562 a 665 pares de bases (pb) (Tabela 6).

Foi construída uma matriz de identidade (Tabela 7) ajustada para a região do rRNA 16S sequenciada neste estudo, resultando em 563 nucleotídeos, a partir das sequências geradas neste trabalho e aquelas mais próximas segundo a ferramenta BLAST (Tabela 8). Na matriz, estão destacadas a proporção de semelhança entre as sequências, bem como o número de nucleotídeos distintos entre elas.

Tabela 6: Organismos sequenciadas e tamanhos dos fragmentos do RNAr 16S obtidos.

Táxon	Sequência (pb)
<i>Brasilonema</i> sp.2	649
<i>Petalonema alatum</i>	562
<i>Scytonema</i> cf. <i>guyanense</i>	620
<i>S. millei</i>	583
<i>S. ocellatum</i>	665
<i>Scytonema</i> sp.3	643
<i>Scytonema</i> sp.4	656

A população previamente identificada como *Scytonema* cf. *guyanense* aproximou-se da sequência de *Brasilonema* CENA 114 (EF117246), com identidade de 98% (com 12 nucleotídeos não coincidentes entre os 563 comparados). Da mesma forma, revelou 98% de identidade (12 nucleotídeos não coincidentes) com a população *Brasilonema* sp.2, cuja sequência foi também gerada neste estudo.

A população *Brasilonema* sp.2, por sua vez, resultou em uma sequência com total correspondência (100% de identidade e nenhum nucleotídeo discordante) com *Brasilonema* CENA114 (EF117246.1) quanto à sequência comparada. Também apresentou elevada identidade (99%, oito nucleotídeos não concordantes) com *B. bromeliae* SPC 951 (DQ486055.1), além da identidade com *Scytonema* cf. *guyanense* acima citada.

A sequência obtida para *Scytonema ocellatum* aproximou-se de *Brasilonema* sp. CENA114 (EF117246.1), revelando identidade de 98%. Ainda, a partir dos resultados da ferramenta BLAST, foi constatada alta identidade também com várias sequências parciais de cianobactérias não cultivadas e não identificadas nem em nível genérico disponíveis no GenBank (FN297902.1, FN297903.1, FN297907.1, FN297908.1, FN297910.1, FN298125.1, FN298107.1, FN297885.1, FN297887.1), com o mesmo valor de identidade.

Scytonema sp.3 demonstrou identidade muito alta com duas diferentes espécies: *Brasilonema* sp.2 (deste estudo) e *Brasilonema* CENA114. Em ambos os casos, a identidade foi de 99%, diferindo em apenas seis e sete nucleotídeos, respectivamente. Apresentou também alta semelhança com *Brasilonema bromeliae* SPC 951 (DQ486055.1), sendo 98% e 12 bases não coincidentes.

Scytonema millei mostrou-se relativamente distinta das demais espécies consideradas na presente análise. Sua maior identidade foi observada com *Scytonema* sp.4 (deste estudo) no nível de 95% e 31 nucleotídeos não coincidentes.

As correspondências mais próximas para a sequência de *Scytonema* sp.4 foram as de *Scytonema* sp. FGP-7^a (DQ531698.1), similar em 95% dos nucleotídeos (26 divergentes quanto às sequências comparadas), e *Scytonema millei*, como destacado acima.

Os resultados de identidade entre as populações estudadas revelam incompatibilidade entre as identificações com base em dados morfológicos e daquelas suportadas pelos dados moleculares. Diferentes morfotipos previamente identificados mostraram elevada identidade nas sequências do rRNA 16S produzidas neste estudo, bem como naquelas publicadas no GenBank. *Scytonema* cf. *guyanense*, *S. ocellatum*, *Scytonema* sp.3 e *Brasilonema* sp.2, por exemplo, foram inicialmente diferenciadas pelo

arranjo dos filamentos nas massas, conforme os critérios vigentes para separação dos dois gêneros (FIORE et al., 2007). Entre as demais características morfológicas, o diâmetro dos tricomas foi a mais distinta, corroborando a diferença entre as espécies. As análises moleculares, entretanto, revelaram identidades que variaram de 98 a 99% entre as referidas populações estudadas, valores considerados suficientes para atribuição de mesma identidade específica.

Essa situação pode ser avaliada por duas diferentes vertentes. É possível que as sequências geradas não sejam suficientes para garantir a identidade específica das populações analisadas. As sequências obtidas variaram entre 562 e 665 pb e, talvez, para o gene rRNA 16S esse trecho não seja suficientemente variável para detectar as alterações esperadas para o nível específico. É plausível considerar que se tivessem sido obtidas sequência mais longas, acima de 1400 pb, os resultados poderiam expressar relações distintas (separação de gêneros), das observadas com base em menores trechos de rRNA 16S. De qualquer modo, os dados revelam um nível relativamente alto de identidade, mesmo levando-se em conta a capacidade de resolução mais restrita das sequências geradas. Os resultados dos estudos morfológicos devem, então, ser avaliados frente a esse novo conjunto de informações.

