

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

MARIÉLLEN DORNELLES MARTINS

ESTUDOS POLIFÁSICOS DE POPULAÇÕES DE PHORMIDIOIDEAE
(OSCILLATORIALES, CYANOBACTERIA)

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2014

MARIÉLLEN DORNELLES MARTINS

ESTUDOS POLIFÁSICOS DE POPULAÇÕES DE PHORMIDIOIDEAE
(OSCILLATORIALES, CYANOBACTERIA)

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor 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 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Luis Henrique Zanini Branco

Coorientadora: Janaina Rigonato

São José do Rio Preto

2014

MARIÉLLEN DORNELLES MARTINS

ESTUDOS POLIFÁSICOS DE POPULAÇÕES DE PHORMIDIOIDEAE
(OSCILLATORIALES, CYANOBACTERIA)

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor 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 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão examinadora:

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE ZANINI BRANCO – Orientador

Departamento de Zoologia e Botânica / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto/UNESP

Profa. Dra. CÉLIA LEITE SANT’ANNA

Seção de Ficologia / Instituto de Botânica de São Paulo

Profa. Dra. MARLI DE FÁTIMA FIORE

Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos / Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP

Prof. Dr. ORLANDO NECCHI JR.

Departamento de Zoologia e Botânica / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto/UNESP

Profa. Dra. VERA REGINA WERNER

Seção de Botânica de Criptógamas / Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é um sonho que se realiza e, através do meu amor pelas cianobactérias, conheci pessoas que contribuíram, cada uma à sua maneira, para esta conquista. A estas pessoas não poderia deixar de demonstrar publicamente minha gratidão e carinho.

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e Sua presença constante dirigindo meus passos por caminhos tão gratificantes, intrigantes e prazerosos. Pelo Seu infinito amor e misericórdia, sendo meu mantenedor e principal fonte de conforto e esperança.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco, meu orientador, por toda dedicação, apoio, paciência e muitos ensinamentos, além do exemplo de caráter e profissionalismo, desempenhando o verdadeiro papel de orientador.

À Dra. Janaina Rigonato, minha coorientadora, por me iniciar nos caminhos da biologia molecular com tanta paciência, profissionalismo e cuidado. Pela amizade e apoio a mim dedicados e que muito contribuíram para meu crescimento.

À Dra. Vera Regina Werner, quem me apresentou o grupo das cianobactérias de maneira tão apaixonante que ficou impossível não me encantar por elas. Pela amizade, pelas palavras de encorajamento sempre acompanhadas de um cafezinho gostoso. Obrigada pela incansável disposição em me apoiar e pelos valiosos conselhos, além das amostras cedidas. Sem dúvidas, sem os ensinamentos e o apoio dela eu não teria chegado até aqui.

À Dra. Marli de Fátima Fiore, que gentilmente, permitiu-me utilizar, não apenas a infraestrutura de seu laboratório (CENA-USP em Piracicaba) para meu aprendizado das técnicas moleculares, como também as amostras cedidas.

Ao Dr. Orlando Necchi Jr., pelo conhecimento compartilhado ao longo destes anos e pelas amostras cedidas.

Ao Dr. Jiří Komárek, por ter me dado a grande oportunidade de conversar e discutir sobre cianobactérias e, mais detalhadamente, sobre Phormidioideae. Foi uma enorme honra trabalhar com ele e vivenciar sua paixão pelas cianobactérias e seu enorme conhecimento neste universo.

Ao Dr. Otakar Strunecký, pelo convívio harmonioso, disponibilidade em ajudar e pelos conhecimentos compartilhados.

À Dana Švehlová e a todos os profissionais e colegas do Centrum pro Algologii do Institute of Botany de Třeboň (República Checa), por terem me recebido tão prontamente e por terem contribuído com este trabalho.

À Mirka Hanzelová, por ter proporcionado momentos agradáveis de conversas, passeios e muitas risadas durante minha passagem por Třeboň.

Às doutoras Nadia Martins Lemes da Silva e Paula Rahal, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto, especialmente aos professores que muito contribuíram com a minha formação.

Ao IBILCE, por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Aos queridos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas (BETA), Auro, Bruna, Douglas, Haruo, Marcella, Monica, Nadia, Natália e Náthali, pelas conversas científicas e filosóficas, pelos ótimos momentos de descontração, muitos deles regados a café, que tornaram o trabalho muito menos estressante, por juntos termos construído uma amizade que faz do BETA um laboratório único. Vocês estarão para sempre nas minhas melhores lembranças. Tenho consciência de que não conseguiria ter chegado até aqui sem o carinho de todos vocês.

Ao meu amado irmão, Guilherme, pelo apoio, amor e lealdade.

Ao meu amor, Guilherme, pelo apoio e compreensão durante todos esses anos, pelo amor e paciência durante minhas tão longas ausências.

Aos meus pais, por serem minha base, minha segurança, meus exemplos, por jamais deixarem de me apoiar nos caminhos que escolhi. Ao meu amado pai, Joel, pelo exemplo de competência, coragem, pelo apoio e auxílio, minha eterna gratidão, reconhecimento e admiração. À minha mãe, Marta, pelo amor incondicional, pelos melhores conselhos, por ser meu maior exemplo de dedicação e perseverança e por sempre acreditar no meu potencial, até quando eu mesma não acredito.

À Dona Marta Nunes e Paula Tozzato, a família que vim a conhecer e estimar, por me receberem tão bem em sua casa e terem feito eu me sentir acolhida, sempre com palavras de carinho e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

“Com sinceridade confesso que, quanto mais contemplo a devida ordem, visto que uma resulta da outra e se reduz, é como se eu tivesse lido uma passagem celestial não escrita em letras significativas, mas com as coisas essenciais deste mundo que me dizem: Aplique o seu raciocínio aqui para compreender essas coisas.”

Johannes Kepler, no seu calendário para 1604

RESUMO

Os membros da subfamília Phormidioideae são encontrados em ambientes terrestres e aquáticos ocorrendo em uma grande variedade substratos (solos, rochas, troncos e objetos artificiais). Segundo o sistema de classificação vigente, a subfamília é composta por dez gêneros, sendo *Phormidium*, *Trichodesmium*, *Arthrospira*, *Porphyrosiphon* e *Planktothrix* os mais abundantes em número de espécies e frequentes em ocorrência, com amplo destaque para o primeiro. Devido à morfologia relativamente simples, os integrantes de Phormidioideae formam um grupo taxonomicamente complexo e sua plasticidade morfológica está relacionada a fatores ambientais, tornando confusa a distinção de gêneros e espécies. O presente estudo visou contribuir com o conhecimento taxonômico do grupo, por meio de levantamento florístico em diferentes localidades do Brasil. O material coletado foi utilizado para detalhamento taxonômico do grupo, com o uso de ferramentas moleculares (RNAr 16S e ITS 16S-23S), além das ferramentas morfológicas clássicas. Os estudos de identificação revelaram 27 espécies, das quais 22 pertencem ao gênero *Phormidium*, três ao *Porphyrosiphon*, uma ao *Planktothrix* e uma ao *Planktothricoides*. Entre as 27 espécies, *Phormidium animale* é primeiro registro de ocorrência para o Brasil e 11 são possíveis novos táxons. Estudos morfológicos e moleculares reforçam que a circunscrição de gêneros e espécies de Phormidioideae ainda é bastante confusa. Enquanto os marcadores morfológicos utilizados não refletiram a história evolutiva do grupo, os moleculares revelaram-se taxonomicamente válidos, devendo ser considerados a base para a construção da classificação de Phormidioideae. As análises revelaram que a subfamília é polifilética. *Porphyrosiphon* revelou-se um gênero geneticamente suportado, porém, *P. notarisii* trata-se de um complexo de espécies. A flora brasileira mostrou-se diversa, com sete novos gêneros morfológica e geneticamente definidos.

ABSTRACT

The Phormidioideae members are found in terrestrial and aquatic environments, growing on a wide variety of substrates (soil, rocks, barks of trees and artificial objects). According to the usual classification, the subfamily comprises ten genera, of which *Phormidium*, *Trichodesmium*, *Arthrospira*, *Porphyrosiphon* e *Planktothrix* are the most abundant in number of species. Due to its relatively simple morphology, the members of Phormidioideae form a taxonomically complex group and its morphological plasticity is related to environmental factors, making confusing the distinction of genera and species. This study aimed to contribute to the taxonomic knowledge of the group through floristic survey in different regions of Brazil. The collected material was used for detailed taxonomic group, using molecular tools (16S rRNA gene and the 16S-23S ITS), besides the classic morphological tools. The identification studies revealed 27 species, 22 belong to *Phormidium*, three to *Porphyrosiphon*, one to *Planktothrix* and one to *Planktothricoides*. Among them, *Phormidium animale* is the first occurrence in Brazil and 11 are new species to science. Morphological and molecular studies reinforce that the division of genera and species of Phormidioideae is still quite confusing. While the morphological markers used did not reflect the evolutionary history of the group, the molecular proved taxonomically valid and should be considered the basis for the construction of classification of Phormidioideae. Analyses revealed that the subfamily is polyphyletic. *Porphyrosiphon* is genetically supported genus, but *P. notarisii* is a collective species. The flora proved to be diverse, with seven new genera morphologically and genetically defined.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
CAPÍTULO I: Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) de diferentes regiões do Brasil: taxonomia segundo os critérios clássicos	14
1. RESUMO	15
2. INTRODUÇÃO	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO II: Estudos moleculares e filogenia de Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) do Brasil	67
1. RESUMO	68
2. INTRODUÇÃO	69
3. MATERIAL E MÉTODOS	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
CONCLUSÕES GERAIS	159

INTRODUÇÃO

As cianobactérias são os mais antigos organismos fotossintetizantes, tendo desempenhado papel crítico na introdução de O₂ na atmosfera e no desenvolvimento dos mecanismo de produção primária de matéria orgânica no planeta (WHITTON & POTTS, 2000). As cianobactérias atuais são responsáveis por uma parte essencial da produção primária dos ecossistemas onde estão inseridos, tais como oceanos (HONDA et al., 1999; SCANLAN et al., 2009), águas continentais (LYRA et al., 2001; 2005), áreas alagadas (REJMANKOVÁ et al., 2004), alcalinas (SANTOS et al., 2011) e ambientes extremos, incluindo águas termais (MILLER et al., 2007), desertos quentes e gelados, regiões polares, hipersalinos (WHITTON & POTTS, 2000; STRUNECKY et al., 2010). O conhecimento da diversidade e importância ecológica desses organismos é urgente tanto em ambientes aquáticos como em terrestres.

Os primeiros relatos de representantes do grupo são mais antigos que os relatos de outros procariontes (p.e. Linnaeus 1753, segundo OREN 2011). Durante o século XIX, muitos gêneros de Cyanobacteria foram descritos por botânicos como Roth, Bory, Kützinger, Lyngbye, Agardh, Gomont, etc. Muitos outros botânicos descreveram um grande número de espécies com base em características morfológicas e, ao longo do tempo, outros aspectos começaram a ser considerados até atualmente, onde o sequenciamento do gene RNAr 16S e, mais recentemente, o espaçador intergênico 16S-23S (ITS 16S-23S) tornaram-se a base dos estudos taxonômicos. O grande número de espécies descritas por vários taxonomistas conduziu a uma revisão do grupo de forma que a tendência atual nos estudos taxonômicos com Cyanobacteria unem esforços na reavaliação de gêneros e espécies.

Ao longo da história dos estudos taxonômicos, espécies e gêneros de Phormidioideae foram revisados enquanto outros foram raramente relatados, de forma que grande parte o grupo permanece taxonomicamente indefinido. Considerando a carência de estudos com os organismos da subfamília Phormidioideae no Brasil e sua importância ecológica nos ambientes onde ocorrem, a ampliação e o aprimoramento de estudos moleculares, um melhor detalhamento da caracterização morfológica e ecológica dos integrantes da subfamília é de fundamental importância. Os estudos tradicionais sobre diversidade, taxonomia e ecologia ainda são a base de informações para o grupo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil.

Objetivos

Geral

A caracterização polifásica (abordagem morfológica, ecológica e molecular) de populações de Phormidioideae provenientes de diferentes ambientes. O estudo dos organismos encontrados poderá contribuir com dados importantes para uma melhor delimitação de gêneros e espécies.

Específicos

1. Ampliar o conhecimento da diversidade e distribuição da subfamília Phormidioideae.

Hipótese: espera-se encontrar diferentes espécies dos principais gêneros de Phormidioideae, sendo provável o registro de novas ocorrências para o território nacional. *Phormidium* deve ser o gênero com maior número de espécies registradas. A existência de novos táxons (gênero e espécies) para a ciência é uma possibilidade, considerando-se o desconhecimento da flora em regiões tropicais e subtropicais.

2. Avaliar as características morfológicas, ecológicas e moleculares das populações de diferentes localidades, visando contribuir com o estudo das relações filogenéticas entre os representantes da subfamília.

Hipótese: o uso combinado dos marcadores morfológicos, ecológicos e moleculares mostrar-se-á bom para o delineamento de gêneros e espécies.

3. Estudar e avaliar critérios taxonômicos utilizados na classificação.

Hipótese: o RNAr 16S e o ITS 16S-23S mostrar-se-ão bons marcadores para construção de filogenias, bem como a delimitação de gêneros e espécies. Espera-se ainda observar incongruências entre marcadores moleculares e morfológicos e, estes, juntamente com características ecológicas serão informativos em nível específico.

A presente tese está dividida em dois capítulos independentes referentes aos estudos de levantamento florístico e aos estudos moleculares e de filogenia dos representantes de Phormidioideae, finalizando com uma conclusão geral.

Os capítulos têm como título:

Capítulo 1- Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) de diferentes regiões do Brasil: taxonomia segundo os critérios clássicos

Capítulo 2- Estudos moleculares e filogenia de Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) do Brasil

Referências Bibliográficas

- HONDA, D.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of Five marine *Synechococcus* strains. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 6, p. 723-739, 1999.
- LYRA, C.; LAAMANEN, M.; LEHTIMAKI, J.M.; SURAKKA, A.; SIVONEN, K. Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55 (2): 555-568, 2005.
- LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; GUGGER, M.; VEZIE, C.; SUNDMAN, P.M.; SIVONEN, K. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 513-526, 2001.
- MILLER, S.R.; CASTENHOLZ, R.W.; PODERSEN, D. Phylogeography of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4751-4759, 2007.
- OREN, A. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy/International Journal of Systematic Bacteriology/International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 10-15, 2011.
- REJMÁNKOVÁ, E.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Cyanobacteria – a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 189-199, 2004.
- SANTOS, K.R.S.; JACINAVICIUS, F.R.; SANT'ANNA, C.L. Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. **Fottea**, v. 11, n. 1, p. 119-126, 2011.
- SCANLAN, D.; OSTROWSKI, M.; MAZARD, S.; DUFRESNE, A.; GARCZAREK, L.; HESS, W.; POST, A.; HAGEMANN, M.; PAULSEN, I.; PARTENSKY F. Ecological genomics of marine picocyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 249-299, 2009.
- STRUNECKÝ, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Phylogenetic relationships between geographically separate Phormidium cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? **Polar Biology** v. 33, p. 1419-1428, 2010.
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669p.

CAPÍTULO I:

**Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) de
diferentes regiões do Brasil: taxonomia segundo os critérios clássicos**

1. RESUMO

Os integrantes da subfamília Phormidioideae exibem plasticidade e simplicidade morfológicas que, associadas a fatores ambientais, tornam confusa a distinção de espécies e gêneros, caracterizando o grupo como taxonomicamente complexo. Esses organismos são encontrados em uma grande variedade de habitats de maneira frequente, abundante e diversificada. Considerando-se a importância e a representatividade dos gêneros de Phormidioideae nos diferentes ambientes, o intuito desse estudo foi de contribuir com o conhecimento sobre a ocorrência das espécies em território nacional e apresentar as características morfológicas das espécies/populações encontradas em ambientes aquáticos e aerofíticos. O levantamento foi realizado em diferentes estados brasileiros, sendo estes do Ceará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Roraima e, principalmente, de São Paulo, abrangendo regiões de florestas ombrófilas densa e mista, fragmentos de floresta estacional decidual e semidecidual e regiões de savana, savana estépica, estepe e formações pioneiras. Neste estudo foram observados 27 espécies, das quais 22 pertencem ao gênero *Phormidium*, três ao *Porphyrosiphon*, uma ao *Planktothrix* e uma ao *Planktothricoides*. O maior número de espécies foi registrado em áreas de floresta estacional semidecidual (21 espécies), seguida das áreas de floresta ombrófila densa e de formações pioneiras (sete espécies cada), das áreas de floresta ombrófila mista e de savana (três espécies cada) e das áreas de estepe, savana estépica e de floresta estacional decidual (uma espécie cada). Esse levantamento revelou uma nova ocorrência para o Brasil (*Phormidium animale*) e 11 possíveis novos táxons específicos. Esses resultados corroboram a ideia de que regiões tropicais apresentam uma diversidade elevada e pouco conhecida.

2. INTRODUÇÃO

Phormidioideae, uma subfamília de Phormidiaceae, é caracterizada por desenvolver tricomas isopolares solitários ou agregados, com ou sem bainha mucilaginosa, células geralmente isodiamétricas e reprodução a partir da fragmentação dos tricomas em hormogônios, com formação de necrídios, composta por 10 gêneros: *Arthrospira*, *Phormidium*, *Planktothricoides*, *Planktothrix*, *Porphyrosiphon*, *Proterendothrix*, *Pseudophormidium*, *Symploca*, *Trichodesmium* e *Tychonema* (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005).

Phormidioideae trata-se de uma das subfamílias mais frequentes e abundantes, presentes em vários tipos de ambientes. Ocorrem em ambientes aquáticos de água doce, lênticos ou lóticos, e marinhos, podendo contribuir significativamente para a produção primária desses ecossistemas (WHITTON & POTTS, 2000; WETZEL, 1983; PADISÁK, 2003). Alguns representantes dessa subfamília são encontrados também em ambientes aerofíticos, tais como solos, principalmente em regiões de vegetação escassa, desempenhando papel importante de colonizadores primários (METTING, 1981). Ainda podem ocorrer em rochas e em troncos de árvores (FRÉMY, 1930; DESIKACHARY, 1959).

Algumas espécies são conhecidas por formarem florações e produzirem toxinas em reservatórios em todo o mundo, gerando problemas de saúde pública e ambientais. Por exemplo, *Planktothrix* é um gênero de Phormidioideae conhecido por formar florações em águas brasileiras (AQUINO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012). *Trichodesmium* é outro gênero de Phormidioideae conhecido por formar florações em águas marinhas (WESTBERRY & SIEGEL, 2006).

Um dos primeiros estudos taxonômicos que compreendeu os organismos de Phormidioideae foi desenvolvido por Gomont (1892). Além deste, outros trabalhos de grande importância, baseados em dados morfológicos e seguindo os moldes botânicos, foram

desenvolvidos como por Frémy (1929-1933, 1930), Geitler (1932, 1942), Elenkin (1935, 1938-1949), Desikachary (1959), Starmach (1966) e Bourrelly (1970).

A circunscrição de alguns gêneros de Phormidioideae ainda é confusa e esses problemas de delimitação e proximidade entre os membros da subfamília levam a diferentes interpretações sobre a validade de muitos táxons desta, pois as variações morfológicas, que comumente ocorrem, não permitem uma correta distinção taxonômica entre os organismos.

Phormidium Kützing ex Gomont, gênero mais representativo da subfamília, com mais de 200 morfoespécies descritas e com ampla distribuição no globo, é considerado, taxonomicamente, um dos gêneros mais complexos entre as cianobactérias (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Originalmente, o gênero englobava os organismos que desenvolvem talos mucilaginosos, formados por aglomerados de filamentos com bainha mucilaginosa firme, fina, incolor; tricomas cilíndricos, constrictos ou não, atenuados ou não, retos ou flexuosos, capitados ou não; célula apical com ou sem caliptra (GOMONT, 1892).

Posteriormente, Anagnostidis & Komárek (1988) classificaram as espécies que compunham o gênero baseado nas seguintes características: tricomas cilíndricos, retos ou flexuosos, ou podendo variar de levemente a intensamente espiralados e de não constrictos a constrictos; habilidade de formar bainha mucilaginosa, quando sob determinadas condições ambientais; bainha mucilaginosa firme, não lamelada; tricomas móveis dentro da bainha, sem ramificações falsas; células normalmente isodiamétricas ou variando de mais curtas ou longas que largas; sem aerótopos; reprodução através da fragmentação do tricomas, formando hormogônios com auxílio de necrídios.

Komárek & Anagnostidis (2005) definem como *Phormidium*, as cianobactérias que desenvolvem talos gelatinosos ou membranáceos, aderidos a um substrato ou flutuantes na água; filamentos variavelmente curvos, sem ramificações; bainha mucilaginosa facultativa, firme ou delicada, usualmente incolor, não lamelada; tricomas cilíndricos, retos, flexuosos ou

leve a fortemente ondulados, não constrictos a constrictos; células isodiamétricas ou mais longas ou curtas que largas; sem aerótopos; célula apical cônica, atenuada ou arredondada, com ou sem caliptra; reprodução através da desintegração do tricoma em hormogônios longos ou curtos, usualmente com formação de necrídios. As morfoespécies que compõem o gênero, segundo estes mesmos autores, dividem-se em oito grupos de acordo com a morfologia da região apical do tricoma.

Planktothrix Anagnostidis et Komárek, gênero de importância pela formação de florações potencialmente tóxicas, foi originalmente classificado no gênero *Oscillatoria* Vaucher ex Gomont, por desenvolver tricomas solitários, sem bainha mucilagínosa, acinetos e heterócitos (GOMONT, 1892). Posteriormente, Anagnostidis & Komárek (1988), separaram *Planktothrix* de *Oscillatoria*, baseados na capacidade de formar aerótopos e no hábito planctônico desses organismos. Atualmente, sabe-se que *Planktothrix* consiste num gênero bem delimitado morfológica e geneticamente (SUDA et al., 2002) e caracteriza-se por desenvolver tricomas retos com células cilíndricas que variam de mais curtas que largas a isodiamétricas e estas apresentam aerótopos distribuídos por todo o citoplasma.

Planktothricoides Suda et Watanabe é morfológicamente semelhante a *Planktothrix*, no entanto, trata-se de um gênero geneticamente bem delimitado (SUDA et al., 2002) e estes podem ser diferenciados pela distribuição dos aerótopos na célula, onde, em *Planktothricoides*, os aerótopos estão dispostos na periferia das células e, em *Planktothrix* os aerótopos encontram-se distribuídos em todo o citoplasma celular.

Porphyrosiphon Kützinger ex Gomont trata-se de um gênero constituído principalmente por espécies aerofíticas, ocorrendo em rochas úmidas, geralmente de ambientes montanhosos, em cascas de árvores e no solo. Poucas espécies são marinhas e algumas são conhecidas ocorrendo no perifíton (KOMÁREK & HAUER, 2014). Os representantes do gênero apresentam morfologia muito semelhante às espécies de *Phormidium* e a principal característica

que distingue *Porphyrosiphon* dos demais gêneros de Phormidiaceae é a bainha mucilagínosa, que é lamelada e geralmente colorida. Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), a proximidade de *Porphyrosiphon* e *Phormidium* é grande e o gênero só é aceito por questões práticas.

Segundo Komárek & Hauer (2014), *Phormidium* é composto por mais de 140 espécies, *Planktothricoides* por 2, *Planktothrix* por 13 e *Porphyrosiphon* por 15 espécies, distribuídas em todas as regiões do globo.

As principais características usadas para a separação das espécies desses gêneros são hábito do talo, arranjo dos filamentos, forma e tamanho celulares, morfologia do ápice dos tricomas e presença de espessamento ou caliptra. O grande número de espécies descritas, somado à simplicidade morfológica do grupo torna a identificação específica problemática.

Estudos sobre a diversidade desses organismos têm sido realizados desde que os gêneros foram descritos, principalmente em ambientes aquáticos continentais e, os trabalhos com organismos aerofíticos aumentaram nos últimos anos. O maior número de trabalhos corresponde à região europeia. Outros trabalhos foram realizados na África, América do Norte (Estados Unidos da América), Ásia (Índia, China e Japão) e, mais recentemente, o número de trabalhos desenvolvidos nas Américas Central e do Sul vêm aumentando. Muitos desses trabalhos mostram sobreposição das espécies encontradas, trazendo à tona discussões sobre o cosmopolitismo de espécies e distribuição geográfica como fator determinante na delimitação de algumas espécies. Embora seja documentada a ocorrência desses organismos em todas as regiões do globo, as regiões tropicais detêm maior riqueza que as regiões temperadas (KOMÁREK, 2011).

O Brasil possui grande variedade de ecossistemas, incluindo aquáticos e aerofíticos, onde pouco se conhece sobre a diversidade e distribuição de Phormidioideae. Grande parte dos estudos realizados concentra-se na região sudeste, principalmente no estado de São Paulo, e sul

(BICUDO & BICUDO, 1969; SENNA, 1979, 1982; BAETA-NEVES, 1983, 1992; SANT'ANNA et al., 1983, 1985, 1989, 1991, 1995; SANT'ANNA, 1984; SENNA & PEREIRA, 1986; WERNER, 1988, 2002; HUSZAR et al., 1989; AZEVEDO, 1991; WERNER & ROSA, 1992; SANT'ANNA & AZEVEDO, 1995; AZEVEDO et al., 1996; BRANCO et al., 1997, 2009; LEMES-DA-SILVA et al., 2012; MARTINS et al., 2012).

Dentro deste contexto, este estudo tem o objetivo de contribuir para o conhecimento da diversidade das espécies de Phormidioideae em território nacional e apresentar características morfológicas das espécies/populações encontradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das amostras

As áreas de estudo incluíram oito formações vegetacionais (IBGE, 2004): 1-Floresta Ombrófila Densa; 2-Floresta Ombrófila Mista; 3-Floresta Estacional Semidecidual; 4-Floresta Estacional Decidual; 5-Savana; 6-Savana Estépica; 7-Estepe; 8-Formações Pioneiras. (Figura 1, Tabela 1). Dentre as amostras estudadas, duas são oriundas da coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP (Tabela 1).

Nessas regiões foram obtidas amostras de ambientes aquáticos e/ou aerofíticos.

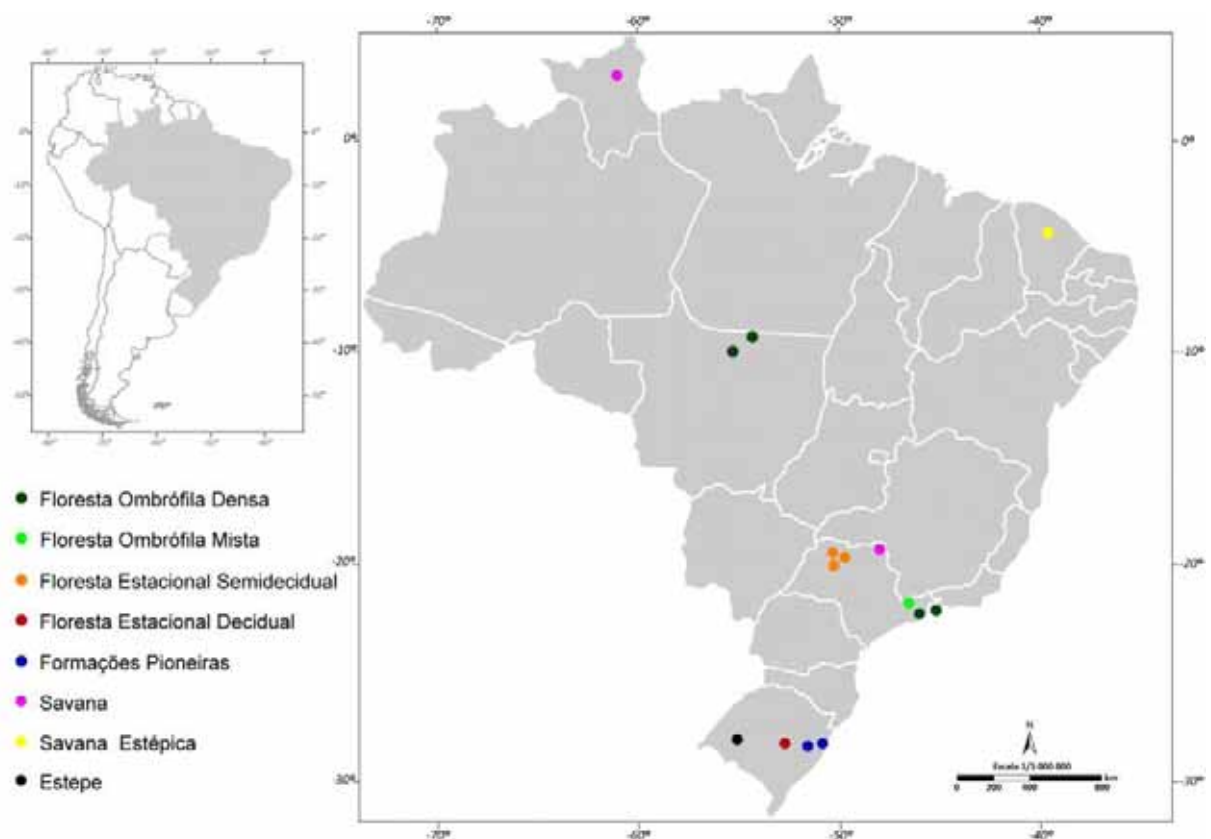


Figura 1. Localização das oito regiões fitoecológicas onde foram feitas as coletas (adaptado de IBGE - http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/)

Tabela 1. Locais de coleta com formações vegetacionais correspondentes. (IBILCE= Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas; APA= Área de Proteção Ambiental; PUCRS= Pontifícias Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Formação vegetal	Procedência	Cidade/UF
Floresta Ombrófila Densa	Cachoeira de Santos Reis	Guaranã do Norte/MT
	Córrego Novo Horizonte	Guaranã do Norte/MT
	Córrego de Guaranã	Guaranã do Norte/MT
	Córrego de Nova Santa Helena	Colíder/MT
	Córrego de Picinguaba – Parque Estadual da Serra do Mar	Ubatuba/SP
Floresta Ombrófila Mista	Rodovia Oswaldo Cruz	São Luiz do Paraitinga/SP
	Arredores do Parque Estadual de Campos do Jordão	Campos do Jordão/SP
Floresta Estacional Semidecidual	Fragmento florestal	Macaubal/SP
	Córrego	Pontes Gestal/SP
	Cachoeira da São Roberto	Pontes Gestal/SP
	Córrego Barra Funda	Ipiguá/SP
	Córrego Talhadinho	Talhados/SP
	Praia das Marianas	Icém/SP
	Rio das Pedras	São José do Rio Preto/SP
	Córrego do Jacaré	Neves Paulista/SP
	Quinta da Estância Grande	Viamão/RS
	Fragmento Florestal	Santa Cruz do Sul/RS
	Barranco do Rio Caí – Polo Petroquímico do Sul	Montenegro/RS
	Córrego na BR 174 – km 57	Boa Vista/RR
	Córrego Euclides Brentino	Pedregulho/SP
Savana	Tilha do Lobo - Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus	Pedregulho/SP

Tabela 1. (concl.)