Outra hipótese para tentar explicar os resultados presentemente obtidos é que os critérios adotados para delimitação de gêneros e espécies nas Scytonemataceae não reflitam adequadamente as particularidades de cada táxon, produzindo uma classificação equivocada dos organismos. Alguns trabalhos (HENSON et al. 2002, HOFFMANN et al. 1999, NEILAN et al. 1997, NELISSEN et al. 1995 e TENEVA et al. 2005) têm apontado várias deficiências na taxonomia do grupo devido à grande variabilidade morfológica observada em certas espécies. Neste caso, haveria necessidade de se produzir estudos mais aprofundados sobre as variações que os organismos do grupo podem apresentar em função de parâmetros como condições de habitat e estágios fenológicos.

Com base nos dados moleculares obtidos, pode-se considerar a possibilidade de que as populações de *Scytonema* cf. *guyanense*, *S. ocellatum*, *Scytonema* sp.3 e *Brasilonema*

sp.2, encontradas neste estudo, além de *Brasilonema* CENA 114 e *Brasilonema bromeliae*, sejam consideradas pertencentes a uma única e mesma espécie. Os dados morfológicos, entretanto, apontam diferenças significativas entre os organismos e não indicam tal coincidência entre todos esses elementos. Acreditamos que as identificações específicas realizadas com base em dados morfológicos devem, neste momento, ser mantidas até o melhor detalhamento das características moleculares das referidas populações.

A sequência de *Petalonema alatum*, por sua vez, foi bastante distinta das de outras espécies disponíveis no GenBank. Suas maiores identidades foram de 92% (42 nucleotídeos divergentes) com *Scytonema ocellatum* (deste estudo) e *Brasilonema terrestre* CENA116 (EF490447.1). As sequências de algumas cianobactérias não cultivadas (FN297885.1, FN297887.1, FN297902.1, FN297903.1, FN297907.1, FN297908.1, FN297910.1, FN298125.1 – não apresentadas) foram similares no nível de 94% com a população estudada. Esses valores revelam um distanciamento importante desta espécie com outros considerados similares e coincidentes com as informações morfológicas. Foi observada uma clara diferenciação de espécies de *Scytonema* e de *Tolypothrix* que, embora presentes no banco de dados, não figuram entre as mais próximas da população tropical de *P. alatum*.

A árvore filogenética construída com MV foi a que apresentou melhor topologia (menor número de ramos e mais coerente com as relações esperadas) entre as demais produzidas e, por isso, foi utilizada para apresentação dos resultados.

Tabela 7. Matriz de identidade (na porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção superior) entre as seqüências do rRNA 16S de cianobactérias selecionadas. As amostras sequenciadas neste estudo estão em negrito e as demais foram obtidas no GenBank (detalhes na Tabela7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1 <i>G. violaceus</i>	ID	104	92	94	94	90	96	95	124	105	102	268	89	93	99	357	363	100	97	94	96	100	92	94	92	90	93	269	89
2 <i>S. cf. guyanense</i>	0,82	ID	18	52	18	44	12	53	76	52	41	231	45	57	68	355	344	54	29	29	12	20	31	52	63	54	53	232	45
3 <i>S. ocellatum</i>	0,84	0,97	ID	40	6	35	7	46	70	45	35	234	37	49	58	348	344	44	24	21	7	12	17	44	54	45	44	232	34
4 <i>S. millei</i>	0,83	0,91	0,93	ID	38	31	42	58	83	60	44	233	41	48	66	352	344	58	44	41	42	46	37	45	46	45	50	233	34
5 <i>Scytonema sp.3</i>	0,83	0,97	0,99	0,93	ID	33	6	48	70	45	36	234	37	48	59	348	344	46	23	20	6	12	20	43	54	45	45	233	33
6 <i>Scytonema sp.4</i>	0,84	0,92	0,94	0,95	0,94	ID	35	60	71	48	37	224	26	47	56	349	346	47	40	35	35	41	38	40	38	43	44	229	26
7 <i>Brasilonema sp.2</i>	0,83	0,98	0,99	0,93	0,99	0,94	ID	49	67	43	32	231	34	49	58	346	344	45	18	18	0	8	20	42	55	47	44	233	34
8 <i>P. alatum</i>	0,83	0,91	0,92	0,90	0,91	0,89	0,91	ID	88	363	58	224	59	64	82	367	342	67	53	53	49	53	47	63	74	69	68	224	53
9 <i>Scytonema sp. FJ</i>	0,78	0,87	0,88	0,85	0,88	0,87	0,88	0,84	ID	66	57	253	79	93	81	369	363	41	72	70	67	75	71	83	87	90	86	253	76
10 <i>Scytonema sp. AB</i>	0,81	0,91	0,92	0,89	0,92	0,91	0,92	0,88	0,95	ID	32	246	56	69	61	354	357	16	48	47	43	51	46	58	66	68	63	244	53
11 <i>S. hofmanni</i>	0,82	0,93	0,94	0,92	0,94	0,93	0,94	0,90	0,90	0,94	ID	233	43	50	63	355	348	38	40	39	32	38	37	47	54	55	53	233	44
12 <i>S. hyalinum</i>	0,52	0,59	0,58	0,58	0,58	0,60	0,59	0,60	0,55	0,56	0,58	ID	213	233	246	534	217	243	232	229	231	236	235	221	230	231	226	30	221
13 <i>Scytonema DQ531698</i>	0,84	0,92	0,93	0,93	0,93	0,95	0,94	0,90	0,86	0,90	0,92	0,62	ID	43	57	339	343	55	35	31	34	37	29	32	38	36	32	225	20
14 <i>Scytonema . sp. HM</i>	0,83	0,90	0,91	0,91	0,91	0,92	0,91	0,89	0,83	0,88	0,91	0,58	0,92	ID	74	347	338	74	52	52	49	53	48	39	41	37	38	226	46
15 <i>Scytonema sp. DQ</i>	0,82	0,88	0,90	0,88	0,89	0,90	0,90	0,85	0,86	0,89	0,89	0,56	0,90	0,87	ID	354	352	61	62	60	58	62	56	66	77	76	68	246	60
16 <i>Scytonematopsis sp.</i>	0,36	0,37	0,38	0,37	0,38	0,38	0,38	0,35	0,34	0,37	0,37	0,05	0,39	0,38	0,37	ID	560	355	344	347	346	344	341	345	339	338	330	534	344
17 <i>Scytonema sp. HQ</i>	0,35	0,39	0,39	0,39	0,39	0,38	0,39	0,39	0,35	0,36	0,38	0,61	0,39	0,40	0,37	0,00	ID	357	348	348	344	346	345	342	341	341	339	209	344
18 <i>Scytonema sp. AY</i>	0,82	0,90	0,92	0,90	0,92	0,92	0,92	0,88	0,93	0,97	0,93	0,57	0,90	0,87	0,89	0,37	0,36	ID	46	46	45	52	44	54	66	68	67	246	52
19 <i>Brasilonema roberti- lammi</i>	0,83	0,95	0,96	0,92	0,96	0,93	0,97	0,91	0,87	0,91	0,93	0,59	0,94	0,91	0,89	0,39	0,38	0,92	ID	8	18	27	22	44	58	52	48	236	40
20 <i>B. octagenarum</i>	0,83	0,95	0,96	0,93	0,97	0,94	0,97	0,91	0,88	0,92	0,93	0,59	0,95	0,91	0,89	0,38	0,38	0,92	0,99	ID	18	27	20	47	55	48	46	233	37
21 <i>Brasilonema CENA114</i>	0,83	0,98	0,99	0,93	0,99	0,94	1,00	0,91	0,88	0,92	0,94	0,59	0,94	0,91	0,90	0,38	0,39	0,92	0,97	ID	8	20	42	55	47	44	233	34	
22 <i>B. bromeliae</i>	0,82	0,97	0,98	0,92	0,98	0,93	0,99	0,91	0,87	0,91	0,93	0,58	0,93	0,91	0,89	0,39	0,38	0,91	0,95	0,95	0,99	ID	20	48	55	47	44	235	39
23 <i>B. terrestre</i>	0,84	0,95	0,97	0,93	0,97	0,93	0,97	0,92	0,87	0,92	0,93	0,58	0,95	0,91	0,90	0,39	0,38	0,92	0,96	0,97	0,97	0,97	ID	43	49	41	39	231	34
24 <i>Petalonema sp.</i>	0,83	0,91	0,92	0,92	0,92	0,93	0,93	0,89	0,85	0,90	0,92	0,61	0,94	0,93	0,88	0,38	0,39	0,90	0,92	0,92	0,93	0,91	0,92	36	40	35	223	31	
25 <i>Tolypothrix sp AM</i>	0,84	0,89	0,90	0,92	0,90	0,93	0,90	0,87	0,85	0,88	0,90	0,59	0,93	0,93	0,86	0,40	0,39	0,88	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91	0,94	ID	15	22	217	37
26 <i>Tolypothrix sp. PCC7415</i>	0,84	0,90	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,88	0,84	0,88	0,90	0,59	0,94	0,93	0,87	0,40	0,39	0,88	0,91	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,97	ID	20	220	37
27 <i>Tolypothrix sp. JCT1</i>	0,83	0,91	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,88	0,85	0,89	0,91	0,60	0,94	0,93	0,88	0,41	0,40	0,88	0,91	0,92	0,92	0,92	0,93	0,94	0,96	0,97	ID	209	35
28 <i>S. rataelensis</i>	0,52	0,59	0,59	0,58	0,58	0,59	0,58	0,60	0,55	0,57	0,58	0,95	0,60	0,60	0,56	0,05	0,63	0,56	0,58	0,58	0,58	0,58	0,59	0,60	0,61	0,61	0,63	ID	225
29 <i>Mastigocladopsis sp.</i>	0,84	0,92	0,94	0,94	0,94	0,95	0,94	0,91	0,87	0,91	0,92	0,61	0,97	0,92	0,89	0,39	0,39	0,91	0,93	0,93	0,94	0,93	0,94	0,95	0,93	0,93	0,94	0,60	ID

Tabela 8. Organismos utilizados para a elaboração do conjunto de espécies incluídos na construção das árvores filogenéticas. Os códigos na coluna Fonte representam o número de acesso no GenBank. Os dados sobre as espécies deste estudo estão nas respectivas descrições e na Tabela 1. A numeração dos táxons está de acordo com a Tabela 7.