Formação vegetacional	Procedência	Cidade/UF
Savana Estépica	Lago de Canindé*	Canindé/CE
Estepe	Passo das Carretas – APA do Ibirapuitã	Alegrete/RS
Formações Pioneiras	Lagoa das Custódias	Tramandaí/RS
Área urbana	Córrego Felicidade*	São José do Rio Preto/SP
	Casa de vegetação – IBILCE	São José do Rio Preto/SP
	IBILCE	São José do Rio Preto/SP
	Jardim Nazareth	São José do Rio Preto/SP
	Centro Histórico de Parati	São José do Rio Preto/SP
	Lago Gualba	Parati/RJ
	Lago das Tartarugas - Jardim Botânico	Porto Alegre/RS
	Lago da Ponte - Jardim Botânico	Porto Alegre/RS
	Parque Farroupilha	Porto Alegre/RS
	PUCRS	Porto Alegre/RS

* - Amostra oriunda da coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP

Os trabalhos de campo foram realizados entre fevereiro de 2010 e julho de 2013, concentrados, principalmente no período chuvoso, para coleta de organismos aerofíticos e, período de seca para os organismos aquáticos.

Foram coletadas amostras em ambientes aerofíticos e aquáticos nas quais as cianobactérias planctônicas foram coletadas através da filtragem da água e concentração com rede de plâncton de 25µm de abertura de malha, passada, no mínimo 30 vezes, a aproximadamente 20 cm da superfície da água. Para obtenção de material bentônico ou aerofítico, o material com biomassa macroscópica foi recolhido com o auxílio de espátulas e canivetes e foram armazenados em sacos de papel, enquanto o material aquático foi acondicionado em frascos de plástico transparentes. Parte do material coletado foi mantida em geladeira para maior conservação das características morfológicas para os estudos de identificação. Outra parte representativa desse material foi colocado em formaldeído 4% e será depositado no Herbário SJRP (THIERS, 2014).

3.2 Estudos morfológicos e de identificação

Os organismos que formavam massas macroscópicas foram, primeiramente, observados em microscópio estereoscópico (Zeiss 47 50 52) para análise e registro das características gerais da massa. Posteriormente os organismos foram estudados detalhadamente em microscópio fotônico Olympus BH2 e fotografados com câmera digital Sony DSC-W150, ajustada diretamente a ocular.

Os estudos morfológicos foram realizados a partir de espécimes vivos provenientes das amostras coletadas. Os caracteres analisados para a avaliação morfológica e estudo taxonômico foram: 1) presença ou ausência, forma, dimensões e coloração da bainha mucilagínosa; 2) estrutura do tricoma; 3) forma e ápice do tricoma; 4) forma e dimensões celulares; 5) presença ou ausência e disposição de grânulos; 6) presença ou ausência e disposição de aerótopos. Foram feitas observações de 30 organismos (com medidas de diâmetro do filamento e/ou do tricoma)

e de cada um destes foram feitas 20 medidas de comprimento celular para obtenção da diversidade morfológica das populações encontradas.

O sistema de classificação utilizado foi o de Hoffmann et al. (2005) modificado por Komárek (2006) e a identificação específica foi baseada na literatura especializada para a taxonomia do grupo.

As espécies foram descritas utilizando-se as seguintes abreviações: diâm. (diâmetro) e compr. (comprimento).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas 60 populações, pertencentes aos gêneros *Phormidium*, *Planktothricoides*, *Planktothrix* e *Porphyrosiphon*. As 52 populações de *Phormidium* correspondem a 22 espécies, sendo nove delas identificadas apenas em nível genérico, por não apresentarem características morfológicas e/ou ecológicas correspondentes às espécies já descritas. Foram estudadas seis populações de *Porphyrosiphon*, quatro delas identificadas como *P. notarisii*. Apenas uma linhagem foi identificada como pertencente ao gênero *Planktothricoides* (*P. raciborskii*) e uma ao gênero *Planktothrix* (*P. isothrix*) (Tabela 2, Figuras 2-50). Abaixo, são apresentadas chaves dicotômicas para as espécies encontradas.

Chave artificial para identificação das espécies encontradas nesse levantamento:

1. Tricomas com aerótopos.....2
1. Tricomas sem aerótopos3
 2. Tricomas retos, não atenuados no ápice *Planktothrix isothrix*
 2. Tricomas curvos no ápice, levemente atenuados.....*Planktothricoides raciborskii*
3. Bainha mucilaginosa obrigatória, espessa, lamelada4
3. Bainha mucilaginosa facultativa, fina, homogênea6
 4. Filamentos até 19 µm diâm.....*Porphyrosiphon* sp.2
 4. Filamentos maiores que 19 µm diâm.5
5. Bainha mucilaginosa incolor, conteúdo celular homogêneo*Porphyrosiphon* sp.1
5. Bainha mucilaginosa avermelhada, conteúdo celular granuloso *P. notarisii*
 6. Tricomas retos, não atenuados no ápice7
 6. Tricomas curvos, atenuados no ápice 19
7. Tricomas maiores que 13 µm diâm.*Phormidium* sp.5
7. Tricomas até 13 µm diâm.8

8. Células apicais cônicas	9
8. Células apicais cilíndrico-arredondadas a levemente cônicas	11
9. Célula apical com espessamento na parede externa	<i>P. crouanii</i>
9. Célula apical sem espessamento na parede externa.....	10
10. Tricomas com células mais curtas que largas	<i>P. papyraceum</i>
10. Tricomas com células isodiamétricas a mais longas que largas	<i>P. inundatum</i>
11. Organismos aerofíticos	12
11. Organismos aquáticos.....	17
12. Células sempre mais curtas que largas	13
12. Células com comprimento variável, em geral isodiamétricas	14
13. Tricomas até 8 µm diâm.	<i>P. cf. ambiguum</i>
13. Tricomas maiores que 8 µm diâm.	<i>Phormidium</i> sp.8
14. Célula apical levemente cônico-arredondada	15
14. Célula apical cilíndrico-arredondada	16
15. Célula apical sem espessamento	<i>Phormidium</i> sp.1
15. Célula apical com espessamento	<i>Phormidium</i> sp.4
16. Tricomas não constrictos	<i>Phormidium</i> sp.2
16. Tricomas distintamente constrictos	<i>Phormidium</i> sp.3
17. Célula apical truncada	<i>P. retzii</i>
17. Célula apical cilíndrico-arredondada a cônica.....	18
18. Células isodiamétricas a mais longas que largas, septos não granulosos	
.....	<i>P. aerugineo-caeruleum</i>
18. Células mais curtas que largas a isodiamétricas, septos granulosos.....	
.....	<i>P. tergestinum</i>
19. Célula apical sem caliptra ou espessamento.....	20

19. Célula apical com caliptra ou espessamento	24
20. Tricomas atenuados apenas no ápice	21
20. Tricomas gradualmente atenuados	23
21. Organismos aquáticos.....	<i>P. formosum</i>
21. Organismos aerofíticos	22
22. Célula apical cônico-arredondada	<i>P. cf. formosum</i>
22. Célula apical cilíndrico-arredondada	<i>Phormidium</i> sp.9
23. Células isodiamétricas a mais curtas que largas	<i>P. animale</i>
23. Células isodiamétricas a mais longas que largas	<i>P. terebriforme</i>
24. Organismos aquáticos	25
24. Organismos aerofíticos	26
25. Tricomas até 6 µm diâm.	<i>P. cf. uncinatum</i>
25. Tricomas maiores que 8 µm diâm.	<i>Phormidium</i> sp.7
26. Célula apical capitada	<i>Phormidium</i> sp.6
26. Célula apical cônico-arredondada.....	<i>P. cf. vulgare</i>

Tabela 2. Origem das populações estudadas. (CP = Coleção Phormidioideae, IBILCE = Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; SJRP = São José do Rio Preto)

Amostra	Táxon	Latitude/Longitude	Origem	Habitat/substrato
1CP	<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i>	09°46'07"S/54°39'09"W	Córrego de Guarantã do Norte/MT	Aquático/ sedimento arenoso
2CP	<i>P. aerugineo-caeruleum</i>	09°45'23"S/54°34'46"W	Cachoeira de Santos Reis, Guarantã do Norte/MT	Aquático/ sedimento arenoso
3CP	<i>P. cf. ambiguum</i>	20°38'45"S/49°24'13"W	Barra Funda, Ipiгуá/SP	Aerofítico/solo
4CP	<i>P. cf. ambiguum</i>	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
5CP	<i>P. cf. ambiguum</i>	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macauba/SP	Aerofítico/ tronco
6CP	<i>P. animale</i>	29°59'10"S/55°45'27"W	Margens do rio Ibirapuitã, Alegrete/RS	Aerofítico/solo
7CP	<i>P. crouanii</i>	23°13'03"S/ 44°43'11"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ tronco
8CP	<i>P. formosum</i>	20°51'39"S/49°36'54"W	Córrego Barra Funda, Ipiгуá/SP	Aquático/ sedimento arenoso
9CP	<i>P. formosum</i>	20°51'36"S/49°33'59"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
10CP	<i>P. cf. formosum</i>	29°43'28"S/52°26'26"W	Fragmento florestal, Santa Cruz do Sul/RS	Aerofítico/solo
11CP	<i>P. cf. formosum</i>	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macauba/SP	Aerofítico/ tronco
12CP	<i>P. cf. formosum</i>	22°40'38"S/45°38'54"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
13CP	<i>P. cf. formosum</i>	23°13'03"S/44°42'43"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/solo
14CP	<i>P. inundatum</i>	12°22'34"S/55°36'36"W	BR163, Sorriso/MT	Aquático/ sedimento arenoso
15CP	<i>P. inundatum</i>	22°42'57"S/45°33'31"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
16CP	<i>P. inundatum</i>	20°56'01"S/49°23'28"W	Rio das Pedras, SJRP/SP	Aquático/ sedimento arenoso
17CP	<i>P. inundatum</i>	22°40'38"S/45°38'54"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
18CP	<i>P. inundatum</i>	30°03'49"S/51°10'38"W	Parque Farroupilha, Porto Alegre/RS	Aerofítico/solo
19CP	<i>P. inundatum</i>	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
20CP	<i>P. inundatum</i>	23°22'31"S/44°49'37"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso

Tabela 2. (cont.)

		*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
21CP	<i>P. inundatum</i>			
22CP	<i>P. inundatum</i>	20°43'24"S/49°18'20"W	Córrego Talhadinho, SJRP/ SP	Aquático/ sedimento arenoso
23CP	<i>P. inundatum</i>	30°02'38"S/51°13'19"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
24CP	<i>P. inundatum</i>	23°13'03"S/44°42'43"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ solo
25CP	<i>P. inundatum</i>	23°22'16"S/44°49'50"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
26CP	<i>P. inundatum</i>	23°13'05"S/44°42'47"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ tronco
27CP	<i>P. inundatum</i>	20°47'04"S/49°21'41"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ solo
28CP	<i>P. inundatum</i>	30°02'33"S/50°59'35"W	Quinta da Estância Grande, Viamão/RS	Aerofítico/ tronco
29CP	<i>P. inundatum</i>	30°03'43"S/51°10'32"W	Jardim Botânico, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
30CP	<i>P. inundatum</i>	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/solo
31CP	<i>P. papyraceum</i>	20°11'10"S/49°41'06"W	Córrego de Pontes Gestal/SP	Aquático/ sedimento arenoso
32CP	<i>P. retzii</i>	20°47'55"S/49°18'41"W	Córrego Felicidade, SJRP/SP	Aquático/ sedimento arenoso
33CP	<i>P. retzii</i>	23°22'16"S/44°49'50"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
34CP	<i>P. retzii</i>	23°22'47"S/44°49'21"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
35CP	<i>P. retzii</i>	20°51'39"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
36CP	<i>P. retzii</i>	20°38'45"S/49°24'13"W	Córrego Barra Funda, Ipiruá/SP	Aquático/ sedimento arenoso
37CP	<i>P. terebriforme</i>	30°03'06"S/51°10'37"W	Lago das Tartarugas, Porto Alegre/RS	Aquático/ plâncton
38CP	<i>P. tergestinum</i>	20°15'15"S/47°27'23"W	Córrego Euclides Brentino, Pedregulho/SP	Aquático/ sedimento arenoso
39CP	<i>P. cf. uncinatum</i>	20°19'39"S/49°10'14"W	Praia das Marianas, Icém/SP	Aquático/ sedimento arenoso
40CP	<i>P. cf. vulgare</i>	20°47'04"S/49°21'41"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
41CP	<i>Phormidium</i> sp.1	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
42CP	<i>Phormidium</i> sp.2	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco

Tabela 2. (concl.)

43CP	<i>Phormidium</i> sp.3	30°03'30"S/51°10'17"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
44CP	<i>Phormidium</i> sp.4	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
45CP	<i>Phormidium</i> sp.4	20°47'04"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
46CP	<i>Phormidium</i> sp.4	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macauba/SP	Aerofítico/ tronco
47CP	<i>Phormidium</i> sp.5	20°51'36"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
48CP	<i>Phormidium</i> sp.6	20°46'59"S/49°21'30"W	Área urbana, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
49CP	<i>Phormidium</i> sp.7	23°22'12"S/44°49'12"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
50CP	<i>Phormidium</i> sp.7	23°22'12"S/44°49'12"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
51CP	<i>Phormidium</i> sp.8	30°02'38"S/51°13'19"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
52CP	<i>Phormidium</i> sp.9	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
53CP	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	20°51'36"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
54CP	<i>Planktothrix isothrix</i>	*	Lagoa, Canindé/CE	Aquático/ sedimento arenoso
55CP	<i>Porphyrosiphon notarisii</i>	20°21'51"S/49°15'49"W	Reserva Sebastião Porto Meinberg, Icem/SP	Aerofítico/ solo
56CP	<i>Porphyrosiphon notarisii</i>	20°56'1"S/49°23'28"W	Rio das Pedras, SJRP/SP	Aerofítico/ solo
57CP	<i>Porphyrosiphon notarisii</i>	20°13'02"S/47°26'38"W	Trilha do Lobo, Pedregulho/SP	Aerofítico/ solo
58CP	<i>Porphyrosiphon notarisii</i>	20°38'45"S/49°24'13"W	Barra Funda, Ipiguá/SP	Aerofítico/ solo
59CP	<i>Porphyrosiphon</i> sp.1	*	Barranco do rio Cai, Montenegro/RS	Aerofítico/ solo
60CP	<i>Porphyrosiphon</i> sp.2	03°16'56"N/60°50'59"W	BR174 – km 57, Voa Vista, RR	Aerofítico/ solo

* Dados não disponíveis

Phormidium aerugineo-caeruleum (Gomont) Anagnostidis et Komárek, Algolog. Stud., v. 50-53, p. 407. 1998.

(Figura 2)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 7,0-9,0 µm diâm.; tricomas não atenuados, não constrictos, 6,0-7,5 µm diâm.; células 0,7-1,5 vez mais longas que largas, 5,0-10,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a granuloso; septos inconspícuos e não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostras: 1CP, 2CP.

Comentários: Os espécimes observados apresentaram características morfológicas e métricas que estão de acordo com a descrição original da espécie (GOMONT, 1892), exceto pelas medidas de diâmetro do tricoma, que ampliaram o intervalo referido pelo autor (4,0-6,0 µm). Valores maiores para o diâmetro do tricoma também foram observados em populações brasileiras estudadas por Sant'Anna & Azevedo (1995), Branco et al. (1999) e Martins et al. (2012).

Phormidium aerugineo-caeruleum é considerada cosmopolita, tendo sido relatada em vários locais do globo e com ampla variação morfológica (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). É comumente encontrada no perifíton de corpos d'água lênticos e lóticos (MCGREGOR, 2007).

No Brasil, esta espécie já foi relatada nos trabalhos de Werner & Rosa (1992), Sant'Anna & Azevedo (1995), Branco et al. (1999), Branco e Pereira (2002), Branco et al. (2008) e Martins et al. (2012).

Phormidium cf. *ambiguum* Gomont ex Gomont, Ann. Sci. nat. Sér. 7, v. 16, p. 178. 1892.

(Figura 3)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 7,2-8,8 µm diâm.; bainha mucilagínosa facultativa, fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constrictos a levemente constrictos, 6,4-8,0 µm diâm.; células 0,2-0,4 vez mais longas que largas, 1,2-3,2 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a finamente granuloso; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada, às vezes com espessamento.

Amostras: 3CP, 4CP, 5CP.

Comentários: Embora a população apresente características morfológicas semelhantes às descritas para *Phormidium ambiguum*, sua identificação como *P. cf. ambiguum* deve-se ao fato dos tricomas serem maiores que as referidas para a espécie (4,0-6,0 µm diâm.) por Gomont (1892).

Phormidium animale (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, Algolog. Stud., v. 50-53, p. 404. 1988.

(Figuras 4-5)

Tricomas emaranhados, retos ou flexuosos, atenuados e curvos no ápice, não constrictos a levemente constrictos, 4,0-6,0 µm diâm.; células 0,5-1,0 vez mais longas que largas, 2,5-6,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a finamente granuloso; septos granulosos; célula apical cônico-arredondada, 2,5-5,0 µm diâm., 3,5-6,5 µm compr.

Amostra: 6CP

Comentários: A população estudada mostrou-se diversa em relação à morfologia do ápice do tricoma, que variou de quase retos, com células apicais cilíndrico-arredondadas ou levemente cônicas a curvos com células apicais cônico-arredondadas. *Phormidium terebriforme* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek e *P. animale*, ambas pertencentes ao grupo II designado por Komárek & Anagnostidis (2005), possuem muitas características morfológicas em comum

e suas dimensões celulares se sobrepõem. A população estudada apresentou características que estão de acordo com as duas espécies. No entanto, *P. animale*, assim como a população estudada, ocorrem em solos úmidos, diferentemente de *P. terebriforme* que é conhecida por ocorrer em ambientes aquáticos.

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek também apresenta características métrica e morfológicamente semelhante a *P. animale*. Entretanto, estas espécies podem ser diferenciadas pela forma de atenuação do tricoma: *P. formosum* apresenta tricoma atenuado apenas na porção mais apical, enquanto *P. animale* apresenta atenuação gradual ao longo do tricoma, característica observada na população estudada.

O registro desta espécie, no presente estudo, trata-se do primeiro relato de sua ocorrência para o Brasil.

Phormidium crouanii Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot.; Sér 7, v.16, p. 175. 1992.

(Figuras 6-7)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 7,2-8,8 µm diâm.; bainha mucilagínosa facultativa, fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constritos a levemente constritos, 6,4-7,6 µm diâm.; células 0,6-1,2 vez mais longas que largas, 4,0-9,6 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado ou verde-acastanhado, homogêneo a finamente granuloso; septos não granulosos; célula apical cônico-arredondada, com espessamento.

Amostra: 7CP

Comentários: *Phormidium crouanii* foi originalmente descrita ocorrendo em solo argiloso (GOMONT, 1892), e, segundo Komárek & Anagnostidis (2005), esta espécie possui ampla distribuição, tendo sido registrada em regiões tropicais e temperadas.

As características morfológicas dos espécimes estudados estão de acordo com as referidas para a espécie por Gomont (1892). Apesar das medidas celulares ampliarem um pouco o intervalo descrito originalmente (7,5-10,5 µm diâm.), estão de acordo com o citado por Komárek & Anagnostidis (2005).

Os espécimes estudados foram encontrados formando manchas verde-escuras em solo arenoso úmido. Essa espécie foi observada, no Brasil, ocorrendo em solos úmidos por Sant'Anna & Azevedo (1995), Azevedo et al. (1996), e em riachos por Branco & Necchi (1998) e Branco & Pereira (2002).

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 405. 1988.

(Figura 8)

Tricomas entre outras cianobactérias formando massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, atenuados e curvos no ápice, não constrictos a levemente constrictos, 5,5-7,0 µm diâm.; células 0,5-1,0 vez mais longas que largas, 2,0-6,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granuloso ou finamente granuloso; célula apical cônico-arredondada.

Amostras: 8CP, 9CP.

Comentários: *Phormidium formosum* é uma espécie que exibe ampla distribuição, sendo considerada cosmopolita. É conhecida por ser, principalmente, bentônica, sendo relatada em ambientes lênticos e lóticos. Trata-se de uma espécie potencialmente produtora de homoanatoxina-a (LILLEHEIL et al., 1997; BAKER et al., 2001).

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), esta espécie pode ser confundida com *Phormidium breve* (Kützinger ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, pois ambas apresentam tricomas com ápice atenuado e curvo e diâmetros com valores que se sobrepõem. Ambas

apresentam ampla distribuição, no entanto, *P. breve* apresenta células mais curtas (1,5-3,0 µm) que as observadas no presente estudo.

Desta forma, os espécimes analisados estão de acordo com as características referidas para *P. formosum* por Gomont (1892).

No Brasil, a ocorrência da espécie foi documentada por Sant'Anna & Azevedo (1995), para o estado de São Paulo, e por Martins et al. (2012), para o Rio Grande do Sul.

Phormidium cf. *formosum* (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, Algolog. Stud., v. 50-53, p. 405. 1988.

(Figuras 9-10)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, atenuados e curvos no ápice, não constrictos a levemente constrictos, 4,0-6,4 µm diâm.; células 0,4-1,0 vez mais longas que largas, 2,4-5,2 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos granuloso ou não granuloso; célula apical cônica, 2,8-4,8 µm diâm., 3,2-5,6 µm compr.

Amostras: 10CP, 11CP, 12CP, 13CP.

Comentários: Os espécimes analisados no presente estudo foram identificados como *Phormidium* cf. *formosum*, pois foram encontrados em solo úmido ou em troncos de árvores, ambientes diferentes dos relatados para a espécie (bentos de águas continentais). A identificação destas populações foi feita com base apenas nas características morfológicas e métricas, que estão de acordo com as referidas para a espécie por Gomont (1892).

Phormidium inundatum Kützinger ex Gomont, Ann. Sci. nat. Sér. 7, v. 16, p. 172. 1892.

(Figuras 11-13)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 4,0-6,0 µm diâm.; bainha mucilagínosa facultativa, fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, constrictos,

3,2-6,0 μm diâm.; células 0,5-1,8 vez mais longas que largas, 2,8-8,0 μm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granulosos; célula apical cônico-arredondada a fortemente cônica, 3,2-5,2 μm diâm., 4,0-6,8 μm compr.

Amostras: 14CP, 15CP, 16CP, 17CP, 18CP, 19CP, 20CP, 21CP, 22CP, 23CP, 24CP, 25CP, 26CP, 27CP, 28CP, 29CP, 30CP.

Comentários: *Phormidium inundatum* é conhecida por ser, principalmente, aquática de águas doces lânticas ou lólicas, oligotróficas a mesotróficas, mas também pode ser encontrada em ambientes aerofíticos como rochas, solos e paredes úmidas (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005).

Phormidium inundatum é morfologicamente semelhante a *P. lusitanicum* (Sampaio) Anagnostidis e *P. papyraceum* Gomont ex Gomont. Estas três espécies apresentam tricomas com aproximadamente o mesmo diâmetro (3,8-5,0 μm , 3,0-5,0 μm e 3,0-5,0 μm , respectivamente), mesmo comprimento celular (2,5-8,0 μm , 3,3-8,0 μm e 2,0-4,0 μm , respectivamente) e células apicais cônicas. Essas espécies podem ser diferenciadas pelo tipo de habitat que ocupam e pela distribuição geográfica. As populações estudadas e identificadas como *P. inundatum* foram encontradas em pequenos córregos oligotróficos, troncos de árvores e solos úmidos. Embora tenham sido observadas em ambientes variados, as características morfológicas e métricas das populações apresentaram-se similares e consistentes com as descritas para a espécie por Komárek & Anagnostidis (2005).

Phormidium papyraceum Gomont ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot., Sér 7, v. 16, p. 173. 1892.

(Figuras 14-15)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, não atenuados, não constrictos, 5,0-6,5 μm diâm.; células 0,5-0,8 vez mais longas que largas, 3,5-5,0 μm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granulosos ou raramente finamente

granulosos; célula apical cônico-arredondada a fortemente cônica, 5,0-6,0 µm diâm., 3,5-6,0 µm compr.

Amostra: 31CP.

Comentários: Os espécimes estudados mostraram-se similares às populações identificadas como *Phormidium inundatum*, quanto ao diâmetro celular e morfologia do ápice do tricoma, no entanto, foram diferenciados deste por apresentarem células mais curtas que largas.

Da mesma forma que *Phormidium inundatum*, a população identificada como *Phormidium papyraceum* é morfologicamente semelhante à *P. lusitanicum*. Dentre estas três espécies, apenas *P. papyraceum* desenvolve células mais curtas e com dimensões similares às observadas neste estudo (2,0-4,0 µm compr.).

Phormidium retzii (Agardh) Gomont ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot., Sér 7, v. 16, p. 175. 1892.

(Figuras 16-18)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 6,8-13,6 µm diâm.; bainha mucilagínosa facultativa, fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constrictos a levemente constrictos, 6,4-12,8 µm diâm.; células 0,5-1,6 vez mais longas que largas, 4,0-14,4 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a granuloso; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada ou truncada.

Amostras: 32CP, 33CP, 34CP, 35CP, 36CP.

Comentários: Além das amostras coletadas em diferentes locais do estado de São Paulo, estudos morfológicos foram feitos em uma amostra cedida pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP. Os espécimes observados estão de acordo com a descrição morfológica original da espécie (GOMONT, 1892). No entanto, o diâmetro dos tricomas mostrou-se superior ao descrito para a espécie por Komárek & Anagnostidis (2005). Apesar desta distinção quanto ao diâmetro do tricoma, as populações estudadas foram identificadas

como *Phormidium retzii* por apresentarem tricomas com células apicais truncadas, característica da espécie. Em grande parte dos tricomas observados, o conteúdo celular mostrou-se homogêneo, no entanto, alguns organismos provenientes da amostra cedida pelo CENA/USP apresentaram células com “vacúolos” que variaram em número, forma e tamanho. Isso, provavelmente, deve-se ao fato dos organismos terem sido mantidos em cultivo por um período prolongado.

Phormidium retzii é considerada uma espécie cosmopolita e com uma ampla variação morfológica. Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), é considerada uma espécie comum em vários locais do globo, no entanto, muitos relatos de sua ocorrência devem-se a identificações errôneas. É considerada uma espécie bentônica, podendo ocorrer em corpos d’água lênticos ou lóticos.

Segundo McGregor (2007), esta espécie é a mais comum em ambientes lóticos no nordeste da Austrália. Na América do Norte, sua ocorrência já foi registrada em mais de 100 ambientes lóticos (SHEATH & COLE, 1992). No Brasil, o estado de São Paulo é o que abriga grande maioria dos registros da espécie. Segundo Branco et al. (1999), *Phormidium retzii* é a espécie mais amplamente distribuída em São Paulo.

Geitler (1932) comenta que a ampla variação morfológica atribuída a espécie indica que esta se trata de uma espécie coletiva e, segundo CASAMATTA et al., (2003) a gama de habitats na qual a espécie já foi relatada e o grau de variabilidade do gene RNAr 16S de populações da América do Norte refletem a coletividade da espécie. Gomont (1892) salienta que a grande variação no diâmetro e comprimento celulares é característico de espécies com ampla distribuição geográfica.

A ocorrência de *Phormidium retzii* no Brasil foi registrada por Sant’Anna & Azevedo (1995), Necchi et al. (1997), Branco & Necchi (1998) e Branco et al. (1999, 2008).

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

(Figuras 19-20)

Tricomas solitários, retos ou flexuosos, atenuados e curvos no ápice, constrictos, 4,0-6,4 µm diâm.; células 0,7-1,8 vez mais longas que largas, 3,2-8,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos granuloso; célula apical cônico-arredondada, 3,2-4,4 µm diâm., 4,8-6,4 µm compr.

Amostra: 37CP.

Comentários: A população estudada apresentou variação morfológica em relação ao ápice do tricoma, que variaram de quase retos, com células apicais cilíndrico-arredondadas a curvos com células apicais cônico-arredondadas. Os espécimes analisados são morfológicamente semelhantes a *Phormidium animale* e *P. okenii* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek. Essas espécies podem ser diferenciadas pelo ambiente onde ocorrem, sendo *P. animale* terrestre, enquanto *P. okenii* e *P. terebriforme* são aquáticos, e pelas dimensões dos tricomas, levemente menores em *P. okenii*.

Phormidium tergestinum (Kützinger) Anagnostidis et Komárek, *Algolog. Stud.*, v. 50-53, p. 406. 1988.

(Figuras 21-22)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, não atenuados, levemente constrictos 6,4-8,0 µm diâm.; células 0,4-1,0 vez mais longas que largas, 3,2-6,4 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos granuloso; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 38CP.

Comentários: *Phormidium tergestinum* é considerada uma espécie perifítica e de ampla distribuição, exibindo grande variação morfológica. Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), o grande número de morfotipos indica que se trata de uma espécie coletiva e que precisa ser revisada.

Os espécimes observados apresentaram características morfométricas de acordo com as descritas para a espécie por Komárek & Anagnostidis (2005).

Phormidium aerugineo-caeruleum e *P. tergestinum* possuem características morfológicas e métricas que se sobrepõem, dificultando a separação das duas espécies. Ambas são consideradas cosmopolitas e ocorrem em ambientes semelhantes: bentônicas em corpos d'água lênticos e lóticos, às vezes em águas com diferentes graus de eutrofização.

Os espécimes estudados foram identificados como *Phormidium tergestinum* baseado no comprimento celular, na ausência de bainha mucilaginosa e na presença de grânulos nos septos, enquanto os espécimes identificados como *P. aerugineo-caeruleum* apresentaram ampla variação no comprimento celular, bainha mucilaginosa e septos não granulosos, características também observadas em outros estudos (SANT'ANNA & AZEVEDO, 1995; BRANCO et. al. 1999; MCGREGOR, 2007; MARTINS et al., 2012).

No Brasil, esta espécie foi observada por Branco et al. (1999), Ferragut et al. (2005), Santos & Sant'Anna (2010) e Martins et al. (2012).

Phormidium cf. *uncinatum* (Agardh) Gomont ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot., Sér 7, v. 16, p. 184. 1892.

(Figura 23)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, atenuados e curvos no ápice, não constrictos, 5,0-6,0 µm diâm.; células 0,3-0,7 vez mais longas que largas, 1,5-4,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a finamente granuloso; septos não granulosos ou

finamente granuloso; célula apical cônico-arredondada, levemente captada, com caliptra arredondada.

Amostra: 39CP.

Comentários: Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *Phormidium uncinatum* pertence ao grupo VIII de *Phormidium*, que consiste nas espécies que desenvolvem tricomas cilíndricos com ápices atenuados, células distintamente mais curtas que largas e células apicais com caliptra ou espessamento.