	Táxon	Procedência do organismo	Fonte
1	<i>Gloeobacter violaceus</i>	Suíça (PCC7421)	AY768399.0
9	<i>Scytonema</i> sp. FJ	Índia	FJ939127.1
10	<i>Scytonema</i> sp. AB	Japão	AB093483.1
11	<i>S. hofmanni</i>	Bermudas (PCC	AB075996.1
12	<i>S. hyalinum</i>	Utah, EUA	AF334700.1
13	<i>Scytonema</i> sp. DQ	Califórnia, EUA	DQ531704.1
14	<i>Scytonema</i> sp. HM	Nova Zelândia	HM629428.1
15	<i>Scytonema</i> DQ531698	Califórnia, EUA	DQ531698.1
16	<i>Scytonematopsis</i> sp.	Rio Grande do Sul, Brasil	AJ619686.1
17	<i>Scytonema</i> sp. HQ	Portugal	HQ832905.1
18	<i>Scytonema</i> sp. AY	Havaí, EUA	AY069954.1
19	<i>Brasilonema roberti-lammi</i>	México	GQ443308.1
20	<i>B. octagenarum</i>	Minas Gerais, Brasil	EF150855.2
21	<i>Brasilonema</i> CENA114	São Paulo, Brasil	EF117246.1
22	<i>B. bromeliae</i>	São Paulo, Brasil	DQ486055.1
23	<i>B. terrestre</i>	Minas Gerais, Brasil	EF490447.1
24	<i>Petalonema</i> sp.	Antártida	AY493624.1
25	<i>Tolypothrix</i> sp AM	Suécia	AM230706.1
26	<i>Tolypothrix</i> sp. PCC7415	Suécia	AM230668.1
27	<i>Tolypothrix</i> sp. JCT1	Califórnia, EUA	DQ531702.1
28	<i>Spirirestis rafaensis</i>	Utah, EUA	AF334691.1
29	<i>Mastigocladopsis</i> sp.	Nova Zelândia	DQ235802.0

A construção da árvore filogenética incluindo as sequências do material estudado e outras de grupos próximos disponíveis no GenBank (figura 60) revela a formação de dois grandes grupos de espécies/populações.

O clado A, constituído com baixos valores de *bootstrap* para ML, NJ e MP, mas com alto valor de probabilidade posterior (0,93), reúne a maioria das espécies cujas sequências foram geradas neste trabalho. Fazem parte desse clado todas as espécies identificadas previamente como *Brasilonema*, *Petalonema alatum* e três populações previamente identificadas como pertencentes ao gênero *Scytonema*. Compõem também esse grupo, cinco espécies de *Brasilonema* e quatro espécies de *Scytonema* cujas sequências foram obtidas junto ao GenBank. Em comum, todas as sequências presentes no clado A são provenientes de organismos com ocorrência em ambientes tropicais, excetuando-se *Scytonema* sp AB093483.1, que foi coletada em região não especificada no Japão.

O clado A, por sua vez, pode ser dividido em dois cladogramas menores (A1 e A2). No grupo A1, com baixo suporte de *bootstrap* e médio suporte de probabilidade posterior, foram posicionados organismos brasileiros pertencentes aos gêneros *Scytonema* e *Brasilonema* (exceto *B. roberti-lammi*, cianobactéria proveniente do México). A proximidade desses organismos na árvore filogenética sugere um parentesco mais próximo que, como indicado pela identidade entre as sequências (Tabela 7), pode ser até mesmo em nível específico.

O grupo A2, com elevado suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior, reúne espécies do gênero *Scytonema* com diferentes procedências, mas principalmente de regiões tropicais, incluindo-se *Scytonema hofmanii* PCC7110, que, embora esteja depositada em banco de cultura europeu (Instituto Pasteur), é proveniente de Bermudas.

Petalonema alatum, sequenciada neste trabalho, posicionou-se isoladamente no clado A. Esse posicionamento revela uma maior identidade da espécie com táxons pertencentes a *Scytonema* e *Brasilonema* do que com *Tolypothrix* e, até mesmo, com uma espécie não identificada do mesmo gênero e proveniente da Antártida (*Petalonema* sp. AY493624).

Atualmente, considera-se que o gênero *Petalonema* deva ser classificado entre as Microchaetaceae (KOMÁREK, 2006), devido ao seu caráter heteropolar, dado pela presença frequente de heterócito na base das ramificações, tal qual encontrado em *Tolypothrix*. O gênero *Petalonema* sempre foi objeto de discussões à respeito de sua validade e posicionamento taxonômico. Geitler (1932) reconhecia *Petalonema* como um táxon válido e bem delimitado, incluído entre as Scytonemataceae. Bourrely (1985) não julgava o gênero válido, pois não considerava suficientes as diferenças com *Tolypothrix*. Sant'Anna (1988), em estudo das Scytonemataceae do estado de São Paulo, corroborou a validade do gênero com base na observação de *P. alatum* e caracterizou o grupo como intermediário entre *Scytonema* e *Tolypothrix*. Os resultados do presente estudo, pelo posicionamento distante entre as duas espécies do gênero, indicam a possibilidade de que *Petalonema* seja heterogêneo quanto às morfoespécies que o compõem. O aumento no número de espécies sequenciadas e um sequenciamento mais extenso do rRNA 16S (além de outros genes) podem auxiliar a esclarecer as incompatibilidades relacionadas ao gênero.

No clado B, constituído sem suporte de *bootstrap* e de probabilidade posterior, posicionou-se a maior parte das espécies cujas sequências foram retiradas do GenBank, com exceção de *Scytonema millei* e *Scytonema* sp.4, ambas produzidas neste trabalho. Ainda excetuando-se estes dois táxons, todos os demais caracterizam-se por serem provenientes de regiões temperadas do globo. Da mesma forma que no clado A, o agrupamento B pode ser dividido em dois sub-grupos (B1 e B2).

O clado B1 inclui exatamente as espécies brasileiras de *Scytonema* e tem médio suporte de *bootstrap* e de probabilidade posterior. As duas sequências têm identidade de 95% e provavelmente constituem espécies distintas, uma vez que diferem dos pontos de vista molecular e morfológico.

As demais espécies agruparam-se no clado B2, que tem baixo a alto valor de *bootstrap* e máxima probabilidade posterior. Reúne espécies de diferentes gêneros, mas reflete as

tendências atuais das classificações das cianobactérias (HOFFMANN et al., 2005; KOMÁREK, 2006).

A avaliação global da árvore filogenética permite evidenciar certa separação dos organismos com origem em ambientes de clima tropical (principalmente no clado A), daqueles originários de locais de clima temperado (clado B). Nesse sentido, a ocorrência quase unânime de populações tropicais no clado A, mesmo com diferentes identificações, deve ser melhor investigada para esclarecer se há realmente algum sentido filogenético nesse resultado.

Embora com suporte sustentado apenas pelo valor de probabilidade posterior, é possível também ressaltar que o clado A1 reflete uma grande proximidade entre os exemplares brasileiros, embora com distintas identificações com base na morfologia. Na proposição de *Brasilonema*, Fiore et al. (2007), além da distinção molecular, apontaram diferenças morfológicas das espécies do gênero e de espécies de *Scytonema*, gênero irmão, que residem principalmente na forma do arranjo dos filamentos nas massas (tendendo a serem paralelos em *Brasilonema*) e na frequência da ocorrência de ramificações (mais esporádicas em *Brasilonema*). A distinção entre os gêneros ainda é problemática do ponto de vista morfológico, visto que os critérios adotados não são estáveis. O aprofundamento das análises para uma melhor diferenciação de *Scytonema* e *Brasilonema* deve incluir o aumento no número de amostras de populações com morfotipos semelhantes, preferencialmente com cultivos unicelulares estabelecidos e gerar sequências com maior número de pares de bases.

Outro aspecto que pode ser observado na árvore filogenética gerada pelas análises é a distribuição das espécies de *Scytonema* por todos os grupos formados. Esse espalhamento pode indicar uma grande variabilidade genética das espécies dentro do gênero. Também não se pode deixar de considerar a possibilidade de erros de identificação taxonômica, levando a avaliações equivocadas sobre a identidade molecular e morfológica das espécies.

A espécie *Scytonema* sp. (DQ531704.1), por exemplo, posicionou-se isoladamente na árvore e constituiu um ramo isolado logo no primeiro ramo. Esse distanciamento não pode ser

explicado dentro de situações normais e pode ser atribuído a erros na sequência produzida, ao sequenciamento de organismos associados e taxonomicamente distintos ou por erro na identificação do organismo. De qualquer modo, a sequência certamente não corresponde a nenhuma espécie de *Scytonema* ou gênero afim.

Conclusão

De maneira geral, os dados desse trabalho revelaram um elevado contingente de diferentes morfotipos similares a *Scytonema* presentes em habitats aeróbicos, diferentes condições considerando-se os parâmetros físicos e químicos analisados. As avaliações moleculares revelaram elevada identidade entre alguns morfotipos distintos, ao mesmo tempo em que indicaram diferenças importantes entre algumas espécies. Também revelaram a necessidade de estudos mais aprofundados para uma melhor distinção entre os gêneros *Scytonema* e *Brasilonema* e melhor definição de *Petalonema*.

As cianobactérias aeróbicas, principalmente pertencentes aos gêneros abordados, representam um importante elemento das comunidades microbianas e ainda são muito pobremente estudadas. O aprofundamento dos trabalhos pode auxiliar no entendimento mais adequado sobre a taxonomia e sobre a filogenia destes grupos e, por consequência, no entendimento das relações dentro das cianobactérias.