A população estudada apresentou características métricas semelhantes às apresentadas por *P. ambiguum*, no entanto, esta espécie não desenvolve caliptra, estrutura observada na população analisada. Da mesma forma, os espécimes estudados, que foram coletados em corpo d'água lótico, apresentaram características morfológicas similares às referidas para *P. uncinatum* por Gomont (1982), apresentando tricomas não constritos, atenuados e curvos no ápice e célula apical com caliptra. No entanto, as dimensões celulares observadas mostraram-se inferiores às descritas para *P. uncinatum* (6,0-9,0 µm diâm. e 2,0-6,0 µm compr.), motivo pelo qual a população foi identificada como *P.cf. uncinatum*.

Phormidium cf. vulgare (Kützing ex Gomont) Anagnostidis, *Preslia*, v. 73, p. 81. 2001.

(Figuras 24-25)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, atenuados e curvos no ápice, não constritos, 6,0-7,0 µm diâm.; células 0,6-1,0 vez mais longas que largas, 4,0-6,5 µm compr.; conteúdo celular castanho, homogêneo; septos granuloso; célula apical 3,5-4,5 µm diâm., 4,5-7,0 µm compr., cônico-arredondada, com caliptra cônica.

Amostra: 40CP.

Comentários: A população identificada como *P. cf. vulgare* apresentou tricomas atenuados e curvos no ápice e célula apical com caliptra, característica de *P. vulgare*. No entanto, a

população apresentou tricomas com diâmetros superiores aos referidos para a espécie por Komárek & Anagnostidis (2005).

Phormidium sp.1

(Figura 26)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 7,0-8,0 µm diâm.; bainha mucilaginosa firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constritos a levemente constritos, 6,5-7,5 µm diâm.; células 0,6-1,0 vez mais longas que largas, 4,0-7,5 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada a levemente cônico-arredondada.

Amostra: 41CP.

Comentários: A população estudada é semelhante à *Phormidium puteale* quanto à morfologia do ápice do tricoma (não atenuados e células cilíndrico-arredondadas a levemente cônicas), no entanto, diferiram quanto ao diâmetro e à constrição do mesmo, menor e inconspícuo na população analisada.

Phormidium sp.2

(Figuras 27-28)

Massas microscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 7,2-9,6 µm diâm.; bainha mucilaginosa fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constritos a levemente constritos, 6,4-8,0 µm diâm.; células 0,5-1,2 vez mais longas que largas, 3,2-10,4 µm compr.; conteúdo celular castanho-avermelhado, homogêneo a finamente granuloso; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada, com espessamento.

Amostra: 42CP.

Comentários: Os espécimes observados apresentam características morfológicas semelhantes às de *Phormidium gracile* (Meneghini ex Gomont) Anagnostidis. Ambos têm coloração avermelhada, tricomas levemente constritos, células apicais com espessamento e dimensões celulares que se sobrepõem, no entanto, *P. gracile* é uma espécie que ocorre em ambiente marinhos enquanto a população estudada foi encontrada em tronco de árvore.

Phormidium sp.3

(Figuras 29-30)

Massas microscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 6,0-8,8 µm diâm.; bainha mucilagínosa fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, distintamente constritos, 6,0-8,0 µm diâm.; células 0,5-1,3 vez mais longas que largas, 3,2-9,6 µm compr.; conteúdo celular castanho-avermelhado, granuloso ou raramente homogêneo; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada, com espessamento.

Amostra: 43CP.

Comentários: A população estudada e nomeada como *Phormidium* sp.3 é semelhante à população identificada como *Phormidium* sp.2. Ambas apresentam dimensões celulares similares, bem como a coloração do conteúdo celular, espessamento de parede na célula apical e foram encontradas no mesmo tipo de ambientes (troncos de árvores). No entanto, estas duas populações foram consideradas diferentes, pois *Phormidium* sp.3 apresentou tricomas com constrições bem evidentes, com células, às vezes em forma de barril e conteúdo celular com grânulos grandes, enquanto *Phormidium* sp.2 apresentou tricomas não constritos a levemente constritos e conteúdo celular sem grânulos conspícuos.

Phormidium sp.4

(Figuras 31-32)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 5,5-8,0 µm diâm.; bainha mucilaginosa firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, levemente constrictos, 4,8-7,2 µm diâm.; células 0,5-1,2 vez mais longas que largas, 3,2-7,2 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granulosos ou raramente finamente granulosos; célula apical levemente cônico-arredondada, com espessamento.

Amostras: 44CP, 45CP, 46CP.

Comentários: A característica morfológica marcante nas populações estudadas é o desenvolvimento de uma célula apical cilíndrico-arredondada com espessamento na parede externa, conferindo um formato levemente cônico à célula e coloração levemente amarelada, distintas das demais células do tricoma.

Dentre as espécies de *Phormidium* que desenvolvem células levemente cônicas e com espessamento estão *P. incrustatum* Gomont ex Gomont e *P. crouanii*. No entanto, os espécimes analisados diferiram destes no ambiente de ocorrência e/ou nas dimensões celulares. Além dessas espécies, *P. corium* Gomont também pode vir a desenvolver células apicais levemente cônicas devido ao desenvolvimento de espessamento na parede externa. Esta espécie foi originalmente descrita ocorrendo em ambientes bastante distintos: aquáticos e subaéreos por Gomont (1892). Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *P. corium* possui ampla distribuição, podendo ser cosmopolita, já tendo sido observada em várias regiões do globo e em grande variedade de ambientes: perifítico, sobre rochas, epifíticos, em corpos d'água lênticos e lóticos, solos úmidos, paredes e plantas decíduas. As populações estudadas apresentaram tricomas menores que os referidas para *P. corium* por Gomont (1892).

Phormidium sp.5

(Figuras 33-34)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 13,2-16,8 µm diâm.; bainha mucilagínosa facultativa, fina, firme, homogênea, incolor; tricomas não atenuados, não constritos, 9,6-16,8 µm diâm.; células 0,4-1 vez mais longas que largas, 4,0-12,8 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; septos não granulosos ou levemente granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 47CP.

Comentários: A população estudada, coletada em um riacho da região noroeste do estado de São Paulo, não apresenta características semelhantes às das espécies descritas de *Phormidium*.

Uma das poucas espécies que apresentam característica morfológicas próximas de *Phormidium* sp.5 é *P. puteale*, por apresentar tricomas com diâmetros maiores que 11 µm. Embora esta espécie seja conhecida por ocorrer em ambiente semelhante ao das populações estudadas (bentos de riachos), ela apresenta tricomas constritos e levemente menores que os observados neste estudo.

Além de *P. puteale*, *P. durum* Gardner desenvolve tricomas com diâmetros similares aos observados (12,0-14,0 µm), entretanto esta espécie foi descrita por Gardner (1927) com base em uma população aerofítica.

Phormidium sp.6

(Figuras 35-36)

Massas macroscópicas; tricomas emaranhados ou formando feixes, flexuosos, brevemente atenuados no ápice, não constritos, 5,6-8,5 µm diâm.; células 0,5-1,1 vez mais longas que largas, 3,2-7,2 µm compr.; conteúdo celular verde-oliva, castanho ou púrpura,

homogêneo a finamente granuloso; septos granuloso; célula apical capitada, 3,6-7,2 µm diâm., 3,2-6,4 µm compr., com espessamento.

Amostra: 48CP.

Comentários: O desenvolvimento de tricomas brevemente atenuados no ápice e células apicais capitadas indica a que a população pertence ao Grupo VI de *Phormidium*, descrito por Komárek & Anagnostidis (2005). Segundo estes autores, este grupo é composto por poucas espécies, todas aquáticas, diferentemente da população estudada, que foi coletada em ambiente aerofítico (tronco de árvore).

Os espécimes observados não apresentaram características similares às espécies descritas para *Phormidium*.

Phormidium sp.7

(Figura 37)

Massas microscópicas; tricomas emaranhados, flexuosos, levemente atenuados e curvos no ápice, não constrictos, 8,0-10,0 µm diâm.; células 0,4-0,7 vez mais longas que largas, 3,5-5,5 µm compr.; conteúdo celular verde-oliva a castanho, homogêneo a finamente granuloso; septos não granuloso ou finamente granuloso; célula apical cônico-arredondada a levemente captada, com caliptra arredondada.

Amostras: 49CP, 50CP.

Comentários: Os espécimes analisados apresentaram características morfológicas similares às espécies do Grupo VIII do gênero *Phormidium*, descrito por Komárek & Anagnostidis (2005), com tricomas atenuados e células distintamente mais curtas que largas. As características morfológicas os aproximam de *P. uncinatum* e *P. irriguum* (Kützing ex Gomont) Anagnostidis

et Komárek, que desenvolvem tricomas atenuados e curvos no ápice e dimensões que se sobrepõem (5,5-9,0 µm diâm. e 6,0-11,2 µm diâm., respectivamente).

No entanto, os espécimes analisados diferiram de *Phormidium uncinatum* pela ausência de bainha mucilaginosa e movimento reduzido e de *P. irriguum* por apresentar caliptra.

Phormidium sp.8

(Figura 38)

Massas macroscópicas; tricomas não atenuados, levemente constrictos, 8,0-9,0 µm diâm.; células 0,4-0,7 vez mais longas que largas, 2,0-5,6 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a finamente granuloso; septos granuloso; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 51CP.

Comentários: Os espécimes observados apresentaram características morfológicas que os aproximam das espécies do Grupo VIII de Komárek & Anagnostidis (2005), por apresentarem células distintamente mais curtas que largas.

Os espécimes estudados são compatíveis com *Phormidium ambiguum*, principalmente em relação à morfologia do ápice do tricoma, que não é atenuado e às células apicais cilíndrico-arredondadas, sem espessamento ou caliptra. No entanto, *P. ambiguum*, segundo Gomont (1892), desenvolve tricomas com células menores (4,5-7,5 µm de diâm. e 1,5-3,4 µm compr.).

A população também se assemelha a *Phormidium tergestinum*, no entanto, *P. tergestinum* é uma espécie aquática enquanto os espécimes analisados foram encontrados em tronco de árvore.

Phormidium sp.9

(Figura 39)

Massas macroscópicas; tricomas levemente atenuados, não constrictos, 6,4-8,0 µm diâm.; células 0,3-0,7 vez mais longas que largas, 2,4-5,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a granuloso; septos não granulosos a granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 52CP.

Comentários: Os espécimes estudados não apresentaram semelhanças morfológicas com as espécies descritas de *Phormidium*. A principal característica que os distingue das demais espécies é o desenvolvimento de tricomas levemente atenuados e curvos no ápice e células apicais cilíndrico-arredondadas.

Planktothricoides raciborskii (Woloszynska) Suda et Watanabe, Int. J. Syst. Evol. Micr., v. 52, p. 1593. 2002.

(Figuras 40-41)

Tricomas solitários ou emaranhados entre outras cianobactérias filamentosas, retos ou flexuosos, não atenuados a levemente atenuados e curvos no ápice, não constrictos, 7,0-11,0 µm diâm.; células 0,7-1,0 vez mais longas que largas, 5,0-12,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado homogêneo a esparsamente granuloso; aerótopos diminutos na periferia das células; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 53CP.

Comentários: Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *Planktothricoides*, gênero amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do globo, é composto por duas espécies (*P. raciborskii* e *P. attenuata* Komárek et Komárková-Legnórevá) que podem ser diferenciadas pelo diâmetro do tricoma e forma da atenuação do mesmo. Segundo estes autores,

P. attenuata apresenta tricomas com diâmetros menores (6,0-6,8 µm) e atenuação gradual em direção ao ápice e *P. raciborskii* apresenta tricomas maiores (8,0-12,2 µm) e atenuados apenas na porção final. Os espécimes observados apresentaram características morfológicas e métricas que estão de acordo com as descritas para a *P. raciborskii* por Suda et al. (2002).

Planktothrix isothrix (Skuja) Komárek et Komárková, Czech Phycol., v. 4, p. 14. 2004.

(Figuras 42)

Tricomas solitários, retos ou flexuosos, não atenuados, não constrictos, 4,5-10,4 µm diâm.; células 0,4-1,0 vez mais longas que largas, 2,4-6,0 µm compr.; conteúdo celular verde-acastanhado, às vezes, com grânulos nos septos; numerosos aerótopos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 54CP.

Comentários: Os caracteres morfológicos e métricos dos espécimes estudados estão de acordo com os descritos por Komárek & Komárková (2004).

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *P. isothrix* é uma espécie primeiramente bentônica, podendo também fazer parte do plâncton. Ocorre em lagos eutróficos a hipereutróficos, formando florações tanto em regiões tropicais como temperadas (DAVIS et al., 2003; STEFANIAK et al., 2005; HALSTVEDT et al., 2007; PÉREZ et al., 2009, SILVA, 2009).

A ocorrência de *Planktothrix isothrix* no Brasil foi registrada por Tucci et al. (2006), Sant'Anna et al. (2007), Silva (2009), Santos & Sant'Anna (2010), Martins et al. (2012) e Ribeiro et al. (2012).

Porphyrosiphon notarisii Kützinger ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot. Sér. 7, v. 15, p. 331. 1892.

(Figuras 43-45)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 19,0-31,2 (36,0) μm diâm.; bainha mucilagínosa espessa, firme, lamelada, avermelhada; tricomas não atenuados, constritos, 11,2-18,0 μm diâm.; células 0,3-0,9 vez mais longas que largas, 4,0-13,6 (16,2) μm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a granuloso; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostras: 55CP, 56CP, 57CP, 58CP.

Comentários: Os espécimes observados estão de acordo com a descrição de Gomont (1892), inclusive quanto ao tipo de habitat. No entanto, Komárek & Anagnostidis (2005) comentam que esta espécie é tipicamente aerofítica, ocorrendo em rochas úmidas de regiões montanhosas e que está em habitats semelhantes em várias regiões do globo. Diferentemente, a população analisada no presente estudo foi encontrada ocorrendo em solo secos, assim como Couté et al. (1999).

As populações observadas por Senna & Ferreira (1986), Sant'Anna et al. (1995), Branco et al. (2009), e Lemes-da-Silva et al. (2012), apresentaram tricomas menores que os observados nas populações estudadas, porém dentro do intervalo métrico referido para a espécie.

Porphyrosiphon sp.1

(Figuras 46-48)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 19,0-27,0 μm diâm.; bainha mucilagínosa espessa, firme, lamelada, incolor; tricomas não atenuados, constritos, 12,0-19,0 μm diâm.; células 0,3-0,7 vez mais longas que largas, 4,0-13,0 μm compr.; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo a finamente granuloso; septos não granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada a levemente cônico-arredondada, levemente alongada (12,0-19,0 μm).

Amostra: 59CP.

Comentários: Os espécimes observados assemelham-se metricamente às populações identificadas como *Porphyrosiphon notarisii* e estão de acordo com as características enumeradas por Gomont (1982) e Komárek & Anagnostidis (2005) para a espécie. No entanto, foram identificadas como *Porphyrosiphon* sp.1 por apresentarem bainhas mucilaginosas incolores e menos espessas que as observadas nas populações de *Porphyrosiphon notarisii*.

Porphyrosiphon sp.2

(Figuras 49-50)

Massas macroscópicas; filamentos emaranhados, flexuosos, 11,0-19,0 µm diâm.; bainha mucilaginosa firme, lamelada, avermelhada; tricomas não atenuados, constritos, 8,0-12,5 µm diâm.; células 0,5-1,0 vez mais longas que largas, 5,5-12,0 µm compr.; conteúdo celular verde-azulado, granuloso; septos não granulosos ou granulosos; célula apical cilíndrico-arredondada.

Amostra: 60CP.

Comentários: A população observada apresentou características morfológicas e métricas semelhantes às citadas por Gomont (1982) para *Porphyrosiphon notarisii*, que pode apresentar ampla variação métrica, abrangendo tanto espécies com filamentos espessos quanto filamentos mais delgados. Embora a população estudada apresente morfologia correspondente a *P. notarisii*, ela difere das populações de *P. notarisii* analisadas neste estudo por desenvolverem tricomas levemente menores e bainha mucilaginosa mais fina. Da mesma forma, esta população mostrou-se diferente morfológicamente da população identificada por *Porphyrosiphon* sp., que apresentou bainha mucilaginosa incolor e células com relação entre comprimento e largura inferiores.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como organismos fotossintetizantes, as cianobactérias são contribuintes importantes para a produção primária em ecossistemas aquáticos e, em ambientes terrestres, podem desempenhar papel relevante em estágios iniciais do processo de sucessão primária no solo, principalmente em regiões de vegetação escassa. Uma vez que Phormidioideae encontra-se entre as cianobactérias mais frequentes em todos os tipos de ambientes, era esperado que se achasse uma riqueza maior desses organismos nos locais amostrados. Além disso, expedições de coletas foram feitas nos Parques Nacional da Serra da Canastra e de Itatiaia, situados em biomas brasileiros considerados “hotspots” para diversidade (Cerrado e Mata Atlântica, respectivamente), não revelaram representantes da subfamília.

A baixa representatividade da subfamília, verificada neste estudo pela ausência de representantes de seis dos 10 gêneros (Komárek & Anagnostidis, 2005), provavelmente seja consequência da distribuição restrita destes nos ambientes amostrados, já que não são frequentes os registros de ocorrência dos gêneros *Arthrospira*, *Trichodesmium*, *Tychonema*, *Symploca* e no Brasil, e os gêneros *Proterendothrix* e *Pseudophormidium* não foram encontrados até o momento no país.

Ao mesmo tempo, o número muito superior de espécies de *Phormidium* registrados (22) em relação aos gêneros *Porphyrosiphon* (três), *Planktothricoides* (uma) e *Planktothrix* (uma), já era esperado, uma vez que é conhecida a representatividade do gênero e a grande amplitude de ambientes nos quais é relatado na literatura (GOMONT, 1892; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005; MCGREGOR, 2007).

O estudo revelou nove possíveis novos táxons para a ciência. As espécies *Phormidium inundatum* e *P. retzii* merecem destaque por terem sido observadas em várias localidades amostradas (10 e sete, respectivamente). *Phormidium inundatum* mostrou distribuição ampla, tendo sido registrada em três estados brasileiros estudados (Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro

e São Paulo), enquanto *P. retzii* foi registrada apenas em São Paulo (noroeste paulista e Mata Atlântica). *Phormidium inundatum* foi a única espécie registrada em ambientes diferentes, tendo sido encontrada em córrego da região noroeste paulista, troncos de árvores em região de floresta ombrófila mista (região de Campos do Jordão, SP) e em solo de áreas urbanizadas dos estados do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro.

Phormidium é um gênero com muitos problemas taxonômicos, causados pela dificuldade de identificação dos organismos. Este fato deve-se ao grande número de espécies descritas e à simplicidade morfológica (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Um grande ponto conflitante nos estudos taxonômicos deste gênero é a consideração de alguns aspectos, tais como distribuição geográfica e hábito, para a delimitação de algumas espécies e a total desconsideração dos mesmos para outras. Por exemplo, segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *P. breve* e *P. corium* são espécies registradas em grande variedade de habitats, enquanto *P. tergestinum* e *P. aerugineo-caeruleum*, entre outras, são consideradas aquáticas e os registros destas em ambientes terrestres são citados como prováveis erros de identificação.

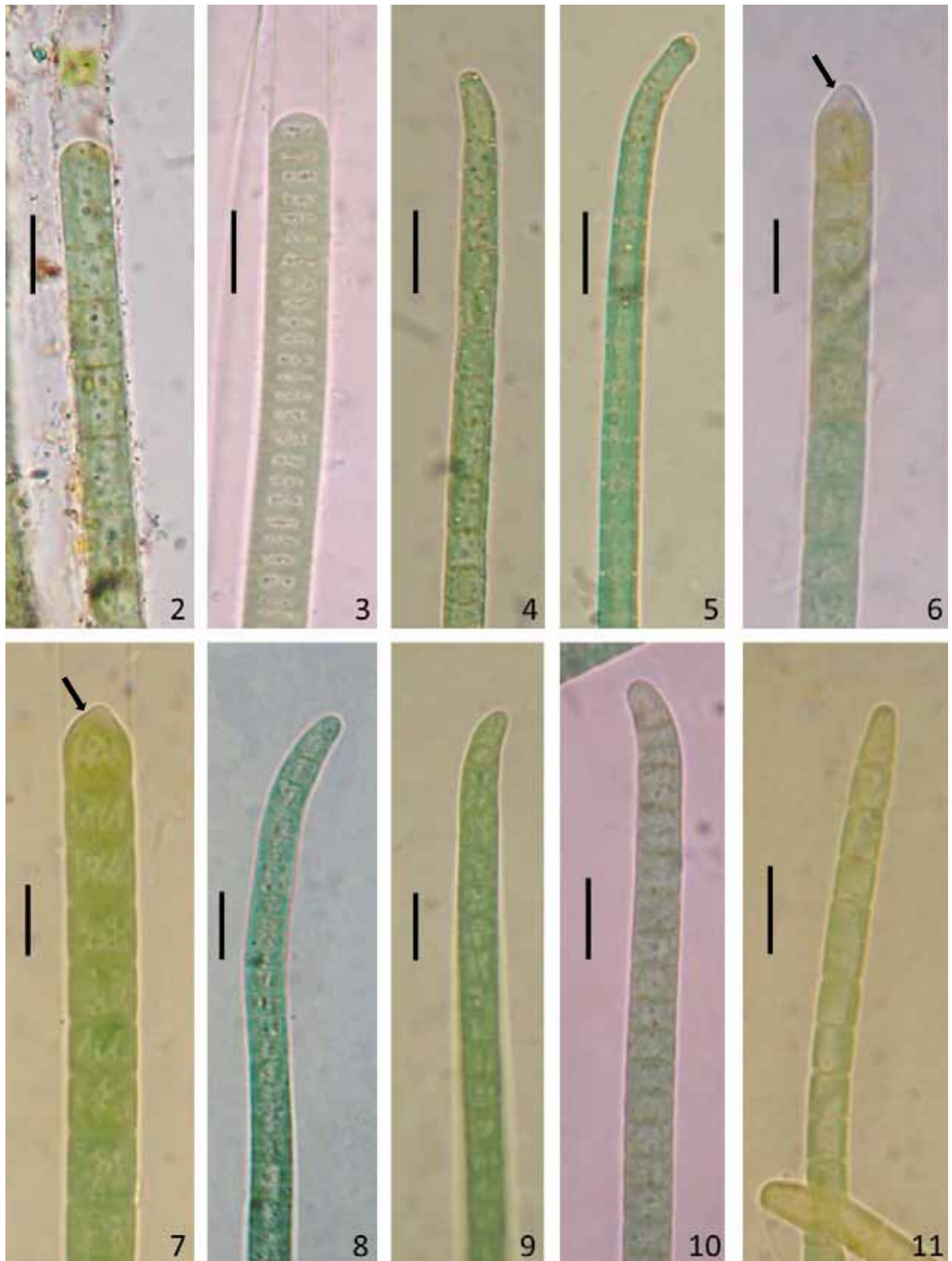
O mesmo ocorre com o habitat. Partindo do pressuposto de que grande parte das espécies de cianobactérias apresenta capacidade de adaptação aos mais variados tipos de ambientes, no presente estudo, três populações provenientes de ambientes terrestres (solo e troncos de árvores) foram identificadas como *P. cf. formosum* por apresentarem características morfológicas similares às referidas para a espécie.

O grande número de espécies não identificadas neste estudo reforça a ideia de que a flora de cianobactérias em regiões tropicais e subtropicais é diversa das regiões europeia e norte-americana e ainda desconhecida. A impossibilidade de identificação específica de nove espécies de *Phormidium* e de duas de *Porphyrosiphon* deveu-se, principalmente, à incompatibilidade entre ambientes de ocorrência, quando estes apresentaram características morfológicas similares. Ainda assim, algumas espécies, tais como *Phormidium* sp.1,

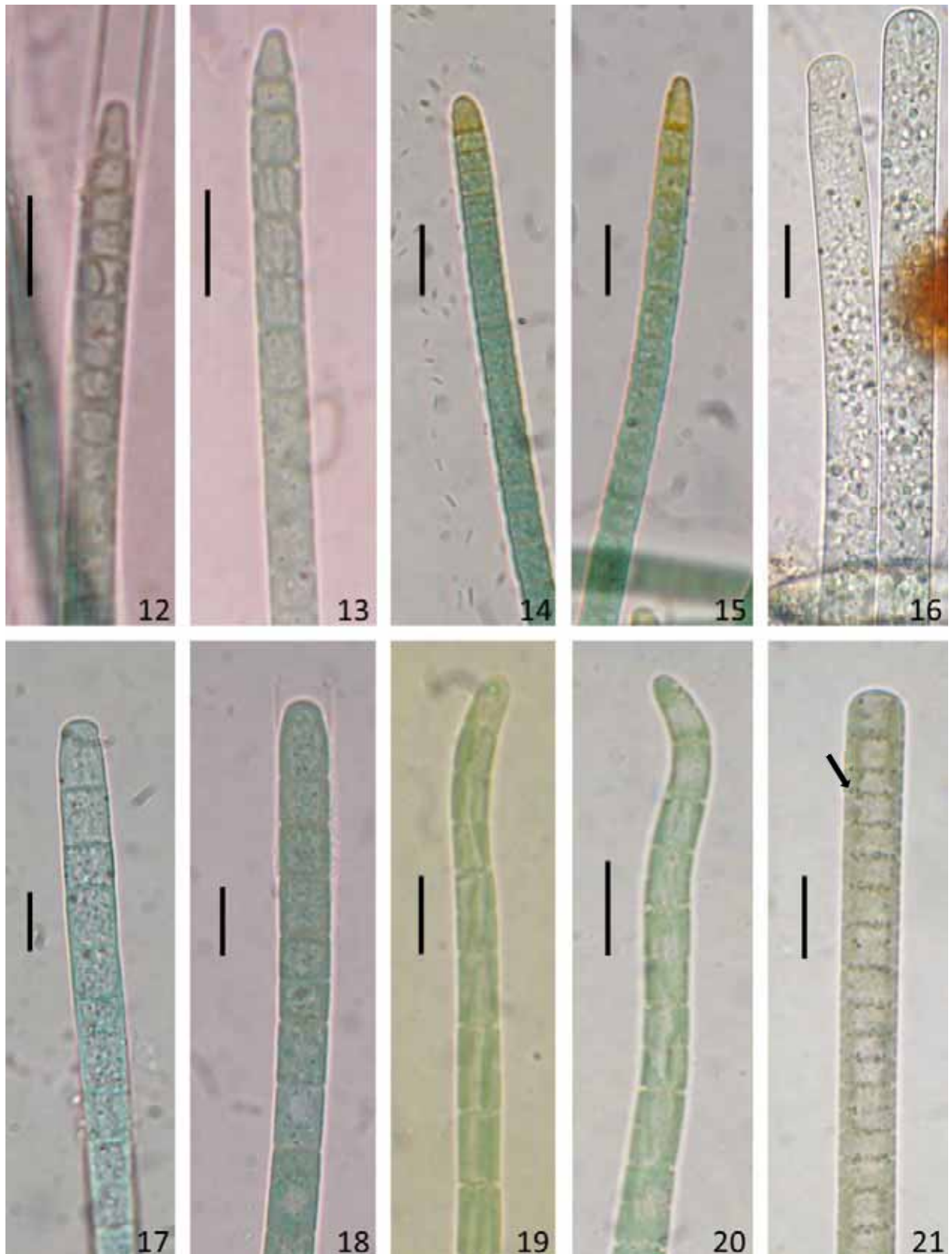
Phormidium sp.2, *Phormidium* sp.3, *Phormidium* sp.6 e *Porphyrosiphon* sp.1, não apresentaram semelhanças morfológicas com as espécies já descritas, tratando-se, provavelmente, de novas espécies.

De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), a diversidade de *Phormidium* é provavelmente grande e seu polifiletismo já foi constatado em diversos estudos (TENEVA et al., 2005; TATON et al., 2006; PALINSKA & MARQUARDT, 2008; TURICCHIA et al., 2009; STRUNECKY et al., 2010; SCIUTO et al., 2011). Assim, são esperadas modificações nas circunscrições das espécies com o uso de ferramentas moleculares.

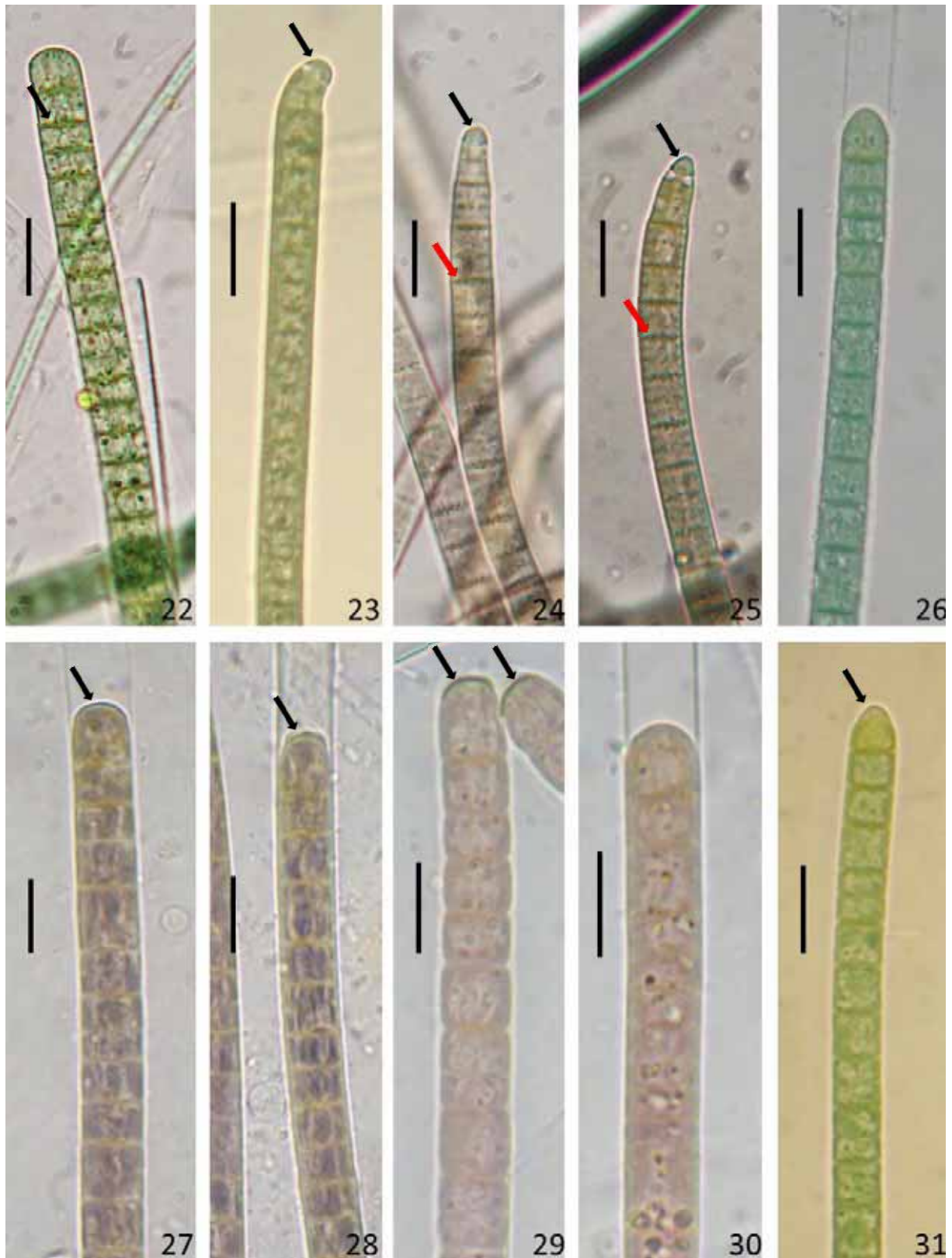
O número de espécies não identificadas neste estudo indica a necessidade de maiores estudos florísticos nessas regiões para reduzir a lacuna no conhecimento da distribuição desses organismos em território nacional.



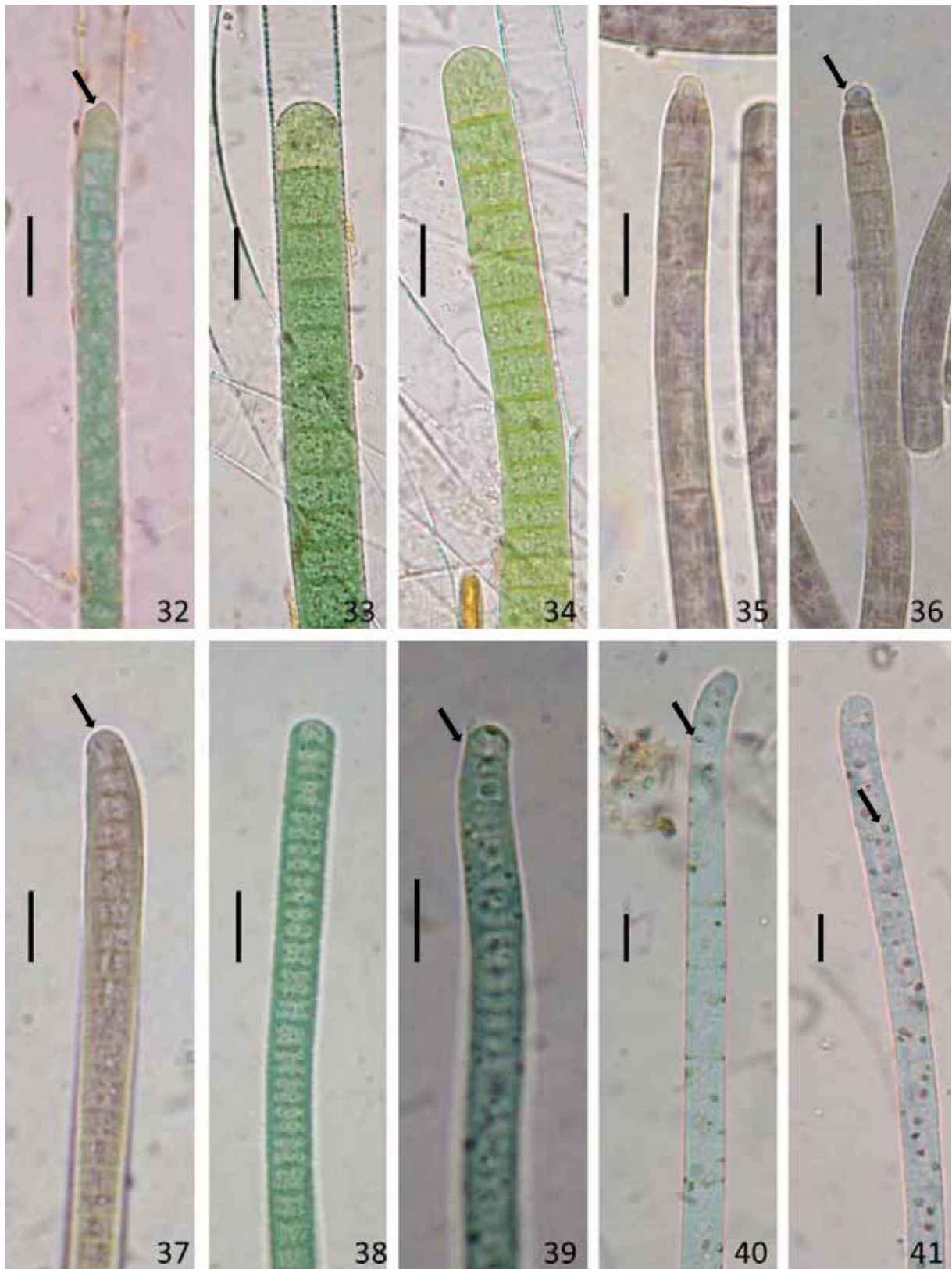
Figuras 2-11. 2. *Phormidium aerugineo-caeruleum*; 3. *P. cf. ambiguum*; 4-5. *P. animale*; 6-7. *P. crouanii* – espessamento de parede (seta); 8. *P. formosum*; 9-10. *P. cf. formosum*; 11. *P. inundatum*. (Escala: 10 μ m)



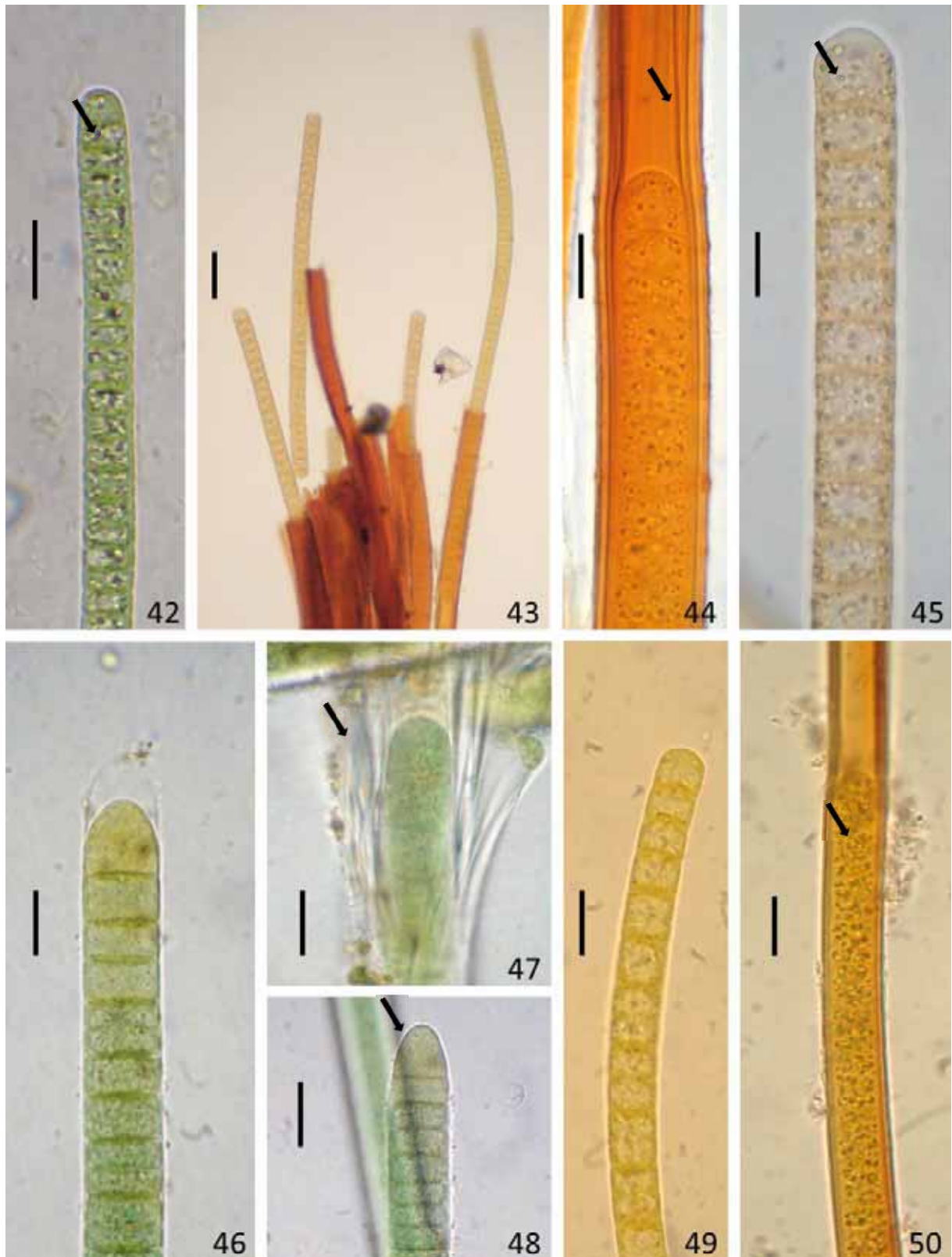
Figuras 12-21. 12-13. *Phormidium inundatum*; 14-15. *P. papyraceum*; 16-18. *P. retzii*; 19-20. *P. terebriforme*; 21. *P. tergestinum* – detalhe dos grânulos nos septos transversais (seta).
(Escala: 10 μ m)



Figuras 22-31. 22. *Phormidium tergestinum* – detalhe dos grânulos nos septos transversais (seta); 23. *P. cf. uncinatum* – célula apical com caliptra arredondada (seta); 24-25. *P. cf. vulgare* – célula apical com caliptra cônica (seta preta); detalhe dos grânulos nos septos transversais (seta vermelha); 26. *Phormidium* sp.1; 27-28. *Phormidium* sp.2 – espessamento de parede (seta); 29-30. *Phormidium* sp.3 – espessamento de parede (seta); 31. *Phormidium* sp.4 - espessamento de parede (seta). (Escala: 10 μ m)



Figuras 32-41. 32. *Phormidium* sp.4 – espessamento de parede (seta); 33-34. *Phormidium* sp.5; 35-36. *Phormidium* sp.6 – célula apical capitada (seta); 37 *Phormidium* sp.7 – célula apical com caliptra arredondada; 38. *Phormidium* sp.8; 39. *Phormidium* sp.9 – leve atenuação no ápice do tricoma (seta); 40-41. *Planktothricoides raciborskii* – grânulos esparsos no citoplasma (seta). (Escala: 10 µm)



Figuras 42-50. 42. *Planktothrix isothrix* – aerótopos (seta); 43-45. *Porphyrosiphon notarisii* – 44. detalhe das lamelas da bainha mucilaginosa (seta); 45. grânulos dispersos no citoplasma (seta); 46-48. *Porphyrosiphon* sp.1 – 47. detalhe das lamelas da bainha mucilaginosa incolor (seta); 48. célula apical cônico-arredondada (seta); 49-50. *Porphyrosiphon* sp.2 – 50. grânulos dispersos no citoplasma (seta).

(Escala: 42, 44-50 = 10 μ m; 43 = 20 μ m)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3 – Oscillatoriales. **Archives of Hydrobiology/Suppl.** v. 80, n. 1-4, **Algol. Studies**, Stuttgart, v. 50-53, p. 327-472, 1988.
- AQUINO, E.P.; LACERDA, S.R.; FREITAS, A.I.G. Cianobactérias das lagoas de tratamento de esgoto no semi-árido nordestino (Ceará, Brasil). **Revista de Botânica**, v. 39, p. 34-46, 2010.
- 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.; NOGUEIRA, N.M.C.; SANT'ANNA, C.L. Criptógamas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 8: Cyanophyceae. **Hoehnea**, v. 23, n. 1, p. 1-38, 1996.
- BAETA NEVES, M.H.B. Flora ficológica da lagoa hipersalina de Araruama (Estado do Rio de Janeiro - Brasil) 2. Cyanophyceae. **Publicação do Instituto de Pesquisa da Marinha**, n. 149, p. 1-15, 1983.
- BAETA NEVES, M.H.B. Estudo das cianofíceas marinhas bentônicas da região de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil) II - Hormogonae. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 4, p. 641-659, 1992.
- BAKER, P. D. et al. Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in south Australia. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, n. 6, p. 506-511, 2001.
- BICUDO, C.E.M.; BICUDO, R.M.T. Algas da Lagoa das Prateleiras, Parque Nacional do Itatiaia, Brasil. **Rickia**, v. 4, p. 1-40, 1969.
- BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce**: initiation à la systématique. Les algues bleues et rouges. Paris: Boubée. v. 3, 512p, 1970.
- BRANCO, C.C.Z.; EMED, R.G.; BRANCO, L.H.Z.; NECCHI, O. Macroalgas de riachos da Floresta Nacional de Itati, região centro-sul do estado do Paraná, sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v. 22, n. 2, p. 437-451, 2008.
- BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS-FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from Atlantic rainforest região of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie Algologie**, v. 30, p. 135-152, 2009.
- BRANCO, L.H.Z.; NECCHI, O. Distribution of stream macroalgae in three tropical drainage basins of southeastern Brazil. **Archives of Hydrobiology** v. 142, p. 241-256, 1998.
- BRANCO, L.H.Z.; NECCHI, O.; BRANCO, C.C.Z. Cyanophyceae from lotic ecosystems of São Paulo State, southeastern Brazil. **Algological Studies**, v. 94, p. 63-87, 1999.

BRANCO, L.H.Z.; PEREIRA, J.L. Evaluation of seasonal dynamics and bioindication potential of macroalgal communities in a polluted tropical stream. **Archives of Hydrobiology**, v. 155, p. 147-161, 2002.

BRANCO, L.H.Z. SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. **Algological Studies**, v. 84, p. 39-52, 1997.

CASAMATTA, D.A.; VIS, M.L.; SHEATH, R.G. Cryptic species in cyanobacterial systematic: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Aquatic Botany**, v. 77, n. 4, p. 295-309, 2003.

COUTÉ, A.; TELL, G.; THÉREZIÉN, Y. Aerophytic cyanophyceae from New Caledonia. **Cryptogamie Algologie**. Paris, v. 20, n. 4. p. 301-344, 1999.

DAVIS, P.A.; BEARD, S.J.; WALSBY, A.E. Variation in filament width and gas vesicle of red and green isolates of *Planktothrix* spp., **Algological Studies**, v. 108, p. 15-29, 2003.

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

ELENKIN, A.A. Obosnovnykh principakh sistemy Cyanophyceae. [About the main principles of the system of Cyanophyceae]. **Sov. Bot.** v. 4, p. 51-83, 1935.

ELENKIN, A.A. **Monographia algarum cyanophycearum aquis dulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum** [Sinezelenye vodorosli SSSR], Pars spec. v. 2, n. 1-2, 1908p., Izd. Na SSSR, Moskva-Leningrad, 1938-1949.

FERRAGUT, C.; LOPES, M.R.M.; BICUDO, D.C.; BICUDO, C.E.M.; VERCELLINO, I.S. Ficoflórula perifítica e plantônica (exceto Bacillariophyceae) de um reservatório oligotrófico raso (Lago do IAC, São Paulo). **Hoehnea** v. 32, n. 2, p. 137-184, 2005.

FRÉMY, P. Les Cyanophycées de Côtes d'Europe. **Mém. Soc. nat Sci. nat. Math.** Cherbourg. v. 41, p. 1-234, 1929-1933.

FRÉMY, P. Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. **Archives de Botanique Mémoire**, v. 3, n. 2, p. 1-493, 1930.

GARDNER, N.L. New Myxophyceae from Porto Rico. **Memoirs of New York Botanical Garden**, v. 7, p.1-444, 1927.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: Rabenhorst's **Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz**. 2. Aufl. Leipzig, Akademische. Verlagsgesellschaft. v. 14, 1196p. 1932.

GEITLER, L. Schizophyta (Klasse Schizophyceae). In: ENGLER; PRANTL. **Natürl Pflanzenfam.**, 1942. v. 1b, 232 p.

GOMONT, M.M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). **Annales des Sciences Naturelles: Botanique**, sér. 7, v. 15, p. 263-368; v. 16, p. 91-264; 1892.

HALSTVEDT, C. B.; ROHRLACK, T.; ANDERSEN, T.; SKULBERG, O.; EDVARDESEN, B. Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. **J. Plankton Research**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 471-482, 2007.

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

HUSZAR, V.L.M.; MENEZES, M.; FERNANDES, V.O. Fitoplâncton de rede da Lagoa Cabiúnas, Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma contribuição a seu conhecimento. **Boletim do Museu Nacional, Bôtanica**, n. 78, p. 1-43, 1989.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) **Coordenação de Cartografia e Mapa temático – Mapa de Vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro, Ministério do Planejamento e Orçamento, 2004. http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/. 2012. Acessado em 12/12/2012.

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. Introduction to the 18^o IAC Symposium in České Budejovice 2010, Czech Republic: some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. **Fottea**, 11(1): 1-7, 2011.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota 1. Teil: Oscillatoriales**. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G; SCHAGERL, M. (Edes.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Heidelberg: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759p.

KOMÁREK J.; HAUER T. (2014): CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>. Acesso em 14.janeiro.2014

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. **Czech Phycol.**, v. 4, p. 1-18, 2004.

LEMES-DA-SILVA, N.M.; BRANCO, L.H.Z.; NECCHI, O. Corticolous cyanobacteria from tropical Forest remnants in northwestern São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Botany** v. 35, n. 2, p. 169-179, 2012.

LILLEHEIL, G.; ANDERSEN, R. A.; SKULBERG, O. M.; ALEXANDER, J. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/ Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1275-1289, 1997.

MARTINS, M.D.; BRANCO, L.H.Z.; WERNER, V.R. Cyanobacteria from coastal lagoons of southern Brazil: non-heterocytous filamentous organisms. **Brazilian Journal of Botany** v. 35, n. 4, p. 325-338, 2012.

McGREGOR, G.B. **Freshwater Cyanoprokaryota of North-Eastern Australia. I: Oscillatoriales.** Canberra: Goanna Print, 2007. 124p.

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

NECCHI, O. PASCOALOTO, D.; BRANCO, C.C.Z.; BRANCO, L.H.Z. Stream macroalgal flora from the northwest region of São Paulo State, southeastern Brazil. **Algological Studies** v. 94, p. 91-112, 1997.

PADISÁK, J. Phytoplankton. In: SULLIVAN, P.E.; REYNOLDS, C.S. (Ed.) **The Lakes Handbook. 1. Limnology and Limnetic Ecology.** Oxford: Blackwell Science, 2003. p. 251-308.

PALINSKA, K.A.; MARQUARDT, J. Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale*. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 325-335, 2008.

PÉREZ, M. C.; MAIDANA, N. I.; COMAS, A. Phytoplankton composition of the Ebro River estuary, Spain. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 68, n. 1, p. 11-27, 2009.

RIBEIRO, G.F.; ANDRADE, R.R.; MAIZONAVE, C.R.M. CROSSETTI, L.O. Effects of cyanobacterial summer bloom on the phytoplankton structure in an urban shallow lake, Guaíba Lake, southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 72, n. 2, p. 78-87, 2012.

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

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 60, n. 1-2, p. 19-58, 1995.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Fitoplâncton do lago das Garças, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: estudo taxonômico e aspectos ecológicos. **Hoehnea**, v. 16, p. 89-131, 1989.

SANT'ANNA, C.L.; BICUDO, R.M.T.; PEREIRA, H.A.S.L. Nostocophyceae (Cyanophyceae) do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil. **Rickia**, n. 10, p. 1-27, 1983.

SANT'ANNA, C.L.; MELCHER, S.S.; CARVALHO, M.C.; GEMELGO, M.P.; AZEVEDO, M.T.P. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoir, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** v. 30, n. 1, p. 1-17, 2007.

SANT'ANNA, C.L.; SILVA, S.M.F.; BRANCO, L.H.Z. Cyanophyceae da Gruta-que-Chora, Município de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 2, n. 18, p. 75-97, 1991.

SANT'ANNA, C.L. et al. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, município de Itanhaém, SP, Brasil, 1. **Rickia**, n. 12, p. 89-112, 1985.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; BRANCO, L.H.Z.; BRAGA, M.R.A.; CORDEIRO-MARINO, M.; GUIMARÃES, S.M.P.B. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, Município de Itanhaém, SP, Brasil, III. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 3, p. 389-407, 1995.

SANTOS, K.R.S.; SANT'ANNA, C.L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v. 33, n. 1, p. 61-83, 2010.

SCIUTO, K.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N.; LAROCCA, N.; MORO, I. Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). **Cladistics** v. 1, p. 1-18, 2011.

SENNA, P.A.C. **Cyanophyceae da lagoa de estabilização de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil**. 1979. 116 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SENNA, P.A.C. **Nostocophyceae do município de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil**. 1982. 249 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SENNA, P.A.C.; FERREIRA, L.V. Nostocophyceae (Cyanophyceae) da Fazenda Água Limpa, Distrito Federal, Brasil, I - Famílias Chroococcaceae e Oscillatoriaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 91-108, 1986.

SHEATH, R.G.; COLE, K.M. Biogeography of stream macroalgae in North America. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 448-460, 1992.

SILVA, D. **Revisão do gênero *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek, 1988 (Cyanobacteria/Oscillatoriales), no Brasil**. 2009. 238 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.

STARMARCH, K. **Cyanophyta – sinice, Glaucophyta – glaukofity. Flora slodkow**. Polski, Pwn Warszawa. v. 2, p. 1-808. 1966.

STEFANIAK, K.; KOKOCINSKI, M.; MESSYASZ, B. Dynamics of *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom. blooms in polimictic lake Laskownicki and Grylewskie (Wielkopolska region) Poland. **Oceanol. Hydrobiol. Studies**, Gdansk, v. 34, n. 3, p. 125-136, 2005.

STRUNECKY, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Phhylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? **Polar Biology** v. 33, p. 1419-1428, 2010.

SUDA, S.; WATANABE, M.M.; OTSUKA, S.; MAHAKAHANT, A.; YONGMANITCHAI, W.; NOPARTNARAPORN, N.; LIU, Y.D.; DAY, J.G. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriid cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1577-1595, 2002.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.R.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology** 42 (6): 1257-1270, 2006.

TENEVA, I.; DZHAMBASOV, B.; MLADENOV, R.; SCHIRMER, K. Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpcB*-IGS-*cpcA* locus. **Journal of Phycology** 41 (1): 188-194, 2005.

THIERS, B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. 2014. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.

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

TURICCHIA, S.; VENTURA, S.; KOMÁRKOVÁ, J.; KOMÁREK, J. Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Diversity of oscillatoriacean genera. **Nova Hedwigia** v. 89, n. 1-2, p. 165-200, 2009.

WERNER, V.R. Cianofíceas planctônicas da Lagoa de Tramandaí e da Lagoa do Armazém, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, sér. Bot., n. 37, p. 33-70, 1988.

WERNER, V.R. **Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2002. 363 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

WERNER, V.R.; ROSA, Z.M. Cyanophyceae da Estação ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 3, p. 481-502, 1992.

WESTBERRY, T.K.; SIEGEL, D.A. Spatial and temporal distribution of *Trichodesmium* blooms in the world's oceans. **Global Biogeochemical Cycles** v. 20, p. 1-13, 2006.

WETZEL, R. **Limnology: lake and river ecosystems**. 3 ed. Academic Press, 1983. 1006p.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669p.

CAPÍTULO II:

Estudos moleculares e filogenia de Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria) do Brasil

1. RESUMO

Embora as cianobactérias pertencentes à subfamília Phormidioideae estejam entre os grupos mais frequentes e abundantes, presentes em vários tipos de ambientes, alguns aspectos de sua biologia e sua história evolutiva ainda permanecem pobremente caracterizados. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a diversidade genética de populações encontradas em território nacional. Para este fim, foram isoladas 60 populações de Phormidioideae (52 *Phormidium*, seis *Porphyrosiphon*, uma *Planktothricoides* e uma *Planktothrix*) coletados em ambientes aerofíticos (rochas, solos, troncos) e aquáticos (lagos e riachos) nos estados do Ceará, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Roraima e São Paulo. Foram identificadas 27 espécies com base em características morfológicas, das quais 11 foram identificadas apenas em nível genérico. Foram obtidas as sequências do gene RNAr 16S de todas as 60 populações isoladas, e sequências do espaçador intergênico 16S-23S (ITS 16S-23S) para 50 delas. *Phormidium* mostrou-se polifilético e as linhagens pertencentes a este gênero distribuíram-se em 10 grupos. *Porphyrosiphon* mostrou-se geneticamente diferente das demais linhagens, validando o gênero, porém as análises sugerem que *P. notarisii* é uma espécie coletiva. Das sequências do ITS 16S-23S obtidas, quatro populações não apresentaram RNAt, 12 apresentaram os RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala} e o restante, 34 populações, apresentaram apenas o RNAt^{Ile}. O RNAr 16S e o ITS 16S-23S evidenciaram a existência de sete novos gêneros e 11 possíveis novas espécies para a ciência. Os resultados indicam incongruências entre as características morfológicas e genéticas, ressaltando a necessidade de mais estudos taxonômicos para maior entendimentos das relações evolutivas do grupo.

2. INTRODUÇÃO

As cianobactérias formam um grupo geneticamente bem delimitado dentro do domínio Bacteria. Segundo Hoffmann et al. (2005), os representantes de Cyanobacteria estão distribuídos em seis ordens, sendo Chroococcales e Oscillatoriales pertencentes à subclasse Oscillatorioophycidae.

A ordem Oscillatoriales compreende um conjunto de organismos morfo e ecologicamente diversificados, podendo ser encontrado em uma grande variedade de ambientes. A atual classificação dos grupos que compõem a ordem é baseada, principalmente, em dados morfológicos e ultraestruturais, não apresentando suporte molecular para as famílias, subfamílias e, em alguns casos para os gêneros (HOFFMANN et al., 2005). Dentre as Oscillatoriales, a subfamília Phormidioideae destaca-se pelo elevado número de espécies descritas e pela taxonomia complexa (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005).

Os representantes de Phormidioideae constituem um dos grupos mais frequentes e abundantes, estando presente em vários tipos de ambientes, como os marinhos, dulcícolas lênticos ou lóticos, rochas, solos, troncos de árvores (GOMONT, 1892; GARDNER, 1927; GEITLER, 1932, DESIKACHARY, 1959; SANT'ANNA & AZEVEDO, 1995; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005; BRANCO et al., 2009). Esses organismos são caracterizados por desenvolverem tricomas homocitados isopolares, cilíndricos, com ou sem bainha mucilagínosa, ramificações falsas raras, células geralmente isodiamétricas e reprodução por meio de fragmentação dos tricomas (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Os membros dessa subfamília exibem grande plasticidade morfológica relacionada com respostas a fatores ambientais. Tais variações, aliadas à pouca quantidade de caracteres morfológicos diacríticos, tornam esse grupo taxonomicamente complexo.

Com relação à filogenia, esse grupo ainda permanece pobremente caracterizado. Alguns gêneros são geneticamente bem delimitados, como é o caso de *Planktothrix*, *Planktothricoides*

(SUDA et al., 2002) e *Arthrospira* (NELISSEM et al., 1994; MANEN & FALQUET, 2002), porém outros ainda possuem circunscrição confusa, como o caso de *Phormidium* (KOMÁREK, 2006), ou nenhum estudo molecular, como é o caso de *Porphyrosiphon*.

Estudos moleculares indicam que alguns critérios morfológicos tradicionalmente utilizados para separar gêneros e espécies não estão corretamente relacionados com os padrões filogenéticos (ISHIDA et al., 2001; GUGGER & HOFFMANN, 2004, KOMÁREK, 2006). No entanto, a atual classificação do grupo é inteiramente baseada em caracteres morfológicos e ultraestruturais e a classificação de alguns gêneros e espécies ainda é fundamentada nas primeiras monografias feitas para o grupo, principalmente a de Gomont (1982) e de Komárek & Anagnostidis (2005). Segundo Komárek (2010), as características morfológicas e ecológicas do grupo precisam ser reavaliadas.

Desde que as ferramentas moleculares começaram a ser aplicadas na sistemática de cianobactérias, um dos genes mais informativos é o RNAr 16S (WOESE, 1987; OLSEN & WOESE, 1993; LUDWIG & SCHLEIFER, 1994; LUDWIG & KLENK, 2001), um gene conservado, mas que contém regiões variáveis e hipervariáveis. As investigações filogenéticas com base neste gene têm mostrado que as cianobactérias filamentosas homocitadas, inclusive os representantes de Phormidioideae, formam um grupo polifilético (GIOVANNONI et al., 1988; WILMOTTE, 1994; CASTENHOLZ et al., 2001; RIPPKA et al., 2001; WILMOTTE & HERDMAN, 2001). Devido ao alto grau de conservação do RNAr 16S, este marcador não oferece resolução filogenética a níveis intragenéricos (FOX et al., 1992). Como complemento, a região espaçadora entre os genes RNAr 16S e RNAr 23S (ITS 16S-23S), que apresenta maior variação, vem sendo estudada, principalmente quanto à estrutura secundária de regiões específicas, com o intuito de resolver as relações evolutivas em nível infragenérico dentro de Phormidioideae (BOYER et al., 2001; BAURAIN et al., 2002; MANEN & FALQUET, 2002; TATON et al., 2006; MARQUAARDT & PALINSKA, 2007; PALINSKA & MARQUAARDT,

2008; SCIUTO et al., 2011). Porém, a quantidade de sequências disponíveis para avaliação e comparações ainda é limitada.

Considerando a falta de estudos moleculares abordando Phormidioideae e a limitada resolução filogenética de membros da subfamília, o presente estudo teve como objeto a caracterização molecular de populações de Phormidioideae, visando contribuir com o estudo das relações filogenéticas de seus membros por meio da análise das sequências do RNAr 16S e do ITS 16S-23S.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens selecionadas e condições de crescimento

As linhagens estudadas foram coletadas em diferentes localidades e em diferentes habitats (Tabela 1). As amostras provenientes de ambientes aerofíticos foram acondicionadas em sacos de papel e as oriundas de ambientes aquáticos foram acondicionadas em frascos de plástico, ambos mantidas sobre refrigeração (4°C) até o momento da inoculação. Uma pequena parte dos organismos coletados foi separada em microscópio estereoscópico (Zeiss 47 50 52), com auxílio de pinças e agulha histológica e, posteriormente, inoculada em diferentes meios de cultura: BG11 (RIPPKA *et al.* 1979) e Bold (NICHOLS, 1973). As amostras foram inoculadas sob condições assépticas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido e em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 5 mL meio de cultura sólido (1,2% Agar). Os inóculos foram acondicionados em estufas incubadoras sob condições controladas de temperatura (20°C $\pm$ 1), irradiância (50 μ mol fótons.m⁻².s⁻¹) e fotoperíodo (14h luz e 10h escuro). Após a observação do crescimento das cianobactérias nos meios de cultura, os procedimentos para isolamento das linhagens foram realizadas com o método de “pescaria” com pipeta tipo Pasteur, sob microscópio fotônico invertido Leica DMIL LED. Em adição às linhagens isoladas neste estudo, duas linhagens, oriundas da coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP (Tabela 1) também foram analisadas. A identificação das linhagens foi feita a partir das amostras provenientes da natureza.