G violaceus PCC7421 AY768

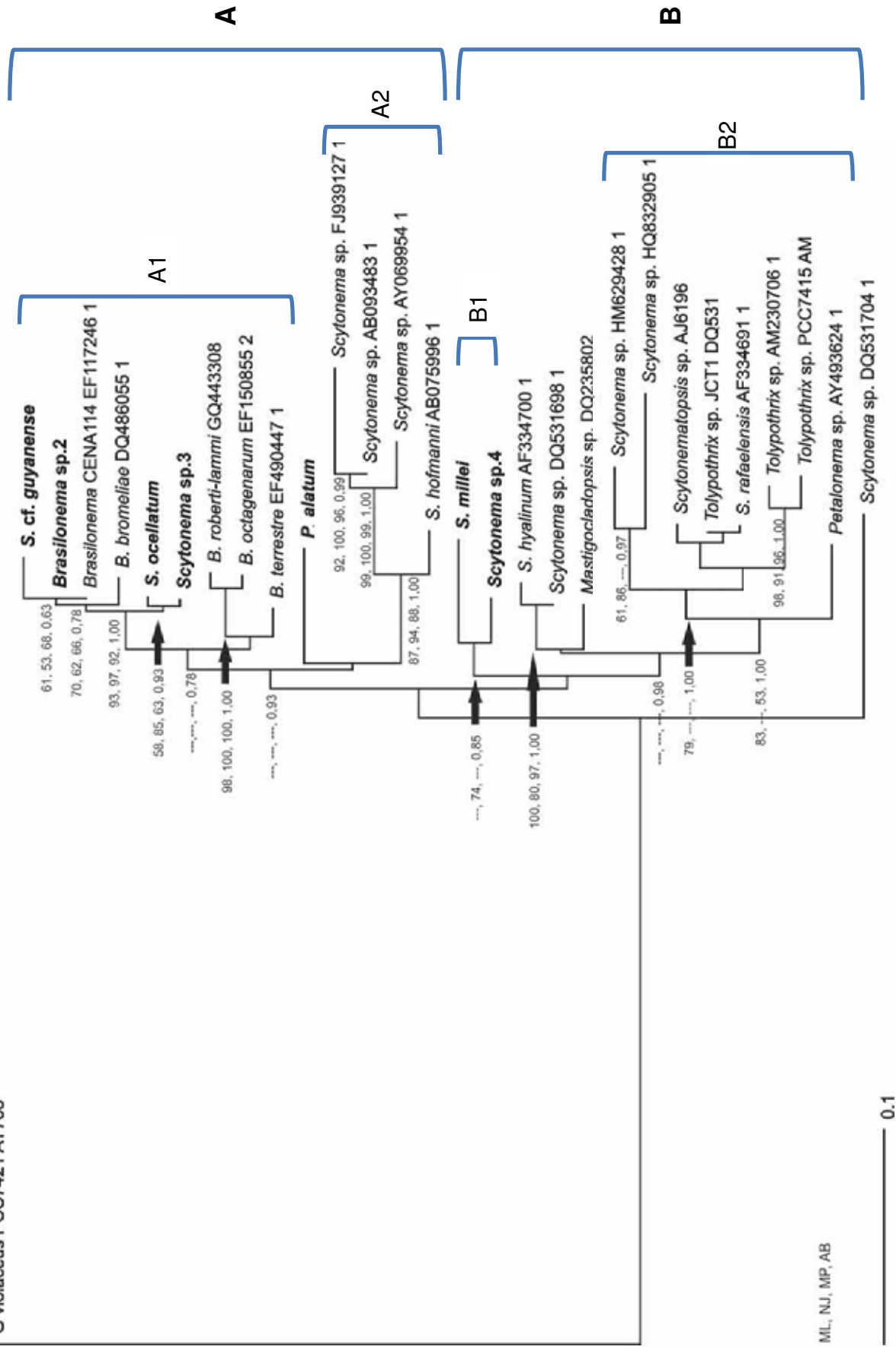


Figura 60: Árvore filogenética de distância *neighbour-joining* construída com base nas sequências obtidas nesse estudo (destacadas em negrito) e em dados disponíveis no GenBank, com aproximadamente 590 pb. Os números associados aos nós indicam os valores de *bootstrap* para MP, MV e NJ e de probabilidade posterior para AB.

Literatura citada

AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A. & ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 1322–1334, 2008.

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

ASENCIO, A.D.; ABOAL, M; HOFFMANN, L. A new cave-inhabiting blue-green algae: *Symphyonema cavernicolum* sp. nova (Mastigocladaceae, Stigonematales). **Algological Studies**, v. 83, p. 73-82, 1996.

AZEVEDO, M.T.P. Edaphic blue-green algae from the São Paulo Botanical Garden, Brazil. **Algological Studies**, v. 64, p. 503-526, 1991.

AZEVEDO, M.T.P. ; SANT'ANNA, C.L. *Cyanostylon gelatinosus*, a new species (Chroococcaceae, Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. **Algological Studies**, v. 75, p. 75-78, 1994a.

AZEVEDO, M.T.P. ; SANT'ANNA, C.L. *Hormothece geitleriana*: A new edaphic chroococcal Cyanophyceae from São Paulo State, Brazil. **Algological Studies**, v. 75, p. 79-83, 1994b.