Tabela 1. Origem das populações estudadas. (CP = Coleção Phormidioideae, IBILCE = Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; SJRP = São José do Rio Preto)

Táxon	Latitude/Longitude	Origem	Habitat/substrato
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> – 1CP	09°46'07"S/54°39'09"W	Córrego de Guarantã do Norte/MT	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. aerugineo-caeruleum</i> – 2CP	09°45'23"S/54°34'46"W	Cachoeira de Santos Reis, Guarantã do Norte/MT	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. cf. ambiguum</i> - 3CP	20°38'45"S/49°24'13"W	Córrego Barra Funda, Ipiruá/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. cf. ambiguum</i> – 4CP	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. cf. ambiguum</i> – 5CP	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macaúbal/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. animale</i> – 6CP	29°59'10"S/55°45'27"W	Margens do rio Ibirapuitã, Alegrete/RS	Aerofítico/solo
<i>P. crouanii</i> – 7CP	23°13'03"S/44°43'11"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ tronco
<i>P. formosum</i> – 8CP	20°51'39"S/49°36'54"W	Córrego Barra Funda, Ipiruá/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. formosum</i> – 9CP	20°51'36"S/49°33'59"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. cf. formosum</i> – 10CP	29°43'28"S/52°26'26"W	Fragmento florestal, Santa Cruz do Sul/RS	Aerofítico/solo
<i>P. cf. formosum</i> – 11CP	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macaúbal/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. cf. formosum</i> – 12CP	22°40'38"S/45°38'54"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. cf. formosum</i> – 13CP	23°13'03"S/44°42'43"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/solo
<i>P. inundatum</i> – 14CP	12°22'34"S/55°36'36"W	BR163, Sorriso/MT	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. inundatum</i> – 15CP	22°42'57"S/45°33'31"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 16CP	20°56'01"S/49°23'28"W	Rio das Pedras, SJRP/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. inundatum</i> – 17CP	22°40'38"S/45°38'54"W	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 18CP	30°03'49"S/51°10'38"W	Parque Farroupilha, Porto Alegre/RS	Aerofítico/solo
<i>P. inundatum</i> – 19CP	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 20CP	23°22'31"S/44°49'37"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso

Tabela 1. (cont.)

Táxon	Latitude/Longitude	Origem	Habitat/substrato
<i>P. inundatum</i> – 21CP	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 22CP	20°43'24"S/49°18'20"W	Córrego Talhadinho, SJRP/ SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. inundatum</i> – 23CP	30°02'38"S/51°13'19"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 24CP	23°13'03"S/44°42'43"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ solo
<i>P. inundatum</i> – 25CP	23°22'16"S/44°49'50"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. inundatum</i> – 26CP	23°13'05"S/44°42'47"W	Centro Histórico, Parati/RJ	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 27CP	20°47'04"S/49°21'41"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ solo
<i>P. inundatum</i> – 28CP	30°02'33"S/50°59'35"W	Quinta da Estância Grande, Viamão/RS	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 29CP	30°03'43"S/51°10'32"W	Jardim Botânico, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
<i>P. inundatum</i> – 30CP	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/solo
<i>P. papyraceum</i> – 31CP	20°11'10"S/49°41'06"W	Córrego de Pontes Gestal/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. retzii</i> – 32CP	20°47'55"S/49°18'41"W	Córrego Felicidade, SJRP/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. retzii</i> – 33CP	23°22'16"S/44°49'50"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. retzii</i> – 34CP	23°22'47"S/44°49'21"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. retzii</i> – 35CP	20°51'39"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. retzii</i> – 36CP	20°38'45"S/49°24'13"W	Córrego Barra Funda, Ipiгуá/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. terebriforme</i> – 37CP	30°03'06"S/51°10'37"W	Lago das Tartarugas, Porto Alegre/RS	Aquático/ plâncton
<i>P. tergestinum</i> – 38CP	20°15'15"S/47°27'23"W	Córrego Euclides Brentino, Pedregulho/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. cf. uncinatum</i> – 39CP	20°19'39"S/49°10'14"W	Praia das Marianas, Icém/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>P. cf. vulgare</i> – 40CP	20°47'04"S/49°21'41"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.1 – 41CP	*	Região de Campos do Jordão/SP	Aerofítico/ tronco

Tabela 1. (concl.)

Táxon	Latitude/Longitude	Origem	Habitat/substrato
<i>Phormidium</i> sp.2 – 42CP	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.3 – 43CP	30°03'30"S/51°10'17"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.4 – 44CP	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.4 – 45CP	20°47'04"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.4 – 46CP	20°44'25"S/49°25'51"W	Fragmento florestal, Macaúbal/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.5 – 47CP	20°51'36"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>Phormidium</i> sp.6 – 48CP	20°46'59"S/49°21'30"W	Área urbana, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.7 – 49CP	23°22'12"S/44°49'12"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>Phormidium</i> sp.7 – 50CP	23°22'12"S/44°49'12"W	Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>Phormidium</i> sp.8 – 51CP	30°02'38"S/51°13'19"W	PUCRS, Porto Alegre/RS	Aerofítico/ tronco
<i>Phormidium</i> sp.9 – 52CP	20°47'07"S/49°21'37"W	IBILCE, SJRP/SP	Aerofítico/ tronco
<i>Planktothrix</i> <i>raciborskii</i> – 53CP	20°51'36"S/49°36'54"W	Córrego do Jacaré, Neves Paulista/SP	Aquático/ sedimento arenoso
<i>Planktothrix</i> <i>isoethrix</i> – 54CP	*	Lagoa, Canindé/CE	Aquático/ sedimento arenoso
<i>Porphyrosiphon</i> <i>notarisii</i> – 55CP	20°21'51"S/49°15'49"W	Reserva Sebastião Porto Meinberg, Icem/SP	Aerofítico/ solo
<i>Porphyrosiphon</i> <i>notarisii</i> – 56CP	20°56'01"S/49°23'28"W	Rio das Pedras, SJRP/SP	Aerofítico/ solo
<i>Porphyrosiphon</i> <i>notarisii</i> – 57CP	20°13'02"S/47°26'38"W	Trilha do Lobo, Pedregulho/SP	Aerofítico/ solo
<i>Porphyrosiphon</i> <i>notarisii</i> – 58CP	20°38'45"S/49°24'13"W	Barra Funda, Ipiquá/SP	Aerofítico/ solo
<i>Porphyrosiphon</i> sp.1 – 59CP	*	Barranco do rio Cai, Montenegro/RS	Aerofítico/ solo
<i>Porphyrosiphon</i> sp.2 – 60CP	03°16'56"N/60°50'59"W	BR174 – km 57, Voa Vista, RR	Aerofítico/ solo

* Dados não disponíveis

3.2 Estudos de identificação

Os estudos de identificação foram feitos com base nas amostras da natureza. Os espécimes foram analisados em microscópio estereoscópico (Zeiss 47 50 52) e microscópio fotônico (Olympus BH2), e os critérios morfológicos observados foram os tradicionalmente analisados para a identificação de Phormidioideae, tais como presença/ausência e aspecto da bainha mucilaginosa, estrutura dos tricomas, estrutura do ápice do tricoma e da célula apical, forma e dimensões celulares, presença/ausência e disposição de grânulos, presença/ausência e disposição de aerótopos. Além da avaliação morfológica, aspectos ecológicos como *habitat*, foram considerados para a identificação das populações.

3.3 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias

As células foram concentradas por meio de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pélete lavado visando a retirada dos nutrientes do meio de cultura e dos possíveis contaminantes. A lavagem consistiu na adição de 500 µL de Solução I (Tris-HCl 1M pH 8,0, EDTA 0,5M e NaCl 5M) e 50 µL de SDS 2% (*sodium dodecyl sulfate*) que foi posteriormente agitado em vórtex e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pélete foi adicionado 1mL de Solução I, agitado em vórtex novamente centrifugado a 7.000 rpm. O pélete foi usado para extrair o DNA genômico, utilizando o kit MoBio PowerSoil DNA Isolation (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

Para as extrações com o kit MoBio PowerSoil DNA Isolation (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) uma amostra foi adicionada a um tubo *PowerBead* (2mL) contendo 750 µL de *Bead Solution*. 60 µL de solução C1 foram adicionados ao tubo com a amostra, e este foi agitado em vórtex por 5 segundos. Então o tubo foi agitado no homogeneizador de tecidos Precellys™ 24 (Bertin Technologies, Bordeaux, França) em dois ciclos de 45 segundos a 4000

rpm e intervalo entre os ciclos de 20 segundos. Logo após, o tubo foi centrifugado e cerca de 450 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo (2 mL) novo, onde foram adicionados 250 µL da solução C2 e agitado. A mistura foi incubada por 5 minutos a 4°C, sendo novamente centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante (cerca de 600 µL) foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 200 µL da solução C3, agitados e incubados novamente a 4°C por 5 minutos. Decorrido este período centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm por 1 minuto, e transferiram-se 750 µL do sobrenadante a um microtubo novo, sendo adicionados 1000 µL da solução C4 e agitado. Foram transferidos 675 µL da mistura para uma coluna acoplada em um microtubo de 2 mL e então centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto, a fração eluída foi descartada e o procedimento repetido até que todo o volume tivesse passado pela coluna. A coluna foi então lavada com 500 µL da solução C5 e centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto. Para garantir que a coluna tivesse sido completamente seca o volume que passou pela coluna foi descartado e novamente centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm. A coluna foi então transferida para um microtubo limpo e o DNA foi eluído em 100 µL de solução C6 e centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto.

Alíquotas (1 µL) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 0,3%, EDTA 0,5M) e GelRed™ 0,6X (Biotium, Hayward, E.U.A.) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita utilizando-se fotografia digital do gel em fotodocumentador “Mini Bis Pro” e software “Gel Capture™” (Micro Photonics, Allentown, E.U.A.). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb (Life Technologies). O material foi armazenado a temperatura de -20° C até o momento da próxima análise.

3.4 Técnica de *Single cell PCR*

Para a obtenção de células individuais ou em pequenos tricomas, poucos filamentos foram isolados sob microscópio estereoscópico e colocados em lâminas microscópicas estéreis juntamente com uma gota de água ultra pura (MiliQ) também previamente esterilizada. Esse material foi levemente macerado para obtenção de células isoladas ou de pequenos tricomas (máximo cinco células) e levado ao microscópio invertido para coleta e lavagem das células ou tricomas. Para o isolamento do material de interesse, foram utilizados capilares estéreis, feitos pela manipulação de pipetas *Pasteur* sobre bico de *Bunsen* e com auxílio de pinça. O capilar foi posicionado na direção da célula ou do tricoma de interesse de forma que o material fosse transferido para o capilar. O material coletado foi transferido para outra gota de água ultra pura (MiliQ) para lavagem e, após três a cinco repetições do procedimento, a célula ou tricoma foi armazenado em microtubo (0,2 mL). O número de células por microtubo variou de uma a cinco. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi preparada diretamente no microtubo contendo as células isoladas.

3.5 Amplificação por PCR do gene RNAr 16S e do espaçador intergênico 16S-23S (ITS 16S-23S)

A amplificação do RNAr 16S e do ITS 16S-23S foi realizada primeiramente utilizando os iniciadores 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') (NEILAN et al., 1997) e 23S30R (5'CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT3') (TATON et al., 2003) em termocicladores Techgene TC-312 e TC-512 (Techne, Burlington, Inglaterra). Cada reação consistiu em: 5 µL de tampão de PCR 10X, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 pmol de cada iniciador, 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, E.U.A.), 10 ng de DNA, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada, para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado para amplificação foi de: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 10 ciclos de 94°C

por 45 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos, 25 ciclos de 92°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, extensão final de 72°C por 7 minutos. A verificação dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 3.3.

3.6 Clonagem e transformação

A clonagem das sequências do RNAr 16S e do ITS 16S-23S produzidas na PCR foram realizadas utilizando-se o kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5 α foi feita através de choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). Alíquotas de 10 μ L do produto de ligação e 50 μ L de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C por 30 segundos. Em seguida, foi novamente resfriado em gelo por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se a ele 250 μ L de meio LB líquido a temperatura ambiente e, em seguida, este foi incubado por 2 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina e X-Gal, ambos em concentrações finais de 100 μ g.mL⁻¹ de meio. As placas foram incubadas por 13-16 horas, a temperatura de 37°C.

3.7 Seleção de colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, cinco colônias de cor branca foram selecionadas e utilizadas para novas reações de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 μ L de reação de PCR (conforme descrito no item 3.4) contendo os iniciadores CYA359F (5'GGGGAATTTTCCGCAATGGG3'), 781a

(5'GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT3') e CYA781b (5'GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT3') (NÜBEL et al., 1997). O ciclo utilizado para amplificação foi de: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 7 minutos. A verificação da presença dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 3.3.

3.8 Extração do DNA plasmidial

A extração de plasmídeo das células de *E. coli* DH5α que continha os insertos de interesse foi feita com o kit “GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas Life Sciences). As colônias brancas selecionadas foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido e cultivadas por 15 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm. Após este período de incubação, 3 mL de cultura de células produzidas foi colocada em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais uma vez. O pélete formado foi ressuspensionado em 250 µL de Solução de Ressuspensão. A seguir, foram adicionados 250 µL de Solução de Lise e misturados por inversão, então foram adicionados 350 µL de Solução de Neutralização e misturados por inversão de quatro a seis vezes. Posteriormente, foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante (cerca de 850 µL) foi transferido para uma coluna acoplada a um microtubo (1,5 mL). Este foi centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado e esta foi novamente colocada no mesmo microtubo. 500 µL de Solução de Lavagem foram adicionados à coluna e posteriormente centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi novamente descartado e mais 500 µL de Solução de Lavagem foram adicionados à coluna e nova centrifugação foi realizada por 1 minuto a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado e o microtubo com a coluna foi novamente centrifugada para eliminar os resíduos da Solução de Lavagem. A coluna foi transferida para

novo microtubo e 50 µL de Tampão de Eluição foram adicionados à coluna. Após as amostras terem sido incubadas a temperatura ambiente por dois minutos, foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm. Os plasmídeos extraídos foram armazenados a temperatura de -20° C até o momento da próxima análise.

3.9 Sequenciamento e processamento das sequências

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos dos marcadores estudados foi feita usando-se o kit “Big Dye Terminator” versão 3.0 (Life Technologies). Utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5pmol dos iniciadores M13F (5’GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA3’), 357F (5’CCTACGGGAGGCAGCAG3’), 704R (5’TCTACGSTATTCACCSCTAC3’), 1114F (5’GCAACGAGCGCAACCC3’), 1494R (5’TACGGCTACCTTGTTACGAC3’) e Sp6R (5’ATTTAGGTGACACTATAGAA3’) (NEILAN et al., 1997), 1,5 µL de “Big Dye”, 3,5 µL de tampão 2,5X “Terminator” e água ultrapura para volume final de 10 µL.

As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação dos fragmentos realizou-se a precipitação de acordo com as instruções do kit “Big Dye Terminator” versão 3.0” e submetidas ao sequenciamento no sequenciador capilar 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), na empresa “Genomic Engenharia Molecular” (<http://www.genomic.com.br>). Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing-Analysis Software” versão 3.7 (Life Technologies).

As sequências geradas foram processadas para remoção das bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) com auxílio do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998) em sistema operacional Linux.

3.10 Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências gênicas de RNAr 16S obtidas neste estudo e as selecionadas no *GenBank*, foram alinhadas por meio do programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994) implementado no programa MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011) e o alinhamento foi verificado manualmente.

Árvores filogenéticas foram construídas com os critérios de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB), sendo os dois primeiros, implementados no programa MEGA 5.2. A robustez das árvores construídas foi estimada através da análise de reamostragem (*bootstrap*) para 1.000 replicações. O número de sítios informativos foram calculados. O melhor modelo evolutivo para o conjunto de dados obtidos (para as análises de ML e NJ) foi selecionado por meio do ModelTest 3.06 (POSADA & CRANDALL, 1998). As análises de Máxima Verossimilhança (ML) foram rodadas com o modelo de distância TrN (Tamura Nei) com os seguintes parâmetros: distribuição gama = 0,5747; proporção de sítios invariáveis = 0,5079; frequência de bases A = 0,278, C = 0,198, G = 0,295, T = 0,229, e a matriz da taxa de substituição A-C = 1,0000, A-G = 2,2915, A-T = 1,0000, C-T = 3,4604, G-T = 1,0000.

Para a árvore filogenética construída pela inferência Bayesiana (IB), utilizou-se o programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001), com parâmetros fixados em duas corridas de 30.000.000 de gerações em quatro cadeias e a amostragem foi realizada a

cada 1000 árvores. O valor mínimo (“*burn-in*”) foi checado com o programa Tracer v. 1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2007).

A linhagem *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (número de acesso *GenBank* NC005125) figurou como grupo externo.

3.11 Estrutura secundária do ITS 16S-23S

Para analisar a variabilidade intragenérica entre as linhagens, foram identificados os domínios conservados do ITS 16S-23S, sendo eles D1-D1', D2, D3, RNAt^{Ile}, V2, RNAt^{Ala}, V4, Box-B, Box-A, D4, V3 e D5. As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 foram geradas utilizando-se o programa Mfold 3.2 (ZUKER, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos de identificação

Foram estudadas 60 populações pertencentes aos gêneros *Phormidium* (52 populações), *Planktothricoides* (uma), *Planktothrix* (uma) e *Porphyrosiphon* (seis). As populações de *Phormidium* correspondem a 22 espécies, sendo nove delas identificadas apenas em nível genérico, por não apresentarem características morfológicas e/ou ecológicas correspondentes às espécies já descritas. Quatro populações de *Porphyrosiphon* foram identificadas como *P. notarisii* e duas permanecem sem identificação específica. Apenas uma linhagem foi identificada como pertencente ao gênero *Planktothricoides* (*P. raciborskii*) e uma ao gênero *Planktothrix* (*P. isothrix*). As avaliações morfométricas estão no capítulo 1.

4.2 Análise das sequências de RNAr 16S

As análises comparativas (BLAST) das sequências do RNAr 16S geradas neste estudo com outras sequências depositadas no *GenBank* mostraram identidade variando de 91 a 99% (Tabela 2). De acordo com a literatura, similaridade igual ou superior a 95% para o RNAr 16S é considerada indicativa de identidade de mesmo gênero (LUDWIG et al. 1998) e similaridade acima de 97,5% indica identidade em nível específico (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; VANDAMME et al., 1996). Esses valores foram determinados com base no estudo que mostrou que dentro do domínio Bacteria, dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentaram reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAINE et al., 1987) e que linhagens com sequências do RNAr 16S que apresentam valores de identidade inferiores a 97,5% são improváveis de possuírem reassociação DNA-DNA maior que 60-70%, pertencendo assim, a espécies diferentes (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994).

Tabela 2. Identidade das sequências do RNAr 16S das linhagens estudadas comparadas com outras sequências de cianobactérias do *GenBank* (NCBI) em 16 de janeiro de 2014 (I = Identidade, C = Cobertura).

Amostras	Tamanho do fragmento de RNAr 16S	I (%)	C (%)	Organismo mais próximo no GenBank (n° de acesso)
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> – 1CP	1456	99	97	<i>Phormidium</i> sp. clone MED-28 (JN382236)
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> – 2CP	1456	99	97	<i>Phormidium</i> sp. clone MED-28 (JN382236)
<i>P. cf. ambiguum</i> - 3CP	1453	98	100	<i>Phormidium</i> sp. DVL 1003c (JQ771628)
<i>P. cf. ambiguum</i> – 4CP	1453	98	100	<i>Phormidium</i> sp. DVL 1003c (JQ771628)
<i>P. cf. ambiguum</i> – 5CP	1454	98	100	<i>Phormidium</i> sp. DVL 1003c (JQ771628)
<i>P. animale</i> – 6CP	1454	99	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. crouanii</i> -7CP	1455	97	97	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>P. formosum</i> – 8CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. formosum</i> – 9CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. cf. formosum</i> – 10CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. cf. formosum</i> – 11CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. cf. formosum</i> -12CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. cf. formosum</i> – 13CP	1455	91	99	<i>P. animale</i> SAG 1459-6 (EF654087)
<i>P. inundatum</i> – 14CP	1455	96	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 15CP	1455	96	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 16CP	1453	97	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 17CP	1455	98	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 18CP	1455	98	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 19CP	1455	98	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 20CP	1455	98	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)

Tabela 2. (cont.)

Amostras	Tamanho do fragmento de RNAr 16S	I (%)	C(%)	Organismo mais próximo no GenBank (n° de acesso)
<i>P. inundatum</i> – 21CP	1454	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 22CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 23CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 24CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 25CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 26CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 27CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 28CP	1453	98	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 29CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. inundatum</i> – 30CP	1453	99	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. papyraceum</i> – 31CP	1453	96	100	<i>P. murrayi</i> Ant-Ph58 (DQ493872)
<i>P. retzii</i> – 32CP	1456	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. retzii</i> – 33CP	1456	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. retzii</i> – 34CP	1456	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. retzii</i> – 35CP	1456	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. retzii</i> – 36CP	1456	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. terebriforme</i> – 37CP	1456	99	96	<i>Phormidium</i> sp. ETS-05 (AJ548503)
<i>P. tergestinum</i> – 38CP	1456	98	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>P. cf. uncinatum</i> – 39CP	1455	97	99	<i>P. autumnale</i> SAG 78.79 (EF654084)
<i>P. cf. vulgare</i> – 40CP	1464	100	100	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 (NR102469)

Tabela 2. (concl.)

Amostras	Tamanho do fragmento de rRNA 16S	I (%)	C (%)	Organismo mais próximo no GenBank (n° de acesso)
<i>Phormidium</i> sp.1 – 41CP	1455	95	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.2 – 42CP	1455	95	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.3 – 43CP	1455	95	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.4 – 44CP	1455	96	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.4 – 45CP	1455	96	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.4 – 46CP	1455	95	100	<i>Phormidium</i> sp. B-Tom (EU196618)
<i>Phormidium</i> sp.5 – 47CP	1455	97	97	<i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED-28 (JN382236)
<i>Phormidium</i> sp.6 – 48CP	1455	98	100	<i>P. autumnale</i> Arct-Ph5 (DQ493873)
<i>Phormidium</i> sp.7 – 49CP	1464	100	100	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 (NR102469)
<i>Phormidium</i> sp.7 – 50CP	1464	99	100	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 (NR102469)
<i>Phormidium</i> sp.8 – 51CP	1456	98	99	<i>P. tergestinum</i> CCALA 155 (EF654083)
<i>Phormidium</i> sp.9 – 52CP	1456	98	99	<i>P. tergestinum</i> CCALA 155 (EF654083)
<i>Planktothricoides raciborskii</i> – 53CP	1456	94	99	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NSLA3 (AB045962)
<i>Planktothrix isothrix</i> – 54CP	1455	99	99	<i>Planktothrix mougeotii</i> HAB 3346 (FJ434248)
<i>Porphyrosiphon notarisii</i> – 55CP	1455	98	100	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)
<i>Porphyrosiphon notarisii</i> – 56CP	1457	98	99	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)
<i>Porphyrosiphon notarisii</i> – 57CP	1455	98	100	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)
<i>Porphyrosiphon notarisii</i> – 58CP	1454	96	100	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)
<i>Porphyrosiphon</i> sp.1 – 59CP	1455	96	100	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)
<i>Porphyrosiphon</i> sp.2 – 60CP	1455	96	100	Uncultured bacteria Quartz C15 (FJ230801)

Dentre as 60 sequências obtidas para o RNAr 16S neste estudo, observou-se variação de 0 a 196 nucleotídeos (0-13,5%). As linhagens identificadas como *Phormidium* cf. *formosum* (10CP e 11CP) apresentaram 100% de identidade entre as sequências, bem como as linhagens 14CP e 15CP de *P. inundatum*, as linhagens 17CP e 19CP de *P. inundatum* e as linhagens *P. cf. vulgare* 40CP e *Phormidium* sp.7 49CP.

Três populações estudadas (40CP, 49CP e 50CP) apresentaram uma inserção de 11 nucleotídeos, que corresponde à mesma inserção observada por Garcia-Pichel et al. (2001), Boyer et al. (2002) e Hasler et al. (2012) em populações de *Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont.

4.3 Análise das sequências do ITS 16S-23S

Foram obtidas sequências do ITS 16S-23S de 50 populações cujos tamanhos variaram de 280 a 652 pares de bases. Três padrões de organização do ITS 16S-23S ficaram evidentes: 12 sequências apresentaram o RNAt^{Ile} e o RNAt^{Ala}, 34 sequências apresentaram apenas o RNAt^{Ile} e quatro sequências não apresentaram o RNAt^{Ile} nem o RNAt^{Ala} (Tabela 3).

A tendência à presença de ambos os RNAs transportadores, comentada por Boyer et al. (2001) não foi observada neste estudo, no qual grande parte das sequências obtidas apresentaram apenas o RNAt^{Ile}. No entanto, a variação na presença/ausência dos RNAs transportadores observada neste estudo também foi citada por Nelissen et al. (1994), Wilmotte et al. (1994), Itean et al. (2000), Boyer et al. (2001), Boyer et al. (2002), Johansen et al. (2011).

As sequências do ITS 16S-23S apresentaram grande variação quanto ao tamanho e composição (Tabela 3) e suas regiões mais conservadas localizaram-se entre as posições 109-217 e 199-419 e correspondem, respectivamente, ao RNAt^{Ile} e ao RNAt^{Ala}.

Tabela 3. Tamanho das regiões do ITS 16S-23S das linhagens estudadas, em nucleotídeos.

Linhagem	Início	D1-D1'	Pós D1-D1'	D2 e espaçador	D3 e espaçador	RNAt ^{lle}	V2	RNAt ^{Ala}	Pré Box-B	Box-B	Pós Box-B	Box-A	D4	Espaçador e V3	D5
1CP - <i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i>	6	63	23	16	13	74	-	-	16	49	19	12	7	51	22
2CP - <i>P. aerugineo-caeruleum</i>	6	63	23	16	13	74	-	-	17	49	19	12	7	51	22
4CP - <i>P. cf. ambiguum</i>	7	65	17	17	12	74	21	73	99	35	18	12	7	x	x
6CP - <i>P. animale</i>	6	57	22	22	7	74	84	73	97	37	19	12	7	69	21
8CP - <i>P. formosum</i>	6	57	19	17	10	74	16	73	19	36	17	12	7	55	19
9CP - <i>P. formosum</i>	6	56	19	17	10	74	16	73	18	36	17	12	7	55	19
10CP - <i>P. cf. formosum</i>	8	54	19	17	12	74	24	73	78	34	16	12	7	64	22
11CP - <i>P. cf. formosum</i>	7	63	18	18	29	74	-	-	41	37	23	12	7	17	15
12CP - <i>P. cf. formosum</i>	7	72	15	21	7	74	-	-	36	33	16	11	8	94	15
13CP - <i>P. cf. formosum</i>	8	58	15	17	12	74	24	73	80	34	16	12	7	65	20
14CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	22	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	91	8
15CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	23	18	13	74	-	-	103	38	18	12	7	61	16
16CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	24	18	12	74	-	-	48	37	17	12	7	65	13
17CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	21	17	12	74	-	-	45	41	21	12	7	57	16
18CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	83	12
19CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	21	17	12	74	-	-	45	41	20	12	7	57	16
20CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	21	17	12	74	-	-	45	41	20	12	7	57	16

Tabela 3. (cont.)

Linhagens	Início	D1-D1'	Pós D1-D1'	D2 e espaçador	D3 e espaçador	RNA ^{Ala} _{le}	V2	RNA ^{Ala}	Pré Box-B	Box-B	Pós Box-B	Box-A	D4	Espaçador e V3	D5
22CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	83	12
23CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	91	8
24CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	83	12
25CP - <i>P. inundatum</i>	6	63	21	17	12	74	-	-	45	41	20	12	7	57	16
26CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	83	12
27CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	91	8
28CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	52	19	12	7	91	8
29CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	83	12
30CP - <i>P. inundatum</i>	6	66	21	17	12	74	-	-	43	53	19	12	7	91	9
31CP - <i>P. papyraceum</i>	6	64	26	18	12	74	-	-	41	37	19	12	7	64	13
32CP - <i>P. retzii</i>	6	63	23	16	12	74	-	-	17	41	19	12	7	73	21
33CP - <i>P. retzii</i>	6	63	23	16	12	74	-	-	17	41	19	12	7	73	21
34CP - <i>P. retzii</i>	6	63	23	16	12	74	-	-	17	41	19	12	7	73	21
36CP - <i>P. retzii</i>	7	63	23	16	12	74	-	-	17	41	19	12	7	73	21
37CP - <i>P. terebriforme</i>	7	60	20	17	12	74	13	73	12	25	17	12	7	x	x
38CP - <i>P. tergestinum</i>	6	63	23	16	13	74	-	-	17	48	20	12	7	51	22
39CP - <i>P. cf. uncinatum</i>	6	59	49	17	12	74	61	73	54	35	19	12	7	55	23

Tabela 3. (concl.)

Linhagens	Início	D1-D1'	Pós D1-D1'	D2 e espaçador	D3 e espaçador	RNA ^{lle}	V2	RNA ^{Ala}	Pré Box-B	Box-B	Pós Box-B	Box-A	D4	Espaçador e V3	D5
40CP - <i>P. cf. vulgare</i>	6	59	22	17	14	74	93	73	39	36	20	12	7	80	22
41CP - <i>Phormidium</i> sp.1	7	59	21	16	12	74	-	-	76	36	18	12	7	64	21
42CP - <i>Phormidium</i> sp.2	7	62	24	17	12	74	-	-	31	36	18	12	7	61	12
43CP - <i>Phormidium</i> sp.3	7	58	21	16	12	74	-	-	88	39	18	12	7	58	18
44CP - <i>Phormidium</i> sp.4	7	58	21	16	12	74	-	-	84	40	18	12	7	62	21
45CP - <i>Phormidium</i> sp.4	7	58	21	16	12	74	-	-	84	40	18	12	7	62	21
46CP - <i>Phormidium</i> sp.4	6	58	21	16	12	74	-	-	84	40	18	12	7	62	21
48CP - <i>Phormidium</i> sp.6	6	60	22	17	12	74	61	73	54	35	19	12	7	55	23
49CP - <i>Phormidium</i> sp.7	6	59	22	17	14	74	93	73	39	36	20	12	7	80	22
51CP - <i>Phormidium</i> sp.8	7	52	31	16	10	-	-	-	100	35	16	12	7	58	23
52CP - <i>Phormidium</i> sp.9	7	52	31	16	10	-	-	-	100	35	16	12	7	58	23
54CP - <i>Planktothrix isothrix</i>	6	65	27	19	22	-	-	-	-	34	17	12	7	80	21
55CP - <i>Porphyrosiphon notarisii</i>	7	84	20	16	12	74	-	-	273	37	17	12	7	61	30
58CP - <i>P. notarisii</i>	7	78	20	16	12	74	68	73	119	36	21	12	7	61	23
59CP - <i>Porphyrosiphon</i> sp.1	7	77	21	22	6	74	-	-	292	37	20	12	7	61	16
60CP - <i>Porphyrosiphon</i> sp.2	7	91	21	16	3	-	-	-	156	37	20	12	7	61	28

x – região não identificada

4.4 Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas obtidas pelos critérios de NJ, ML e IB nas análises do RNAr 16S não foram completamente idênticas, porém apresentaram topologias semelhantes, razão pela qual as árvores de NJ e IB não foram graficamente apresentadas, sendo que somente os valores de confiança dos nós (*bootstrap* e probabilidade posterior) foram representados na árvore de ML.

A filogenia produzida (Figura 1) corrobora a ideia de que o RNAr 16S é um marcador com bom sinal filogenético para o nível de gênero e mostra que grande parte daqueles incluídos na análise é geneticamente bem delimitada, formando clados com alto suporte. A impossibilidade de identificar as relações de parentesco entre cianobactérias em uma larga escala evolutiva já foi relatada por Giovanonni et al. (1988). Segundo Honda et al. (1999) e Wilmotte & Herdman (2001), essa impossibilidade deriva da rápida diversificação das cianobactérias imediatamente após o desenvolvimento da fotossíntese oxigênica. Sugere-se que isto implica na impossibilidade de reconstrução das relações filogenéticas basais das principais linhagens de cianobactérias a partir do RNAr 16S.

As 60 sequências obtidas neste estudo integram 13 clados (Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, Grupo *Porphyrosiphon*, Grupo *Planktothricoides*, Grupo *Planktothrix*) com alto suporte, exceto a população identificada como *P. cf. uncinatum* (39CP), que se posicionou como grupo-irmão do Grupo I, porém essa relação não mostrou suporte estatístico robusto (Figura 1).

As análises filogenéticas confirmam o polifiletismo do gênero *Phormidium*, observados em outros estudos (TATON et al., 2006; PALINSKA & MARQUARDT, 2008; STRUNECKY et al., 2010, 2011, entre outros).

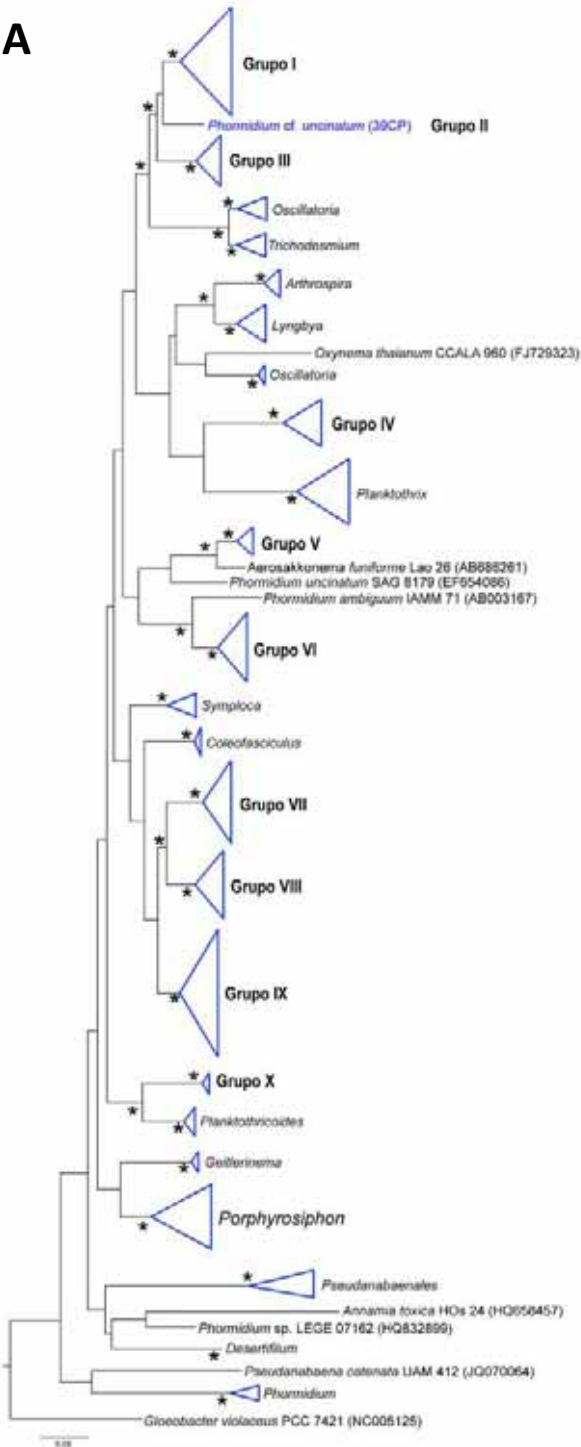
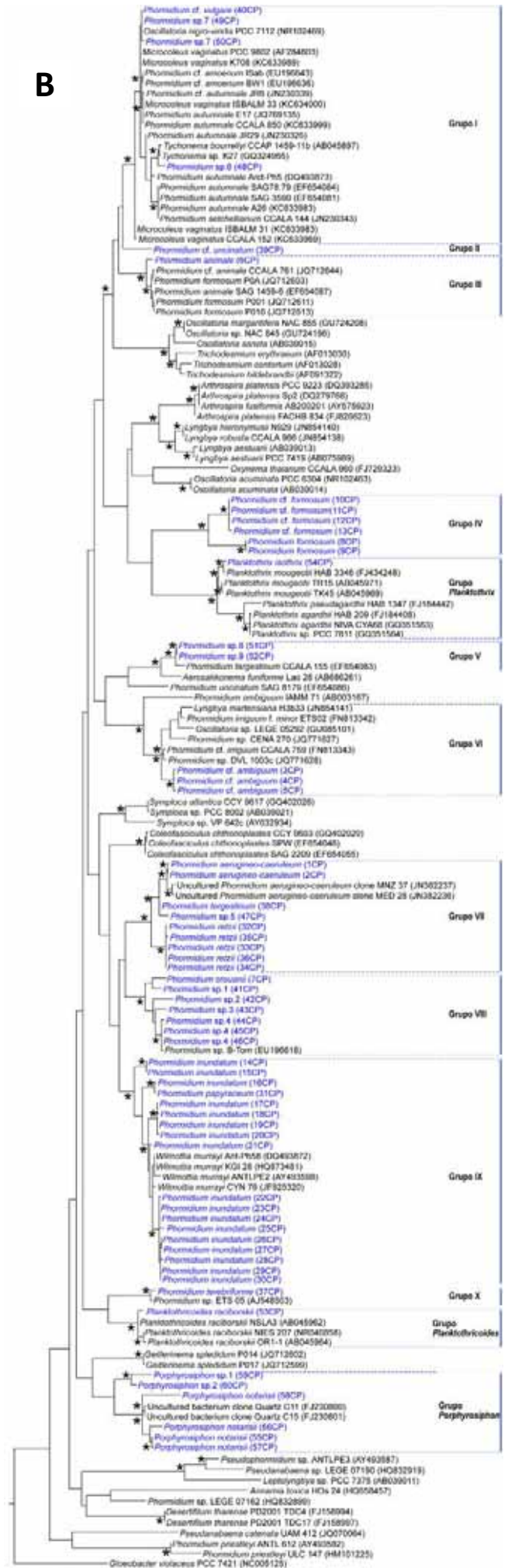
A**B**

Figura 1. Árvore consenso construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) do gene RNAr 16S de 60 linhagens sequenciadas neste estudo e 90 linhagens disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos com *. **A.** Árvore com os clados colapsados. **B.** Árvore com todas as linhagens utilizadas na análise, evidenciando os grupos formados por, pelo menos, uma sequência gerada neste estudo (em azul).

4.4.1 Grupos *Planktothrix* e *Planktothricoides*

Tanto a população identificada como *Planktothricoides raciborskii*, como a identificada como *Planktothrix isothrix* posicionaram-se nos clados constituídos por espécies dos mesmos gêneros, confirmando a identificação das populações estudadas. *Planktothricoides* e *Planktothrix* são gêneros com características morfológicas e genéticas bem definidas (SUDA et al., 2002) e, neste estudo, as linhagens pertencentes a estes gêneros formaram grupos monofiléticos com 100% de *bootstrap*.

O clado formado pelas linhagens de *Planktothrix* aproximou-se daquele formado por seis populações de *Phormidium* sequenciadas neste estudo (Grupo IV; Figura 2) e a similaridade entre estes clados variou de 88,2 a 89,7%.

As linhagens pertencentes ao grupo *Planktothrix* apresentaram sequências do RNAr 16S com similaridade variando de 95,2 a 99,9%, correspondendo a uma divergência de 1 a 64 nucleotídeos (Tabela 4). As oito linhagens organizaram-se em dois clados cuja similaridade das sequências do RNAr 16S entre os clados variou de 95,2 a 96%, correspondendo a uma divergência de 54 a 64 nucleotídeos (Tabela 4). O posicionamento próximo entre *P. isothrix* e as linhagens de *P. mougeotii* confirma a identificação da população estudada já que se tratam de espécies sinônimas e a similaridade entre suas sequências foi alta (98,4-99,7%).

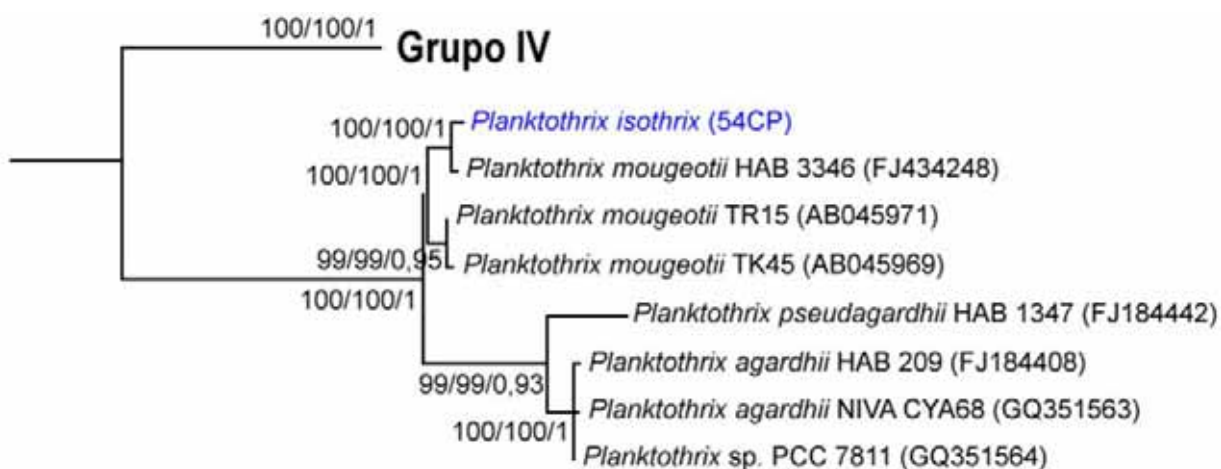


Figura 2. Detalhe do grupo de *Planktothrix* da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. A sequência gerada neste estudo está em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Tabela 4. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo *Planktothrix*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 – <i>Planktothrix isothrix</i> - 54CP	ID	99,7	98,4	98,4	95,3	95,4	95,5	95,5
2 – <i>Planktothrix mougeotii</i> HAB 3346	3	ID	98,5	98,5	95,4	95,5	95,6	95,5
3 – <i>Planktothrix mougeotii</i> TR 15	21	20	ID	99,7	95,2	95,8	95,9	95,8
4 – <i>Planktothrix mougeotii</i> TK 45	21	20	3	ID	95,3	9,58	96	95,9
5 – <i>Planktothrix pseudagardhii</i> HAB 1347	63	62	64	63	ID	97,4	97,3	97,4
6 – <i>Planktothrix agardhii</i> HAB 209	62	61	57	56	35	ID	99,8	99,9
7 – <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA CYA68	60	59	55	54	36	2	ID	99,9
8 – <i>Planktothrix</i> sp. PCC 7811	61	60	56	55	35	1	1	ID

O ITS 16S-23S da linhagem deste grupo sequenciado neste estudo apresentou 311 pares de bases. Das oito linhagens do clado *Planktothrix*, além da sequenciada neste estudo, apenas duas possuem sequências disponíveis do ITS 16S-23S, sendo elas *Planktothrix agardhii* NIVA CYA68 e *Planktothrix* sp. PCC 7811. Em nenhum dos casos foi observada a presença dos RNAs transportadores, o rRNA^{Ile} e/ou o rRNA^{Ala}. As regiões D1-D1' e V3 da espécie estudada foi distinta das demais (*Planktothrix agardhii* NIVA CYA68 e *Planktothrix* sp. PCC 7811), sendo que entre as duas estas regiões foram idênticas (Figura 3A e C). Diferentemente, a região Box-B apresentou variação nas três linhagens, embora, entre *Planktothrix agardhii* NIVA CYA68 e *Planktothrix* sp. PCC 7811, essa variação seja muito pequena (Figura 3B).

O grupo *Planktothrix*, as estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 corroboraram a organização do clado. Infelizmente as linhagens que se agruparam com a linhagem deste estudo não apresentam ITS 16S-23S disponíveis para comparações. No entanto, entre as linhagens analisadas, as diferenças das estruturas das regiões indicam que as linhagens correspondem a duas espécies distintas, uma é *P. isothrix* e a outra *P. agardhii* NIVA CYA 68 e *Planktothrix* sp. PCC7811.

O clado constituído pelas linhagens de *Planktothricoides* mostrou-se como grupo irmão do Grupo X, embora essa relação não tenha suporte (Figura 4). A similaridade das sequências do RNAr 16S entre os grupos X e *Planktothricoides* variou de 91,9 a 93% e entre as linhagens de *Planktothricoides*, variou de 98,6 a 99,4%, correspondendo a uma divergência de 7 a 19 nucleotídeos.



Figura 4. Detalhe do clado de *Planktothricoides* da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. A sequência gerada neste estudo está em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Esta é a primeira sequência de *Planktothricoides raciborskii* do Brasil e sua proximidade com linhagens da Austrália (*P. raciborskii* NSLA3), do Japão (*P. raciborskii* NIES 207) e da Tailândia (*P. raciborskii* OR1-1), indicando a amplitude geográfica onde se encontra a espécie.

4.4.2 Grupo *Porphyrosiphon*

Provavelmente devido à grande dificuldade de cultivo, até o presente momento não existem sequências publicadas de RNAr 16S para o gênero *Porphyrosiphon*, sendo este trabalho o primeiro a relatar a filogenia baseada em dados moleculares para este gênero. As linhagens

do gênero *Porphyrosiphon* agruparam-se com duas linhagens de bactérias não cultivadas da Austrália (Figura 5).

As linhagens que constituem este grupo são provenientes de ambientes aerofíticos (solo) de diferentes regiões do Brasil (Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo) e do norte da Austrália. A similaridade entre as sequências do RNAr 16S das linhagens integrantes do grupo é superior a 93,5% (Tabela 5) e a similaridade com a linhagem mais próxima é inferior a 92%.

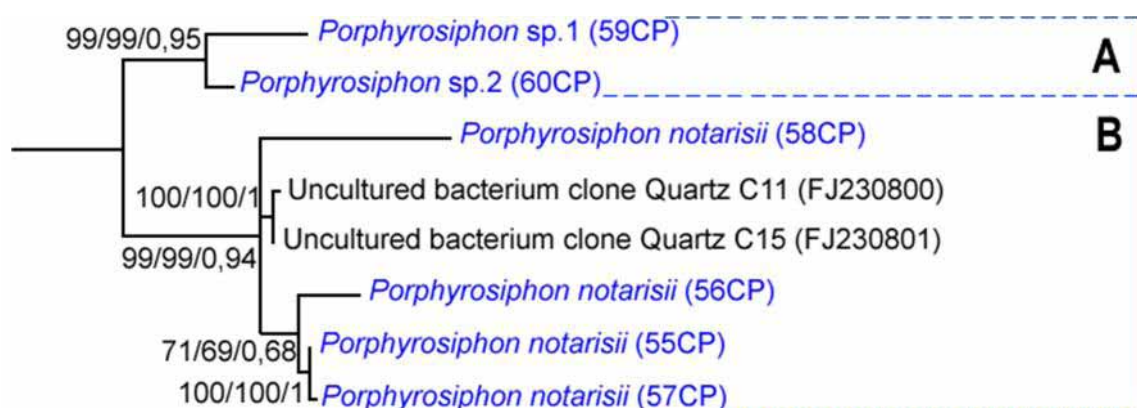


Figura 5. Detalhe do grupo *Porphyrosiphon* da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

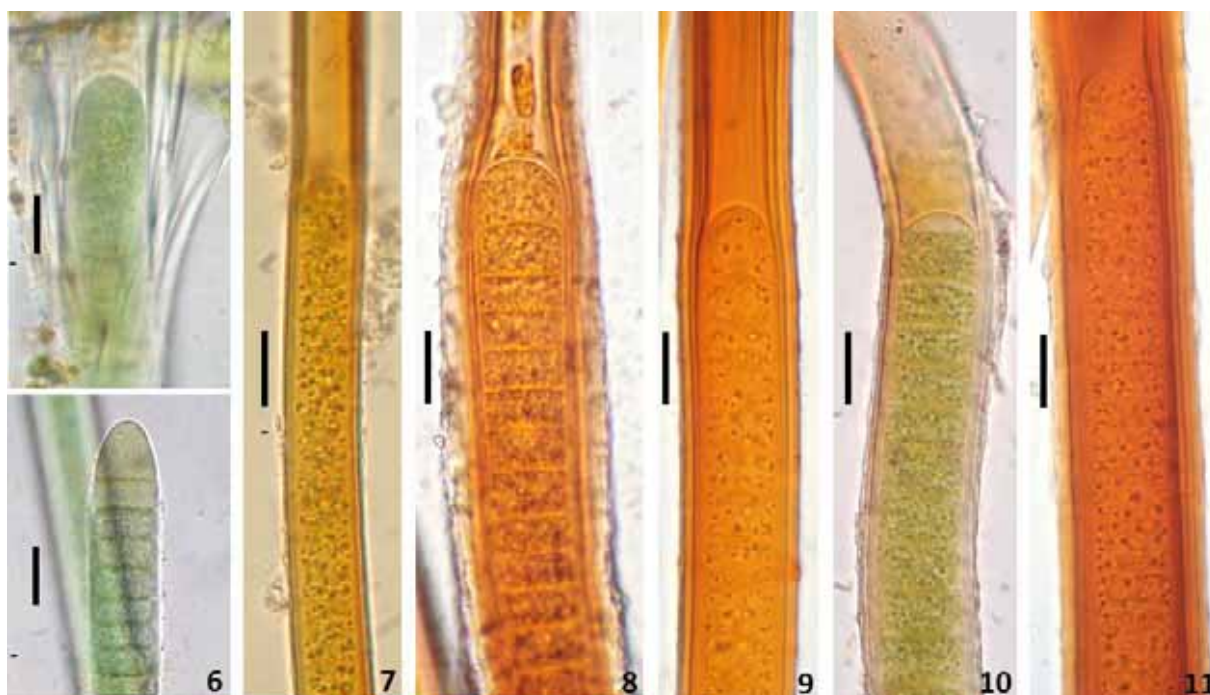
Tabela 5. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo *Porphyrosiphon*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>Porphyrosiphon</i> sp.1 59CP	ID	98	94,2	94,2	94,7	94,7	95,6	94,7
2- <i>Porphyrosiphon</i> sp.2 60CP	29	ID	93,5	94,8	95,2	94,7	95,5	94,8
3- <i>P. notarisii</i> 58CP	83	94	ID	95	95,7	94,9	96,1	96
4- Uncultured bacterium clone Quartz C11	84	75	72	ID	98,9	96,7	97	97,1
5- Uncultured bacterium clone Quartz C15	77	69	62	16	ID	97,4	97,8	97,9
6- <i>P. notarisii</i> 56CP	77	76	74	47	37	ID	98,1	98,1
7- <i>P. notarisii</i> 55CP	64	65	56	43	32	27	ID	98,7
8- <i>P. notarisii</i> 57CP	76	75	57	41	30	27	18	ID

O grupo é composto por dois clados internos, ambos com alto suporte (Figura 5). O subgrupo A, composto pelas linhagens *Porphyrosiphon* sp.1 e *Porphyrosiphon* sp.2, apresentou 98% de similaridade no RNAr 16S e, embora a similaridade seja alta, são morfologicamente

distintas, podendo ser diferenciadas pela coloração da bainha mucilaginosa e dimensões celulares (Figuras 6 e 7).

O subgrupo B é composto por seis linhagens, quatro identificadas como *Porphyrosiphon notarisii* e duas de bactérias não cultivadas. As sequências do RNAr 16S apresentaram uma variabilidade razoável (94,9 - 98,9%), diferentemente do observado nos estudos morfológicos, onde as características morfométricas mostraram-se pouco variáveis (Figuras 8-11).



Figuras 6-11. 6. *Porphyrosiphon* sp.1 59CP; 7. *Porphyrosiphon* sp.2 60CP; 8. *P. notarisii* 55CP; 9. *P. notarisii* 56CP; 10. *P. notarisii* 57CP; 11. *P. notarisii* 58CP. (Escala = 10 µm)

Embora as seis linhagens apresentem características morfológicas similares, correspondentes às descritas para representantes de *Porphyrosiphon*, a alta similaridade entre as sequências do RNAr 16S nas linhagens *Porphyrosiphon* sp.1 e *Porphyrosiphon* sp.2, bem como o alto suporte do clado formado por estas, indicam que são geneticamente distintos do outro clado e, provavelmente, um gênero distinto, já que a similaridade com as linhagens do outro clado mostrou-se relativamente baixa (93,5-95,6% - Tabela 5).

Das oito linhagens integrantes do grupo, apenas quatro possuem sequências do ITS 16S-23S, todas elas obtidas no presente estudo, cujos comprimentos variaram de 459 a 652 pares de

bases. O grupo mostrou-se variado quanto à presença dos RNAs transportadores. *Porphyropsiphon* sp.2 não apresentou RNA transportador, *Porphyrosiphon* sp.1 e *P. notarisii* 55CP apresentaram apenas o RNAt^{Ile}, enquanto que *P. notarisii* 58CP apresentou os dois RNAs transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}).

As estruturas secundárias da região D1-D1' das quatro linhagens mostraram-se bastante variadas. Já as regiões Box-B e V3 apresentaram estruturas secundárias similares entre as linhagens de *Porphyrosiphon* sp.1 e *Porphyrosiphon* sp.2 (Figura 12). Resultado não esperado por tratarem-se de espécies distintas.

Diferentemente, as linhagens *Porphyrosiphon notarisii* 55CP e *P. notarisii* 58CP, apresentaram regiões Box-B e V3 com estruturas primárias e secundárias distintas (Figura 12).

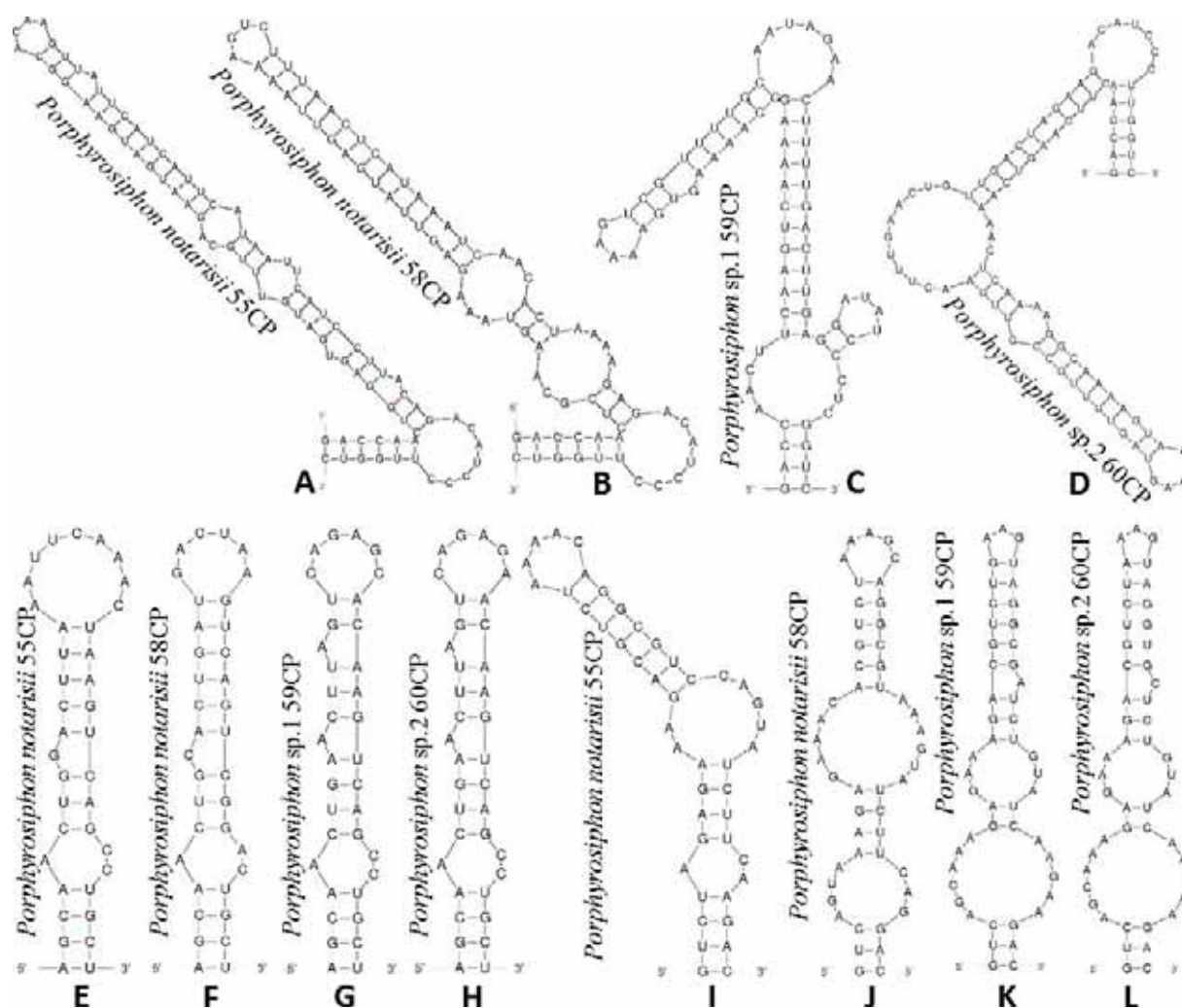


Figura 12. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Porphyrosiphon*. A-D. Região D1-D1'; E-H. Região Box-B; I-L. Região V3.

4.4.3 Grupos I e II

O grupo I, que contém quatro linhagens deste estudo juntamente com outras 19 do banco de dados (Figura 13), compreendendo os gêneros *Microcoleus*, *Phormidium*, *Tychonema* e *Oscillatoria*, apresentou alto suporte para todas as análises filogenéticas realizadas (99%-ML, 99%-NJ e 0,97-IB). Este grupo contém linhagens provenientes dos mais diversos ambientes aquáticos e aerofíticos de localidades europeias, africanas, asiáticas, norte-americanas e sul-americanas. Este grupo corresponde ao gênero *Microcoleus sensu stricto*, de acordo com os estudos de Strunecky et al. (2013). Segundo Boyer et al. (2002), Siegesmund et al. (2008), Strunecky et al. (2010, 2012) e Hasler et al. (2012), *P. autumnale sensu lato* e *Microcoleus*

vaginatus são filogeneticamente próximos e a diferença morfológica entre eles é a forma de organização dos filamentos. Strunecky et al. (2013) transferiu algumas espécies *P. autumnale* *sensu lato* para o gênero *Microcoleus*. Nossos resultados indicam que, assim como essas espécies, as linhagens identificadas como *Phormidium* cf. *vulgare*, *Phormidium* sp.7 e *Phormidium* sp.9 também pertencem ao gênero *Microcoleus*.

Todas as linhagens do grupo I apresentaram, pelo menos 96,5% de similaridade (até 54 nucleotídeos divergentes).

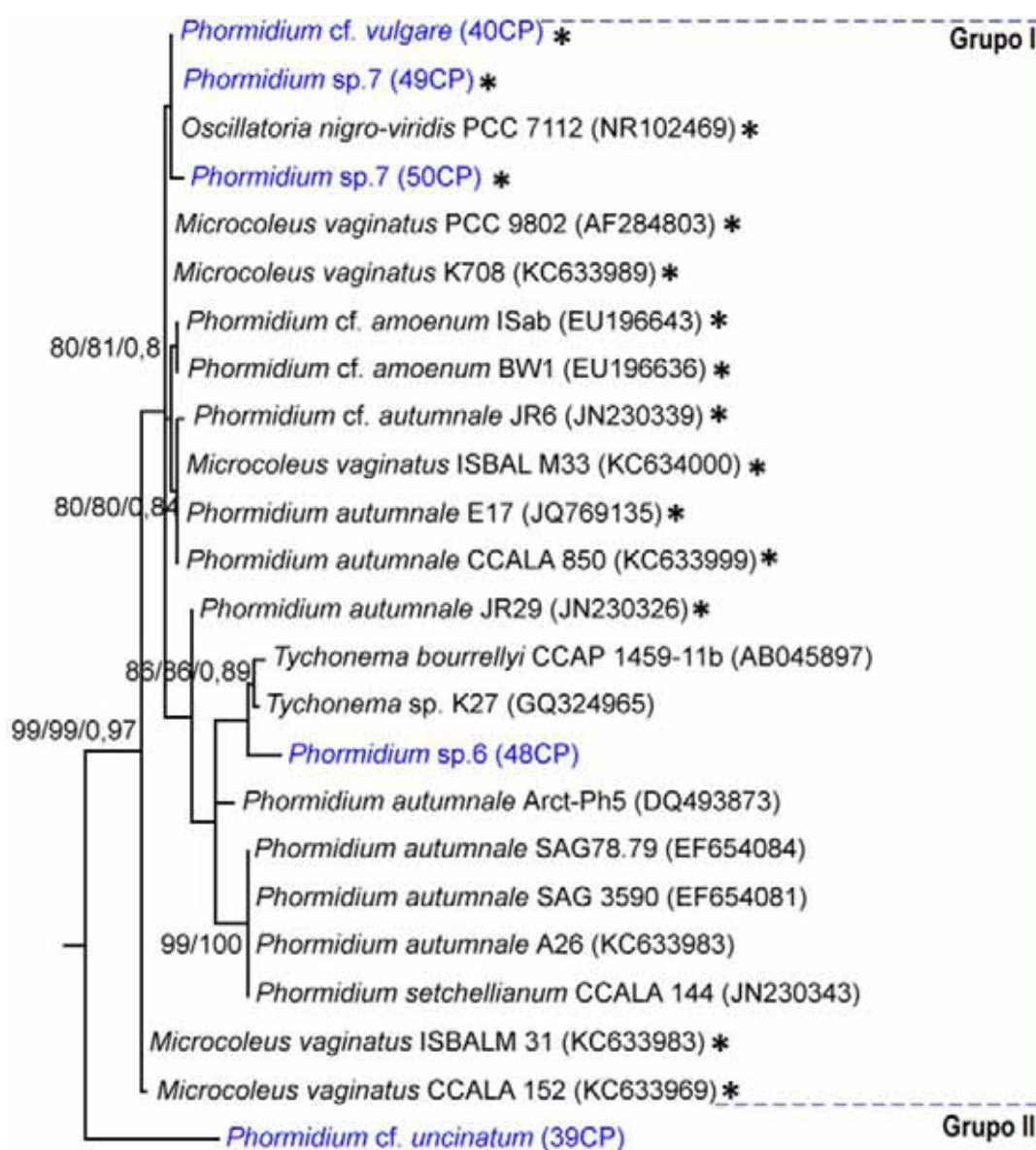


Figura 13. Detalhe dos grupos I e II da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos. * indica as linhagens que apresentam a inserção de 11 nucleotídeos na região da hélice H17 do gene RNAr 16S.