AZEVEDO, M.T.P. ; NOGUEIRA, N.M.C. ; SANT'ANNA, C.L. Criptógamos do Parque Estadual das fontes do Ipiranga, São Paulo, Sp. *Algas*, 8 : Cyanophyceae. **Hoehnea**, v.23, p. 255-256, 1996

BELNAP, J. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. **Biology Fertility Soils**, v. 35, p. 128-135, 2002.

BHARADWAJA, Y. False branching and sheath structure in the Myxophyceae, with special reference to the Scytonemataceae. **Archiv für Protistenkunde**. V.82, p. 243-283 , 1934.

BOKESCH, H.R.; O'KEEFE, B.R.; McKEE, T.C.; PANNELL, L.K.; PATTERSON, G.M.L.; GARDELA, R.S.; SOWDER, R.C.; TURPIN, J.; WATSON, K.; BUCKHEIT JR., R.W.; BOYD, M.R. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, v. 42, p. 2578-2584, 2003.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans le principaux herbiers de France. *Annales des Sciences Natureles: Botanique*, sér. 7, Paris, v. 5, p. 51-129, 1987.

BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome III: Les algues bleues et rouges**. Paris: Nouvelle Boubée. 1985.

BOYER, S.L.; FLETCHTER, V.R.; JOHANSEN, J.R. Is the 16S23S rRNA Internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 18, p. 1057-106, 2001.

BOYER, S.L.; JOHANSEN, J.R.; FLECHTNER, V.R.; HOWARD, G.L. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the

16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 1222-1235, 2002.

BRANCO, L.H.Z.; AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L.; KOMÁREK, J. New morphospecies of *Symplocastrum* (Phormidiaceae, Oscillatoriales) from aerophytic habitats in Brazil. **Algological Studies**, v. 121, p. 23-33, 2006a.

BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS-FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from Atlantic rainforest region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie, Algologie**, v. 30, p. 135-152, 2009.

BRANCO, L.H.Z.; KOMÁREK, J.; AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L.; WATANABE, M. The cyanobacterial genus *Cyanoarbor* Wang (Chroococcales, Entophysalidaceae) and its occurrence in Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 82, p. 365-380, 2006b.

BÜDEL, B.; BECKER, U.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Cyanobacteria and cyanobacterial lichens from inselbergs of the Ivory Coast. **Botanica Acta**, v. 110, p. 458-456, 1997.

BÜDEL, B.; WEBER, H.M.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Cyanobacteria of inselbergs in Atlantic rainforest zone of eastern Brazil. **Phycologia**, v. 41, p. 498-506, 2002.

CASAMATTA, D.A.; JOHANSEN, J.R.; VIS, M.L.; BROADWATER, S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 41, p. 421-438, 2005.

COUTÉ, A.; TELL, G.; THÉRÉZIEN, Y. Cyanophyceae (Cyanobacteria) aérophiles de Nouvelle-Calédonie. **Cryptogamie, Algologie**, v. 20, p. 301-344, 1999.

DESIKACHARY, T. V. **Cyanophyta**. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research, 686p., 1959.

ETTL, H.; GÄRTNER, G. **Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen**. Berlin: G. Fischer Verlag, 1995.

FERREIRA, V.; BRANCO, L.H.Z. **Caracterização morfológica e diversidade molecular de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com ênfase em organismos aerofíticos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 79f, 2008.

IORE, M.F.; SANT’ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**. v. 43, p. 789-798, 2007.

FLECHTNER, V.R.; BOYER, S.L.; JOHANSEN, J.R.; DENOBLE, M.L. *Spirirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. **Nova Hedwigia**, v. 74, p. 1-24, 2002.

FRÉMY, P. Les Myxophycées de l’Afrique équatoriale française. **Archives des Botanique Mémoire**, v. 3, p. 1-508, 1930.

GARCIA-PICHEL, F.; PRUFERT-BEBOUT, L.; MUYZER, G. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62; p. 3284-3291, 1996.

GARDNER, N. L. Myxophyceae from Porto Rico. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 7, p. 1-144, 1927.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. **Kryptogamen-flora von Deutschland, Österreich un der Schweiz**. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932.

GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 349-357, 2004.

HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. **Current Microbiology**, v. 45, p. 161-164, 2002.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NY. **Nucleic Acids Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOFFMANN, L. Cyanophycées aériennes et subaériennes du Grand-Duché de Luxembourg. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, v. 56, p. 77-127, 1986.

HOFFMANN, L. Terrestrial Cyanophyceae of Papua New Guinea. II. *Cyanobotrys lambinonii* gen. et sp. nov. (Stigonematales). **Algological Studies**. v. 64, p. 349-355, 1991.

HOFFMANN, L. Biogeography of marine blue-green algae. **Algological Studies**. v. 75, p. 137-148, 1994.

HOFFMANN, L. Geographic distribution of freshwater blue-green algae. **Hydrobiologia**, v. 336, p. 33-39, 1996.