O grupo II é constituído por apenas uma linhagem (*Phormidium* cf. *uncinatum*) (Figura 13). A similaridade entre *P.* cf. *uncinatum* e as linhagens do grupo I variou de 92,5 a 96,8% (de 40 a 109 nucleotídeos divergentes). A morfologia observada é similar às linhagens brasileiras do grupo I (Figuras 14-17), com tricomas atenuados e curvos no ápice e célula apical com caliptra e, em alguns caso, a similaridade entre a sua sequência de RNAr 16S e as de algumas linhagens do grupo I foi maior que a similaridade dos representantes do grupo I entre si.



Figuras 14-17. 14. *Phormidium* cf. *vulgare*; 15. *Phormidium* sp.7; 16. *Phormidium* sp.6; 17. *P.* cf. *uncinatum*. (Escala = 10 μ m)

A disposição das linhagens no Grupo I demonstra que a identificação das espécies pertencentes a este grupo não pode ser feita apenas por meio da diferenciação de características morfológicas ou ecológicas. O hábito terrestre de *Microcoleus vaginatus* e o hábito aquático de *Phormidium autumnale* não são congruentes com a filogenia construída pelo RNAr 16S, sendo a plasticidade fenotípica reportada para cianobactérias refletida em sua filogenia.

Uma importante característica deste grupo, relatada por Garcia-Pichel et al. (2001), Boyer et al. (2002), Hasler et al. (2012) e Strunecky et al. (2013), é a inserção de 11 nucleotídeos na região da hélice H17 do gene RNAr 16S. Essa inserção foi encontrada em 15 das 23 linhagens do clado e não mostrou-se congruente com a filogenia construída (Figura 13).

Das linhagens integrantes dos grupos I e II, 12 possuem sequências do ITS 16S-23S, sendo quatro delas sequenciadas no presente estudo (Tabela 3). Dentre as sequências disponíveis no *GenBank*, cinco foram parcialmente sequenciadas, não apresentando a porção final do espaçador, que corresponde às regiões Box-B, Box-A, D4, V3 e D5.

Todas as linhagens do grupo I e grupo II apresentaram os dois RNAs transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}). A região V2, situada entre os dois RNAs transportadores mostrou-se pouco variável quanto à composição e comprimento (entre 93 e 104 pares de bases), exceto nas linhagens *Phormidium* sp.7 49CP (Grupo I) e *Phormidium* cf. *uncinatum* (Grupo II), cuja região apresentou menor comprimento (61 e 24 pares de bases, respectivamente).

Embora a região D1-D1' tenha apresentado variação quanto à composição e à estrutura secundária, esta mostrou-se congruente com a organização dos cladogramas internos do grupo I. As linhagens *Phormidium* sp.7 49CP e *P.* cf. *vulgare* 40CP apresentaram mesma estrutura secundária (Figura 18: A e B), bem como *Microcoleus vaginatus* ISBAL M33, *P. autumnale* E17 e CCALA 850 (Figura 18: C-E), *P. autumnale* A26 e *P. setchellianum* CCALA 144 (Figura 18: F e G), *M. vaginatus* ISBAL M31 e CCALA 152 (Figura 18: H e I). A linhagem *P.* cf. *uncinatum* 39CP apresentou estrutura secundária da região D1-D1' bem diferente das demais linhagens do grupo I (Figura 18: L).

Da mesma forma, a estrutura secundária da região Box-B das linhagens do grupo I também mostrou-se congruente com a organização interna dos cladogramas. *Phormidium* sp.7 49CP e *P.* cf. *vulgare* 40CP apresentaram mesma estrutura secundária (Figura 19: A e B), bem como *P. autumnale* A26 e *P. setchellianum* CCALA 144 (Figura 19: C e D). Assim como a região

D1-D1', a região Box-B de *P. autumnale* JR29 e *Phormidium* sp.6 (48CP) apresentaram estrutura secundária levemente distintas (Figura 19: E e F) e a linhagem *P. cf. uncinatum* (39CP) apresentou a região com estrutura secundária mais diferenciada (Figura 19: G).

O mesmo padrão observado nas regiões D1-D1' e Box-B foram observados na região V3, que mostrou semelhanças entre as mesmas linhagens acima citadas, inclusive com a linhagem *Phormidium cf. uncinatum* (39CP) sendo a mais diferenciada (Figura 19).

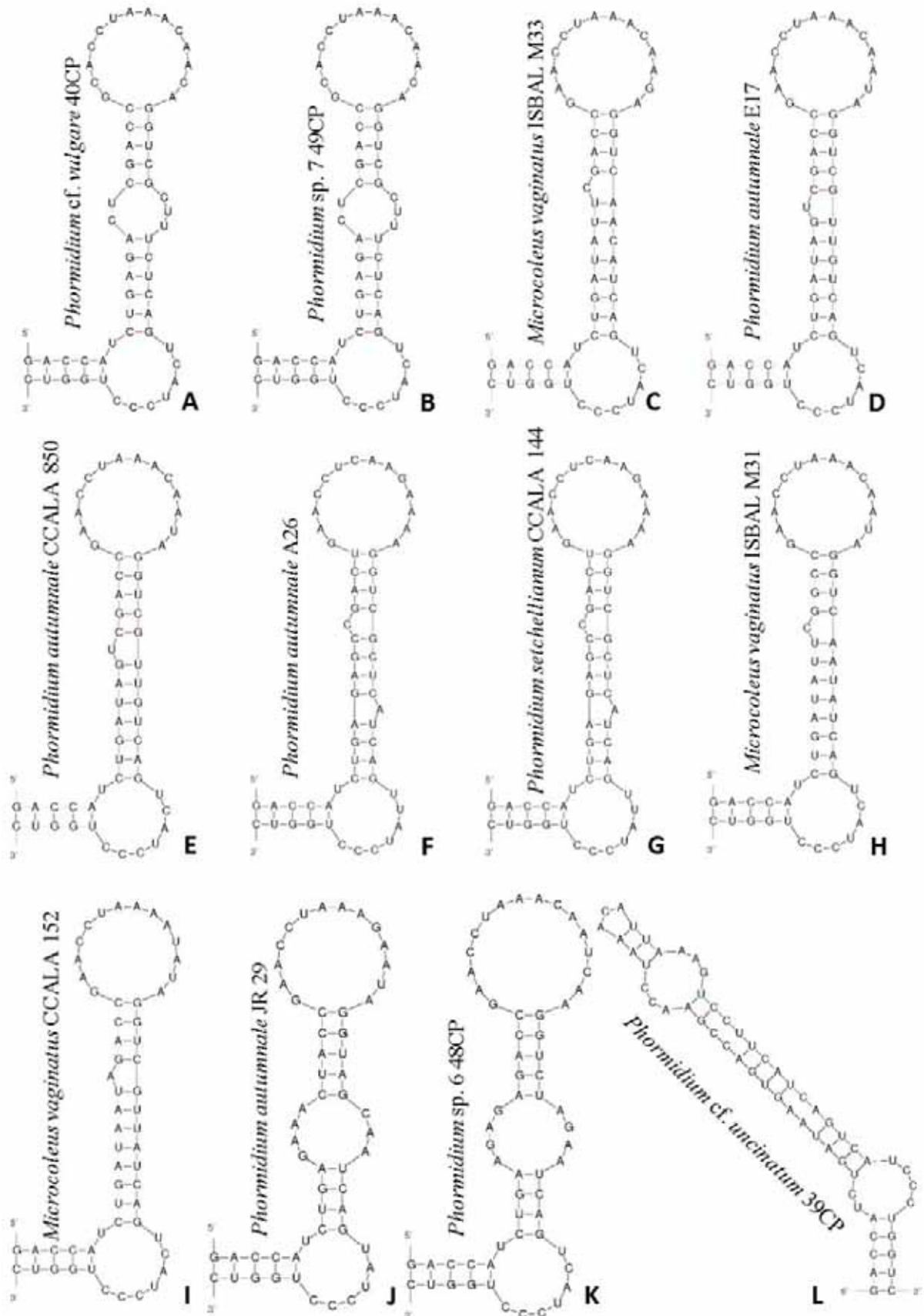


Figura 18. Estruturas secundárias da região D1-D1' das linhagens de *Phormidium* e *Microcoleus* dos grupos I e II. **A-K.** Grupo I; **L.** Grupo II.

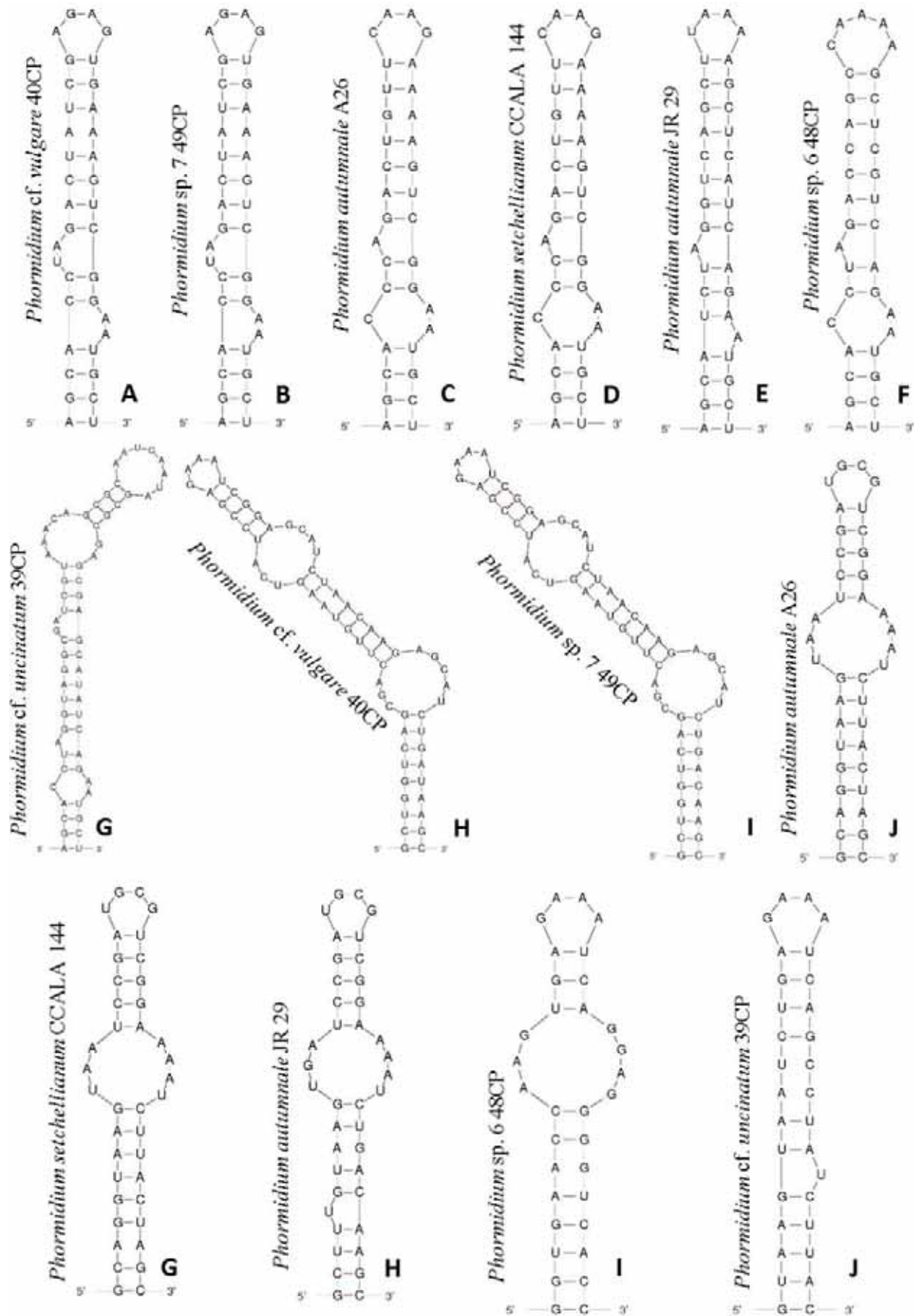


Figura 19. Estruturas secundárias das regiões Box-B e V3 das linhagens de *Phormidium* e *Microcoleus* dos grupos I e II. **A-G.** Região Box-B; **H-J.** Região V3.

4.4.4 Grupo III

O grupo III, composto por seis linhagens, das quais uma foi sequenciada neste estudo (*Phormidium animale* 6CP), apresentou suporte máximo em todas as análises (100%-ML, 100%-NJ, 1-IB, Figura 20) e mostrou-se bem separado das demais linhagens incluídas na análise do RNAr 16S, com similaridade inferior a 95%. Entre as linhagens do grupo III a similaridade do RNAr 16S variou entre 98 e 99,6%, valores que correspondem a uma divergência de 4 a 21 nucleotídeos (Tabela 6).

Devido ao alto suporte do grupo III e à baixa similaridade com os demais grupos incluídos na análise, o grupo pode ser designado como um gênero separado.

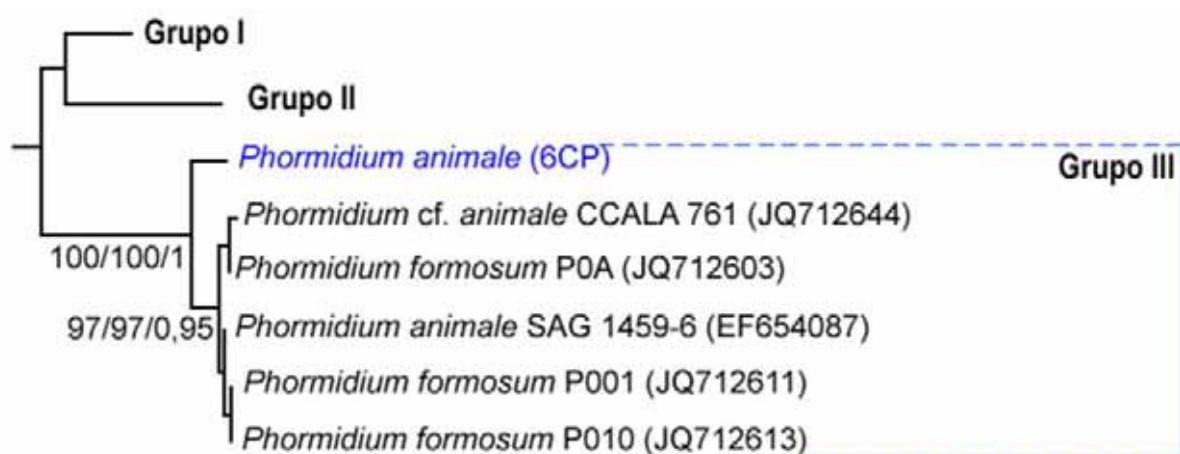


Figura 20. Detalhe do grupo III da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. A sequência gerada neste estudo está em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Tabela 6 Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo III.

	1	2	3	4	5	6
1- <i>Phormidium animale</i> (6CP)	ID	98,5	98,1	98,5	98	98,3
2- <i>P. cf. animale</i> CCALA 761	16	ID	99,2	99,6	99,1	99,4
3- <i>P. formosum</i> P0A	20	8	ID	99,2	99	99,2
4- <i>P. animale</i> SAG 1459-6	21	4	8	ID	99,3	99,6
5- <i>P. formosum</i> P001	21	9	10	7	ID	99,5
6- <i>P. formosum</i> P010	18	6	8	4	5	ID

A disposição das linhagens no clado indica que a identificação das espécies não pode ser feita com base no RNAr 16S.

Todas as linhagens pertencentes a este grupo apresentam morfologia similar entre si, que é distinta da apresentada pelo *Phormidium* típico (*P. lucidum* Kützinger ex Gomont) ou pelo *Microcoleus* típico (*M. vaginatus* (Vaucher) Gomont). Os filamentos são solitários, frequentemente crescendo sem bainha mucilaginosa, os tricomas são cilíndricos com ápices levemente atenuados e curvos, com células apicais geralmente cônico-arredondadas, e as células intercalares são isodiamétricas ou levemente mais longas ou mais curtas que largas.

As duas espécies que compõem o grupo III são conhecidas por ocorrer principalmente em água doce. As linhagens *P. formosum* P0A, P001 e P010 foram coletadas em pesqueiros eutróficos na República Checa, a linhagem *P. cf. animale* CCALA 761 foi coletada em um tanque de cultivo de *Elodea canadensis* e a linhagem sequenciada neste estudo, *P. animale* (6CP), foi coletada em solo úmido nas margens do rio Ibirapuitã no Rio Grande do Sul, indicando a ampla distribuição desse grupo.

Das seis linhagens integrantes do grupo III, cinco possuem o ITS 16S-23S sequenciados, incluindo a linhagem estudada, cujos comprimentos variaram de 601 a 636 pares de bases. Todas as linhagens do grupo apresentaram os dois RNAs transportadores (RNA^{Ile} e RNA^{Ala}) e a região V2, situada entre os dois RNA^t, foi pouco variável quanto ao comprimento (entre 82 e 84 pares de bases) e à estrutura secundária.

As estruturas secundárias das regiões D1-D1' e Box-B mostraram-se conservadas em todas as linhagens, com uma leve diferença na linhagem sequenciada no presente estudo (Figura 21). A região V3 mostrou variação um pouco maior, com três configurações distintas (Figura 21).

Estes resultados corroboram a filogenia construída com base no RNAr 16S e sugerem que o clado é composto por duas espécies, no qual todas as linhagens do *GenBank* correspondem a uma espécie e a linhagem deste estudo correspondem à outra.

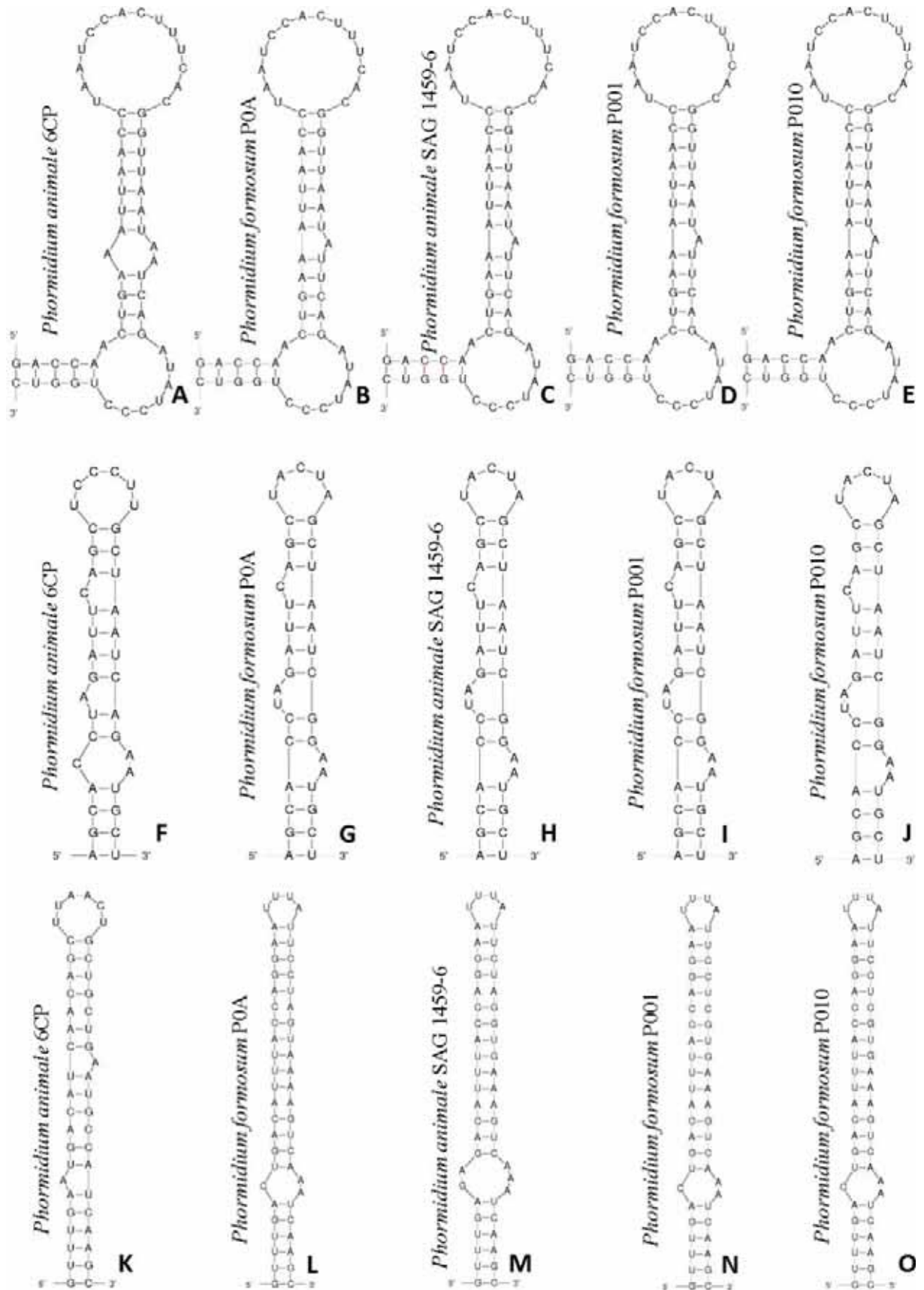


Figura 21. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo III. A-E. Região D1-D1'; F-J. Região Box-B; K-O. Região V3.

4.4.5 Grupo IV

O grupo é composto por seis linhagens, todas brasileiras e sequenciadas neste estudo (Figura 22). É formado pelas linhagens identificadas como *Phormidium formosum* e *P. cf. formosum* e, diferentemente do esperado, ficou separado das linhagens identificadas como *P. formosum* disponíveis no *GenBank*.



Figura 22. Detalhe do grupo IV da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

A similaridade entre as populações de *P. formosum* (ou *P. cf. formosum*) do grupo IV e as disponíveis no *GenBank* é inferior a 91% (Tabela 2), sendo *P. animale* SAG 1459-6 (grupo III) a que apresenta a sequência do RNAr 16S mais similar aos exemplares do grupo.

As análises do RNAr 16S mostraram que o grupo IV é um grupo coeso, sustentado por alto suporte estatístico (100%-ML, 100%-NJ, 1-IB). A similaridade deste gene entre as linhagens foi superior a 95,5% (até 65 nucleotídeos divergentes) e as populações identificadas como *Phormidium cf. formosum* 10CP e 11CP apresentaram sequências idênticas (Tabela 7).

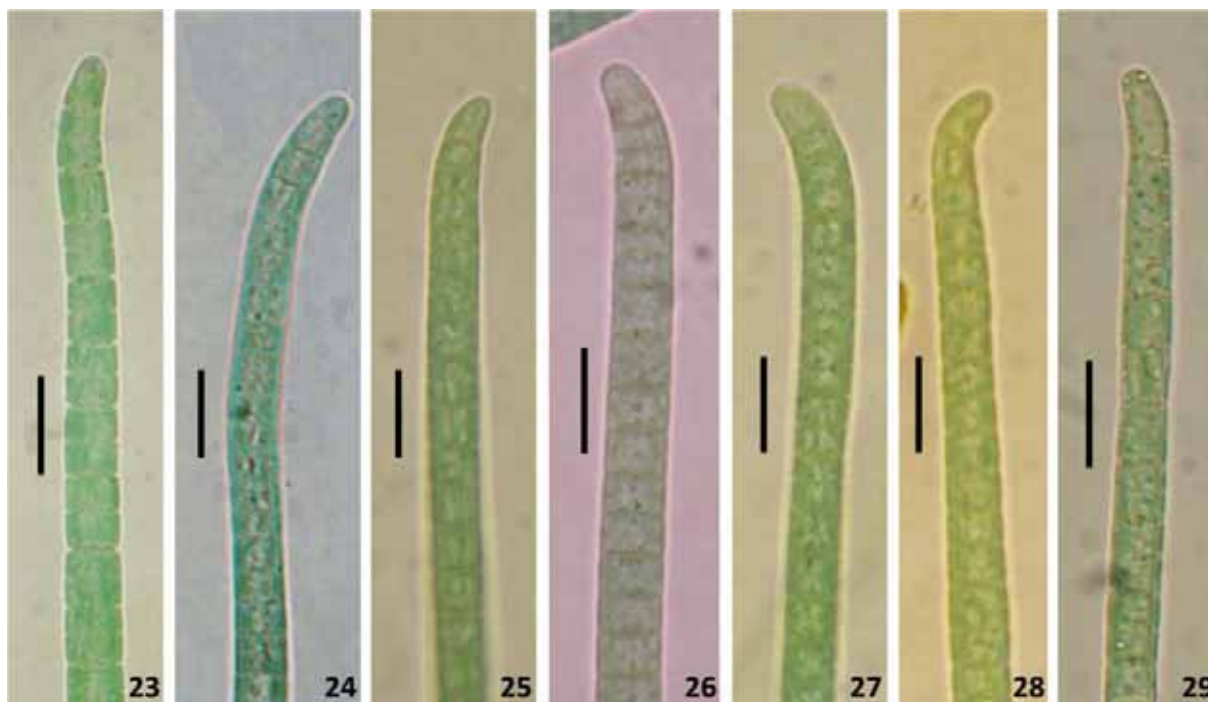
Embora a similaridade do gene entre as linhagens do grupo IV e a linhagem *Phormidium animale* SAG 1459-6 seja maior (Tabela 2), os grupos III e IV posicionaram-se distantes entre si nas três análises filogenéticas e o grupo *Planktothrix* posicionou-se como grupo-irmão do grupo IV (ramo sem suporte estatístico – Figura 22), com similaridade inferior a 89,7%.

Tabela 7. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo IV.

	1	2	3	4	5	6
1 – <i>Phormidium formosum</i> (8CP)	ID	99,7	96	96	95,8	95,6
2 – <i>Phormidium formosum</i> (9CP)	3	ID	95,9	95,9	95,7	95,5
3 – <i>Phormidium cf. formosum</i> (10CP)	58	59	ID	100	99,7	99,3
4 – <i>Phormidium cf. formosum</i> (11CP)	58	59	0	ID	99,7	99,3
5 – <i>Phormidium cf. formosum</i> (12CP)	61	62	3	3	ID	99,2
6 – <i>Phormidium cf. formosum</i> (13CP)	64	65	10	10	11	ID

O grupo é composto por dois clados internos, ambos com alto suporte (Figura 22) e cuja similaridade do RNAr 16S variou de 95,5 a 96%, correspondendo a uma divergência de 58 a 65 nucleotídeos entre os dois clados e de 99,7 a 100% (0 a 11 nucleotídeos divergentes) dentro dos clados (Tabela 7). Essa separação coincide com as características ecológicas das linhagens de cada clado, onde o grupo composto por duas populações de *Phormidium formosum* é aquático e o grupo formado por quatro populações identificadas como *P. cf. formosum* é aerofítico. Essa separação indica que as populações aquáticas e aerofíticas são espécies distintas, embora apresentem características morfológicas similares.

Morfologicamente, o grupo é bastante constante e distinto do *Phormidium* típico (*P. lucidum* Kützing ex Gomont). Os filamentos formam massas de tricomas emaranhados, frequentemente crescendo sem bainha mucilagínosa, tricomas cilíndricos, atenuados e curvos no ápice e células apicais cônico-arredondadas, as células são isodiamétricas ou levemente mais longas ou mais curtas que largas. (Figuras 23-28). A morfologia exibida pelos membros do grupo III e do grupo IV é similar (Figuras 23-29), no entanto os grupos podem ser diferenciados pela forma de atenuação dos tricomas, que acontece gradualmente em direção ao ápice no grupo III e apenas na porção final do tricoma no grupo IV.



Figuras 23-29. 23-28. Linhagens de *Phormidium* do grupo IV; 23. *Phormidium formosum* 8CP; 24. *P. formosum* 9CP; 25. *P. cf. formosum* 10CP; 26. *P. cf. formosum* 11CP; 27. *P. cf. formosum* 12CP; 28. *P. cf. formosum* 13CP; 29. Linhagem de *Phormidium* do grupo III; *P. animale* 6CP. (Escala: 10 µm).

Todas as linhagens integrantes do grupo IV tiveram seus espaçadores intergênicos 16S-23S sequenciados, cujos comprimentos variaram de 364 a 516 pares de bases. Três linhagens apresentaram os dois RNA transportadores (RNA^{t^{Ile}} e RNA^{t^{Ala}}) (*Phormidium formosum* 8CP, 9CP e *P. cf. formosum* 10CP) e três apresentaram apenas o RNA^{t^{Ile}} (*P. cf. formosum* 11CP, 12CP e 13CP).

A estrutura secundária da região D1-D1' mostrou-se conservada nas linhagens de *Phormidium formosum* e variável entre as linhagens de *P. cf. formosum* (Figura 30: A-F). O mesmo foi observado nas regiões Box-B (Figura 30: G-L) e V3 (Figura 30: M-R). A linhagem *P. cf. formosum* (12CP) exibiu as regiões D1-D1' e Box-B mais distintas e *P. cf. formosum* (11CP) apresentou estrutura secundária da região V3 distinta das demais linhagens do grupo. Tais resultados sugerem que o clado formado pelas linhagens aerofíticas (*P. cf. formosum*

10CP, 11CP, 12CP e 13CP) é composto por três espécies: 1 - *P. cf. formosum* 10CP e 11CP; 2 - *P. cf. formosum* 12CP e 3 - *P. cf. formosum* 13CP.