HOFFMANN, L.; ASECIO, A.D.; SCHMIT, C. Towards a taxonomic revision of the genus *Scytonema*: morphological, biochemical and molecular approaches. **Algological Studies**. v. 94, p. 173-174, 1999.

HOFFMANN, L. Marine Cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. **European Journal of Phycology**. v. 34, p. 371-379, 1999.

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

JOHANSEN, J.R.; SHUBERT, L.E. Algae in soil. **Nova Hedwigia**, v. 123, p. 297-306, 2001.

KOMÁREK, J. Do all Cyanophytes have a cosmopolitan distribution? Survey of the freshwater Cyanophyte flora of Cuba. **Algological Studies**, v. 71, p. 359-386, 1985.

KOMÁREK, J. Current trends and species delimitation in the cyanoprokaryote taxonomy. **Algological Studies**, v. 75, p. 11-29, 1994.

KOMÁREK, J. Two *Camptylonemopsis* species (cyanoprokaryotes) from “Mata Atlântica” in coastal Brazil. **Preslia**, v. 75, p. 223-232, 2003.

KOMÁREK, J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. **Algae**, v. 21, n. 4, p. 349-375, 2006.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. **Algological Studies**, v. 56, p. 247-345, 1989.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria - a potential source of new biologically active substances. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 61-63, 1999.

KUKK, E.; HALLFORS, G.; NIEMI, A. (2001) *Scytonema alatum* (Carmichael) Borzi (Nostocophyceae, Nostocales) in a lake in Kuusamo, NE Finland. **Algological Studies**, v. 103, p. 47-61, 2001.

KUMAR, A.; SINGH, D.P.; TYAGI, M.B.; KUMAR, A.; PRASUNA, E.G.; THAKUR, J.K. Production of hepatotoxin by the cyanobacterium *Scytonema* sp. strain BT 23. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 375-380, 2000.

LANE, D.J. **16S/23S sequencing**. In: STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M. (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: Willey and Sons, 1991.

METTING, B. The Systematics and Ecology of soil algae. **The Botanical Review**, v. 47, p. 195-312, 1981.

NEILAN, B.A.; JACOBS, J.; 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**, v. 47, p. 693-697, 1997.

NELISSEN, B.; VAN de PEER, Y.; WILMOTTE, A.; DE WACHTER, R. An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p. 1166-1173, 1995.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3327–3332, 1997.

PAGE, R.D.M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer. **Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PATTERSON, G.M.L.; NOLIS, C.M. Fungal cell-wall polysaccharides elicit an antifungal secondary metabolite (phytoalexin) in the cyanobacterium *Scytonema ocellatum*. **Journal of Phycology**, v. 33, p. 54-60, 1997.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. **Modeltest: testing the model of DNA substitution**. Bioinformatics, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PRESCOTT, G.W. **The algae: a review**. Koenigstein: Otto Koeltz Science, 1984.

RAI, S.K.; MISRA, P.K. Freshwater cyanophyceae from east Nepal. **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy**, v. 17, n. 2, p. 121-139, 2010.

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**, v. 111, p. 1-61, 1979.

SANT'ANNA, C.L. Flora de Cyanophyceae associada a briófitas, município de Campina Verde, MG. **Rickia**, v. 11, p. 129-142, 1984.

SANT'ANNA, C.L. Scytonemataceae (Cyanophyceae) from the State of São Paulo, southern Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 46, p. 519-539, 1988.

SANT'ANNA, C.L.; BRANCO, L.H.Z.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J. New aerophytic morphospecies of *Nostoc* (Cyanobacteria) from São Paulo State, Brazil. **Hoehnea**, v. 34, p. 95-101, 2007.

SANT'ANNA, C.L.; SILVA, S.M.F.; BRANCO, L.H.Z. (1991) Cyanophyceae da Gruta-que-chora, município de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 18, p. 75-97, 1991.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; FIORE, M.; LORENZI, A.; KASTOVSKY, J.; KOMÁREK, J. Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, p. 51-62, 2011.

SARTHOU, C.; THÉREZIEN, Y.; COUTÉ, A. Cyanophycées de l'inselberg des Nourages (Guyane Française). **Nova Hedwigia**, v. 61, p. 85-109, 1995.

STARKS, T.L.; SHUBERT, L.E.; TRAINOR, F.R. Ecology of soil algae: a review. **Phycologia**, v. 20, p. 65-80, 1981.

SWOFFORD, D.L. **PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methos).**

Version 4. Sunderland, Sinauer Associates, 2003.

TENEVA, I.; DZHAMBAZOV, B.; MLADENOV, R.; SCHIRMER, K. Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpc-B-IGS-cpcA* locus.

Journal of Phycology, v. 41, p. 188-194, 2005.

UHER, B. Cyanoabacterium *Petalonema alatum* BERK. Ex KIRCHN. – species variability and diversity. – **Fottea**, v.10, n. 1, p. 83-92, 2010.

ZACKRISSON, O.; DELUCA, T.H.; NILSSON, M.C.; SELLSTEDT, A.; BERGLUND, L.M.

Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. **Ecology**, v. 85, p. 3327-3334, 2004.