O alto suporte do clado, bem como a alta similaridade entre as sequências do RNAr 16S do grupo, a distância genética das demais linhagens disponíveis no *GenBank* e a morfologia bem definida do grupo indicam que este é um gênero novo para a ciência.

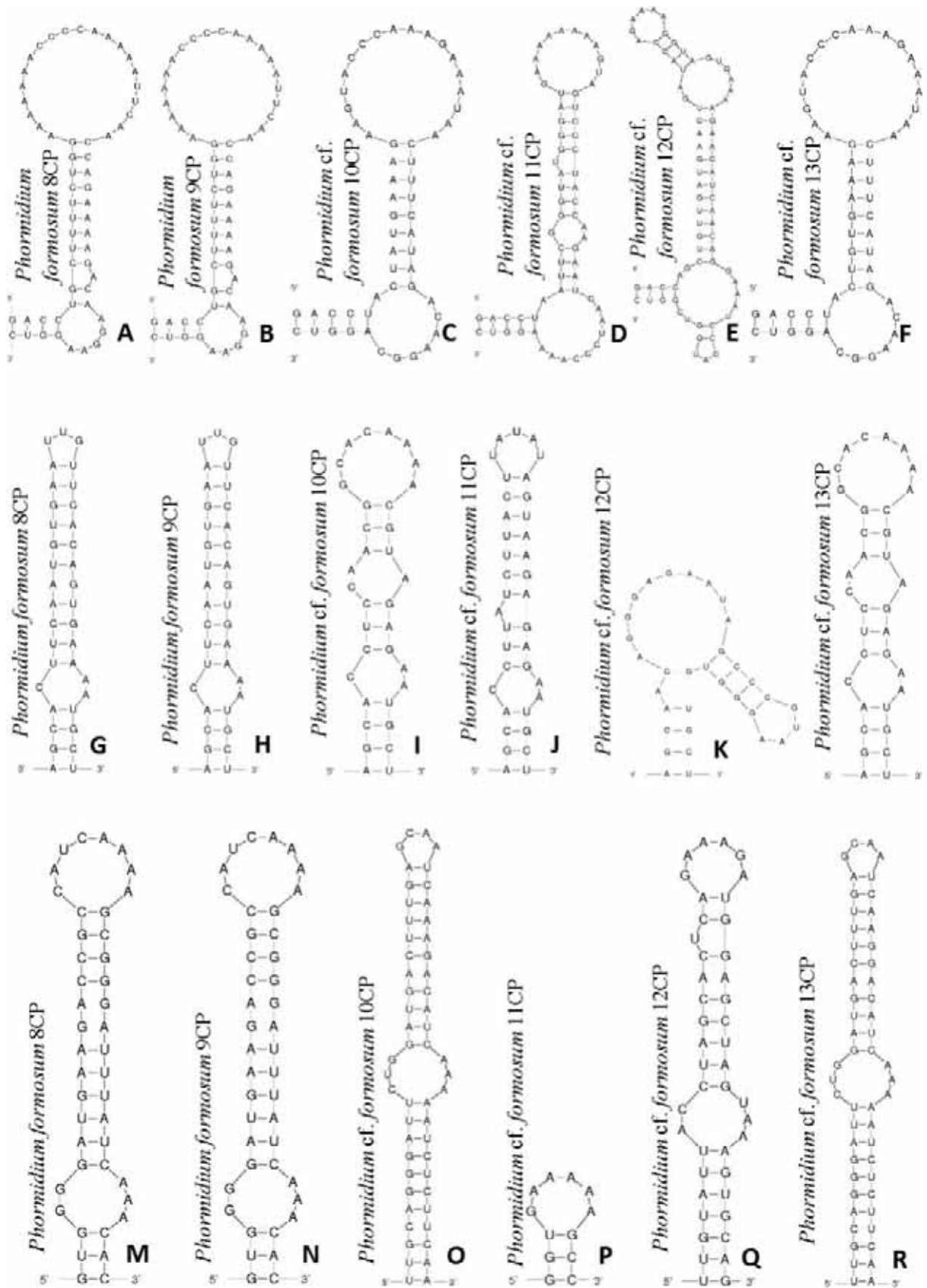


Figura 30. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo IV A-F. Região D1-D1'; G-L. Região Box-B; M-R. Região V3.

4.4.6 Grupo V

As duas populações pertencentes ao grupo V, *Phormidium* sp.8 (51CP) e *Phormidium* sp.9 (52CP), apresentaram sequências de RNAr 16S idênticas. Essas duas linhagens provêm de ambientes aerofíticos, sendo uma de região subtropical (51CP) e a outra de região tropical (52CP) do Brasil. Ambas agruparam-se com *P. tergestinum* CCALA 155 (Figura 31). As três linhagens são morfológicamente semelhantes, apresentando tricomas cilíndricos e células distintamente mais curtas que largas (Figuras 32 e 33) e a similaridade entre as linhagens brasileiras e *Phormidium tergestinum* CCALA 155 é de 97,9% (28 nucleotídeos divergentes).

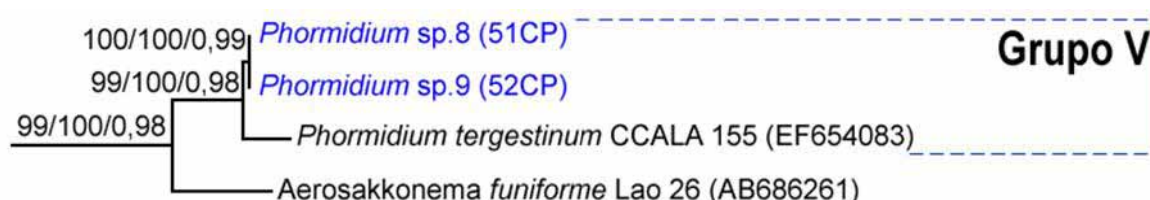
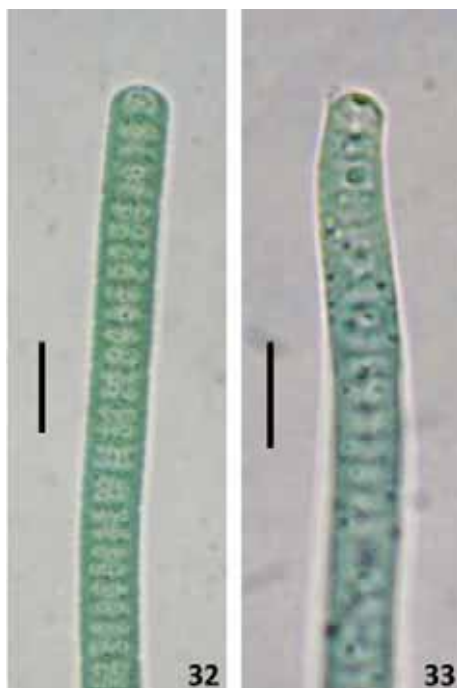


Figura 31. Detalhe do grupo V da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

As sequências do ITS 16S-23S das três linhagens do grupo V variaram de 441 a 453 pares de bases e apenas *P. tergestinum* CCALA 155 possui RNAt^{lle}.

As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 mostraram-se conservadas nas populações brasileiras, porém distintas de *P. tergestinum* CCALA 155 (Figura 34).

As análises do RNAr 16S e do ITS 16S-23S indicam que o grupo é composto por apenas duas espécies, uma delas *P. tergestinum* CCALA 155 e a outra, representada pelas duas linhagens brasileiras. Entretanto, este resultado não era esperado, já que estas são morfológicamente distintas (Figuras 32 e 33).



Figuras 32-33. 32. *Phormidium* sp.8 51CP; 33. *Phormidium* sp.9 52CP. (Escala: 10 μ m)

O alto suporte do grupo, a alta similaridade morfológica e das sequências do RNAr 16S, bem como a grande distância genética (94,1% de similaridade) do grupo mais próximo (*Aerosakkonema funiforme* Lao 26) indicam que o grupo V é um grupo geneticamente distinto dos demais e provável gênero novo para a ciência.

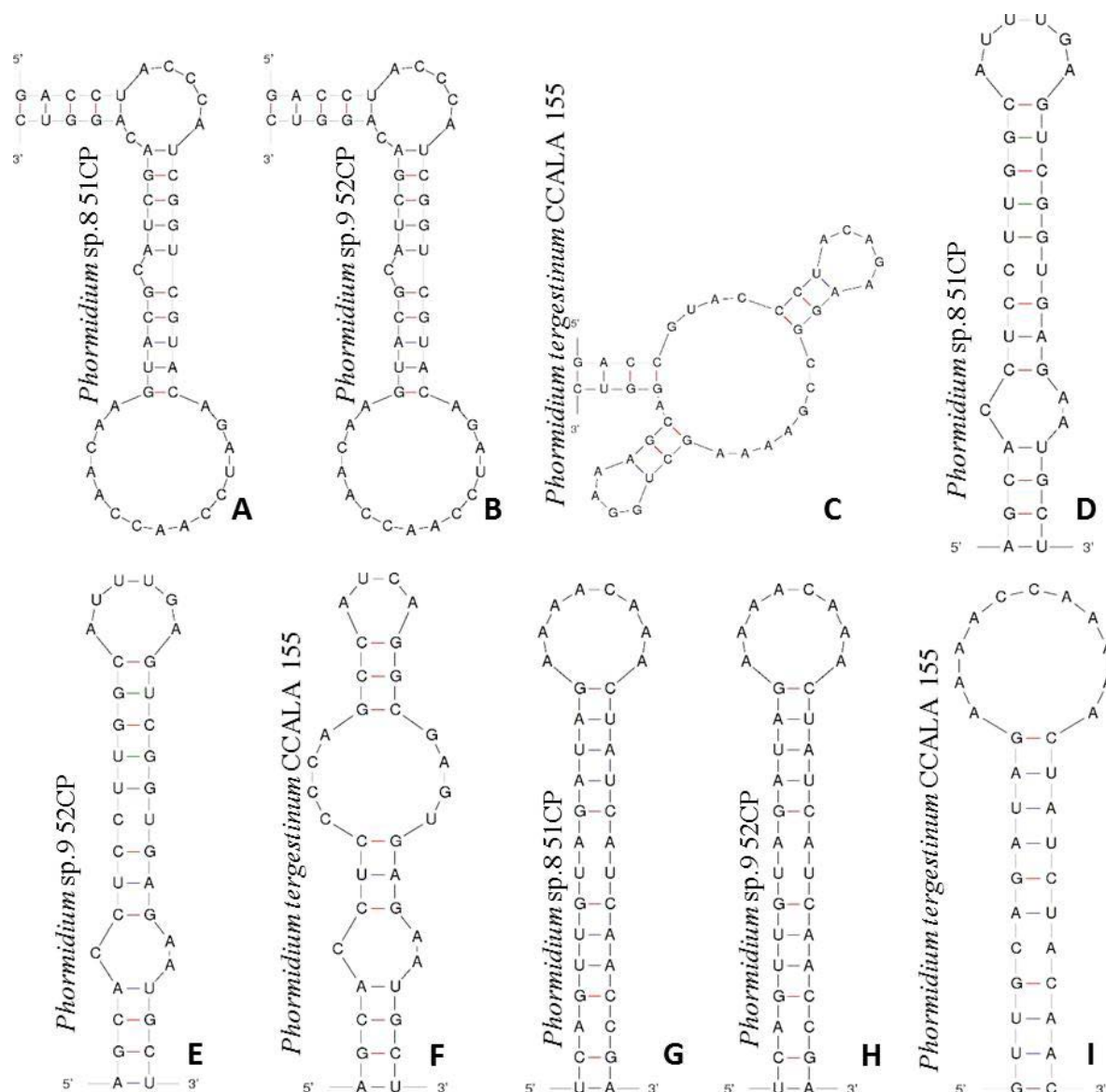


Figura 34. Estruturas secundárias do 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo V **A-C**. Região D1-D1'; **D-F**. Região Box-B; **G-I**. Região V3.

4.4.7 Grupo VI

O grupo VI, composto por nove linhagens dos gêneros *Phormidium*, *Lyngbya* e *Oscillatoria*, apresentou alto suporte (99%-ML, 99%-NJ, 0,96-IB, Figura 35). Este grupo corresponde ao gênero *Phormidium sensu stricto*, uma vez que contém a linhagem *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759, considerada a linhagem-tipo do gênero (MORO et al., 2010; SCIUTO et al., 2011). Segundo Sciuto et al. (2011), as espécies dos gêneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Phormidium* apresentam células discoides como característica em comum e a

diferença morfológica entre elas está na ocorrência de bainha mucilaginosa (facultativa em *Phormidium*, obrigatória em *Lyngbya* e ausente em *Oscillatoria*). Nossos resultados indicam que as linhagens dos gêneros *Oscillatoria* e *Lyngbya* pertencentes ao grupo VI devem ser transferidas para o gênero *Phormidium* e que as demais linhagens de *Phormidium* incluídas nas análises filogenéticas deste estudo (não pertencentes ao grupo VI), correspondem a outros gêneros já existentes ou ainda não descritos.

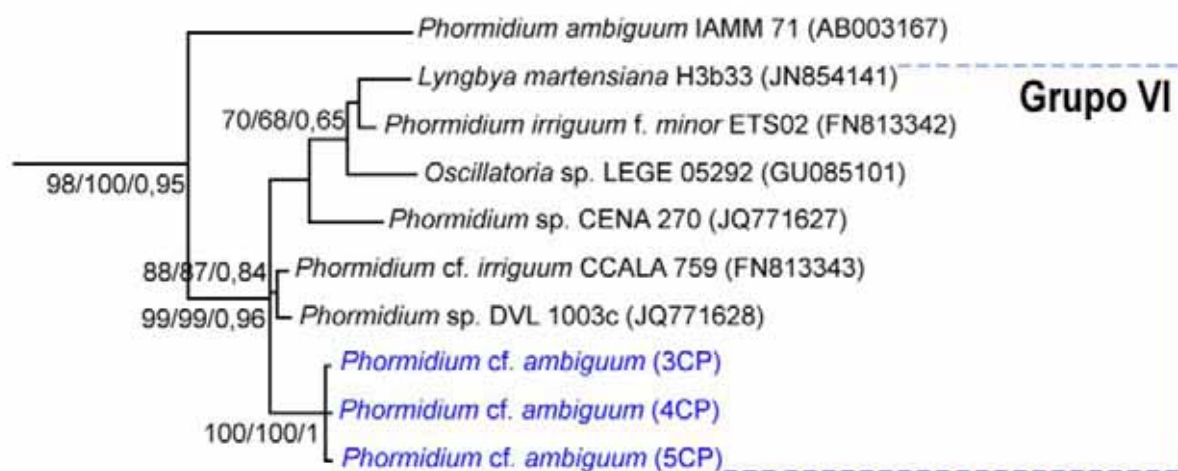


Figura 35 Detalhe do grupo VI da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Todas as linhagens deste grupo apresentaram de 96,6 a 99,7% de similaridade nas sequências do RNAr 16S entre elas e similaridades inferiores a 94,3% com *Phormidium ambiguum* IAMM71 (Tabela 8).

As três populações sequenciadas neste estudo formaram um clado dentro do grupo VI com alto suporte (100%-ML, 100%-NJ, 1-IB) e similaridade superior a 99,6% (Tabela 8), indicando pertencerem a mesma espécie.

Tabela 8. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo VI e *Phormidium ambiguum* IAMM 71.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- <i>Phormidium ambiguum</i> IAMM 71	ID	93,2	93,2	93,3	93,4	94	94,3	93,2	93,3	93,3
2- <i>Lyngbya martensiana</i> H3b33	86	ID	98	98,1	97,8	97,8	97,9	97,1	97,3	97,2
3- <i>P. irriguum</i> f. <i>minor</i> ETS 02	87	25	ID	97,7	97,1	97,8	97,4	96,6	96,8	96,7
4- <i>Oscillatoria</i> sp. LEGE 05292	85	24	29	ID	97,4	97,1	97	97,3	97,5	97,4
5- <i>Phormidium</i> sp. CENA 270	84	27	36	33	ID	98	98,2	96,8	97	96,9
6- <i>P. cf. irriiguum</i> CCALA 759	76	28	27	36	25	ID	99,5	98	98,2	98,1
7- <i>Phormidium</i> sp. DVL 1003c	72	26	33	38	23	6	ID	98,2	98,3	98,2
8- <i>Phormidium</i> cf. <i>ambiguum</i> 3CP	86	36	43	34	40	25	23	ID	99,6	99,6
9- <i>Phormidium</i> cf. <i>ambiguum</i> 4CP	85	34	41	32	38	23	21	4	ID	99,7
10- <i>Phormidium</i> cf. <i>ambiguum</i> 5CP	86	35	42	33	39	24	22	5	3	ID

Das nove linhagens integrantes do grupo VI, apenas duas, *Phormidium* cf. *irriiguum* CCALA 759 e *P. cf. ambiguum* 4CP, tiveram o ITS 16S-23S sequenciado e o comprimento variou de 489 a 518 pares de bases. As duas linhagens apresentaram os dois RNA transportadores (RNA^t^{Ile} e RNA^t^{Ala}) e a região V2 mostrou-se pouco variável quanto ao comprimento (entre 16 e 21 pares de bases).

As estruturas secundárias das regiões D1-D1' e V3 mostraram-se distintas entre as duas linhagens (Figura 36). A região Box-B apresentou estrutura primária distinta, porém estrutura secundária similar (Figura 36).

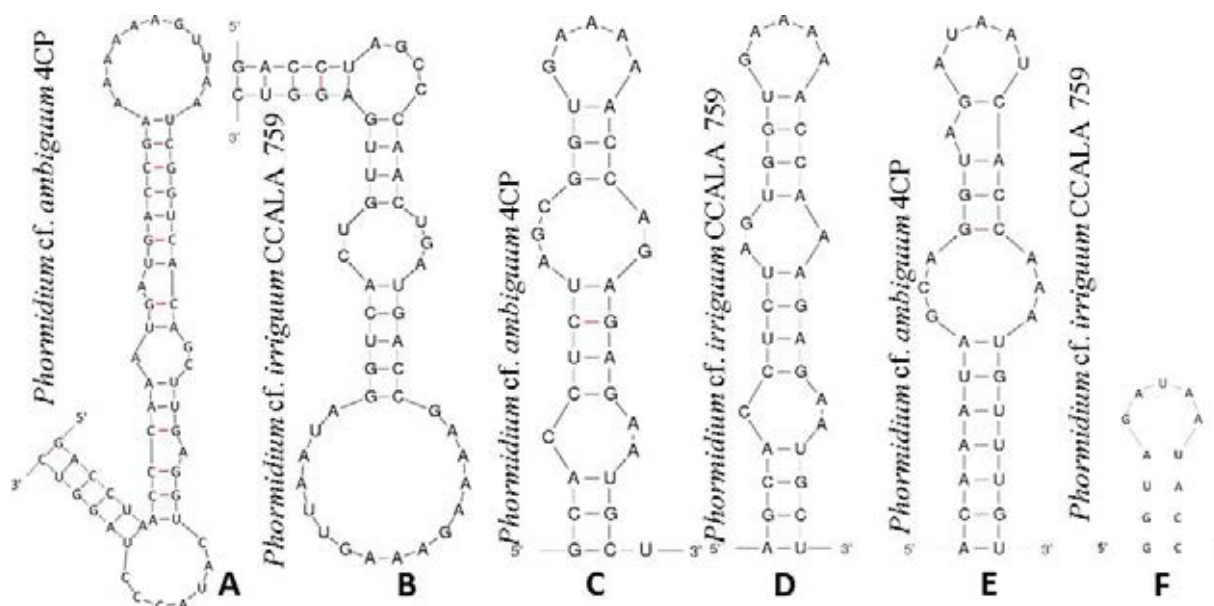


Figura 36. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo VI. **A-B.** Região D1-D1'; **C-D.** Região Box-B; **E-F.** Região V3.

4.4.8 Grupo VII

O grupo VII, que apresentou alto suporte (100%-ML, 100%-NJ, 1-IB) é composto por linhagens de ambientes aquáticos lóticos, nove brasileiras e duas linhagens da Espanha (Figura 37). Este clado mostrou-se geneticamente distinto das linhagens posicionadas em clados próximos, com similaridade inferior a 94,8%, correspondendo a uma divergência superior a 59 nucleotídeos (Tabela 9).

O alto suporte do grupo VII, a alta similaridade do RNAr 16S entre as linhagens do clado e a baixa similaridade com os demais grupos indicam o grupo VII como um gênero distinto.

Este clado é formado por quatro grupos internos (Figura 37). O subgrupo A, composto pelas linhagens *Phormidium aerugineo-caeruleum* 1CP e 2CP, Uncultured *Phormidium aerugineo-caeruleum* clone MNZ37 e Uncultured *Phormidium aerugineo-caeruleum* clone MED28 apresentou de 98,7 a 99,9% de similaridade entre suas sequências do RNAr 16S. A alta similaridade nas sequências do gene e na morfologia indicam que as linhagens pertencem à mesma espécie (Tabela 9).

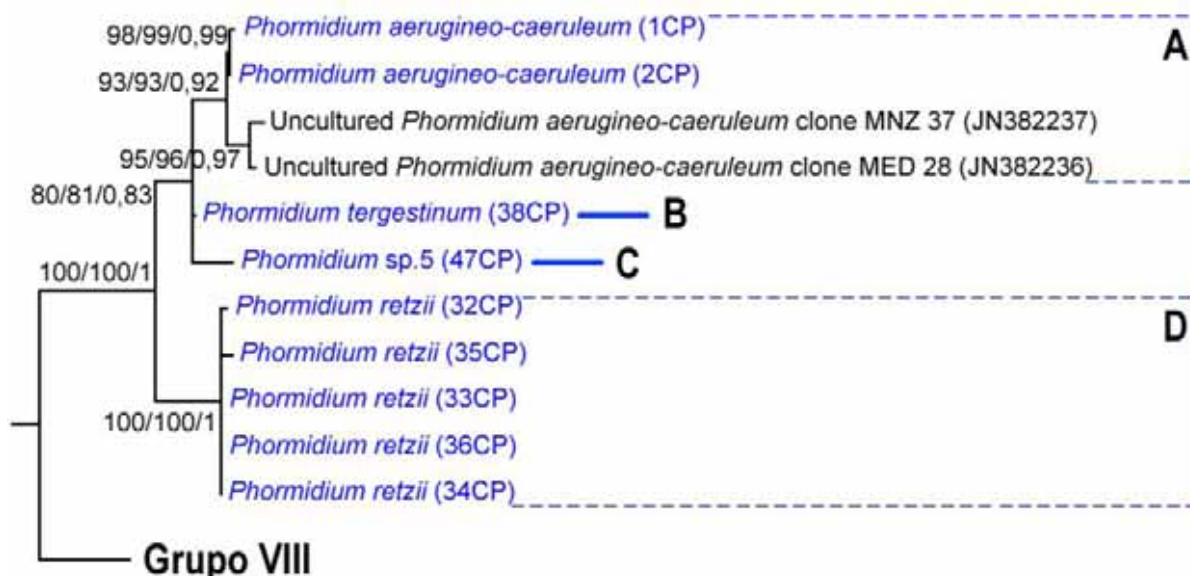
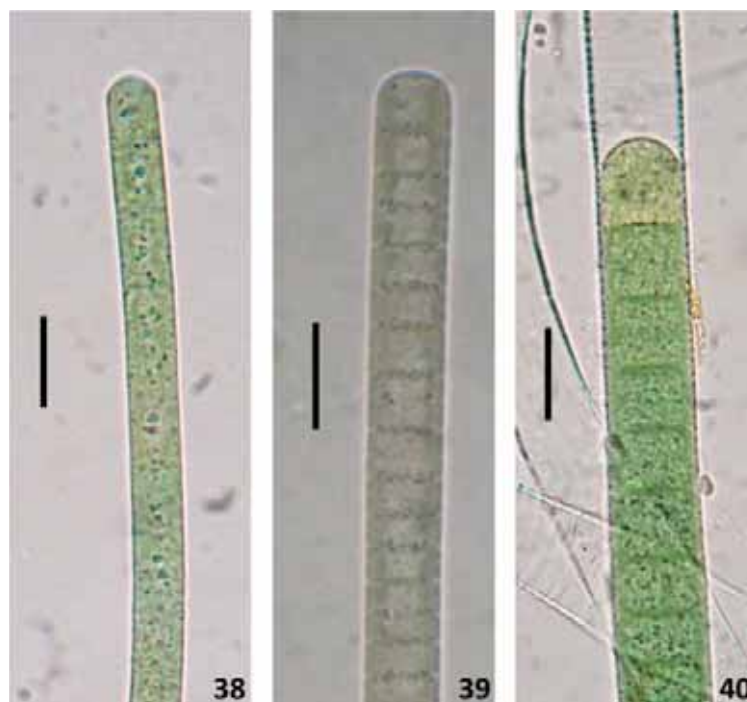


Figura 37. Detalhe do grupo VII da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

O subgrupo A é proximamente relacionado às linhagens *Phormidium tergestinum* 38CP e *Phormidium* sp.5 47CP e a similaridade do RNAr 16S entre esses subgrupos variou de 96,3 a 99,4%. Embora a similaridade deste gene seja grande entre os grupos, as linhagens podem ser morfologicamente diferenciados. As características métricas de *P. aerugineo-caeruleum* 1CP e 2CP e *Phormidium tergestinum* 38CP são similares, podendo ser diferenciados pela presença de grânulos nos septos e tricomas constritos em *P. tergestinum* e por septos não granulados e tricomas não constritos nas linhagens de *P. aerugineo-caeruleum* (Figuras 38-39). *Phormidium* sp.5 47CP é morfometricamente distinta das demais linhagens por apresentar tricomas com diâmetros maiores (9,6-16,8 μm , Figura 40).

Tabela 9. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de rRNA 16S das linhagens pertencentes ao grupo VII.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1- <i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> 1CP	ID	99,9	98,6	98,7	99,4	97,2	96,8	96,7	97	96,9	96,9
2- <i>P. aerugineo-caeruleum</i> 2CP	1	ID	98,7	98,8	99,5	97,3	96,8	96,8	97	97	97
3- Uncultured <i>P. aerugineo-caeruleum</i> MNZ 37	19	18	ID	99,4	98,2	96,3	96,4	96,3	96,6	96,5	96,5
4- Uncultured <i>P. aerugineo-caeruleum</i> MED 28	17	16	8	ID	98,4	96,6	96,5	96,5	96,8	96,7	96,7
5- <i>P. tergestinum</i> 38CP	8	7	24	22	ID	97,5	97,1	97	97,3	97,3	97,3
6- <i>Phormidium</i> sp.5 47CP	39	38	51	47	35	ID	96,9	96,8	97,1	97	97,2
7- <i>P. retzii</i> 32CP	45	44	50	48	40	43	ID	99,5	99,7	99,7	99,7
8- <i>P. retzii</i> 35CP	46	45	51	49	41	44	7	ID	99,7	99,7	99,6
9- <i>P. retzii</i> 33CP	42	41	47	45	37	40	3	4	ID	99,9	99,9
10- <i>P. retzii</i> 36CP	43	42	48	46	38	41	4	3	1	ID	99,8
11- <i>P. retzii</i> 34CP	43	42	48	46	38	39	4	5	1	2	ID



Figuras 38-40. 38. *Phormidium aerugineo-caeruleum* 1CP; 39. *Phormidium tergestinum*; 40. *Phormidium* sp.5. (Escala: 10 μ m)

O subgrupo D é composto por cinco linhagens de *Phormidium retzii*. Esta espécie tem sido interpretada como um conjunto de espécies, até mesmo crípticas, por alguns autores (GEITLER, 1932; CASAMATTA et al., 2003). No entanto, isto não é observado nos dados gerados neste estudo. Todas as populações identificadas como *P. retzii* apresentaram ampla variação no diâmetro do tricoma, também observado por Gomont (1892) e, segundo este autor, um indicativo morfológico para espécies com ampla distribuição geográfica. Embora a variação métrica tenha se mostrado grande, a forma da célula apical truncada foi uma característica presente em todas as populações estudadas. Diferentemente do esperado, as populações brasileiras de *P. retzii* parecem corresponder a uma única espécie geneticamente bem delimitada, cuja similaridade entre as sequências do RNAr 16S variou de 99,5 a 99,9%.

Embora muitos estudos relatem a ampla ocorrência de *P. retzii*, o *GenBank* não possui sequências de DNA disponíveis, tornando impossível, até o momento, a comparação com populações de diferentes localidades. Segundo Casamatta et al. (2003), em estudos baseados

em análises do gene RNAr 16S de populações da América do Norte, *P. retzii* é uma espécie coletiva, entretanto os autores não disponibilizaram as sequências geradas para estudos comparativos.

A relação filogenética do grupo de *Phormidium retzii* com as linhagens dos subgrupos A, B e C é próxima e características morfológicas também suportam esse grupo como um clado consistente, uma vez que todas as linhagens integrantes são aquáticas e pertencem claramente ao Grupo V de Komárek & Anagnostidis (2005). Os subgrupos A, B, C e D são próximos, porém geneticamente diferentes, com similaridade variando entre 96,4 e 97,3% (Tabela 9).

Das 11 linhagens do grupo, apenas sete, todas deste estudo, possuem o ITS 16S-23S sequenciado, cujo comprimento variou de 372 a 385 pares de bases. Todas as linhagens do grupo apresentaram apenas o RNAt^{lle}.

A estrutura secundária da região D1-D1' apresentou pequena variação no grupo com conformações similares. As duas linhagens de *Phormidium aerugineo-caeruleum* (1CP e 2CP) apresentaram estruturas secundárias idênticas dessa região, da mesma forma que as quatro linhagens de *P. retzii* também apresentaram regiões D1-D1' conservadas. A terceira conformação dessa região é a ocorrente na linhagem *P. tergestinum* 38CP (Figura 41).

A região Box-B também mostrou estrutura secundária com três conformações distintas, uma exibida pelas linhagens de *Phormidium aerugineo-caeruleum* (1CP e 2CP), outra pela linhagem *P. tergestinum* (38CP) e a terceira pelas quatro linhagens de *P. retzii* (Figura 41).

Diferentemente, a região V3 mostrou-se menos variável quanto à estrutura secundária, com apenas duas conformações, uma de *Phormidium aerugineo-caeruleum* (1CP e 2CP) e *P. tergestinum* (38CP) e a outra pelas linhagens de *P. retzii*. Estes resultados corroboram a filogenia construída com base no RNAr 16S, bem como os dados morfológicos.

Tanto os dados morfológicos como os genéticos (RNAr 16S e ITS 16S-23S) e ecológicos suportam o clado como um grupo distinto e, portanto, um novo gênero para a

ciência. Da mesma forma os dados morfológicos e moleculares mostram que o grupo VII é composto por quatro espécies: *Phormidium aerugineo-caeruleum*, *P. retzii*, *P. tergestinum* e *Phormidium* sp.5.

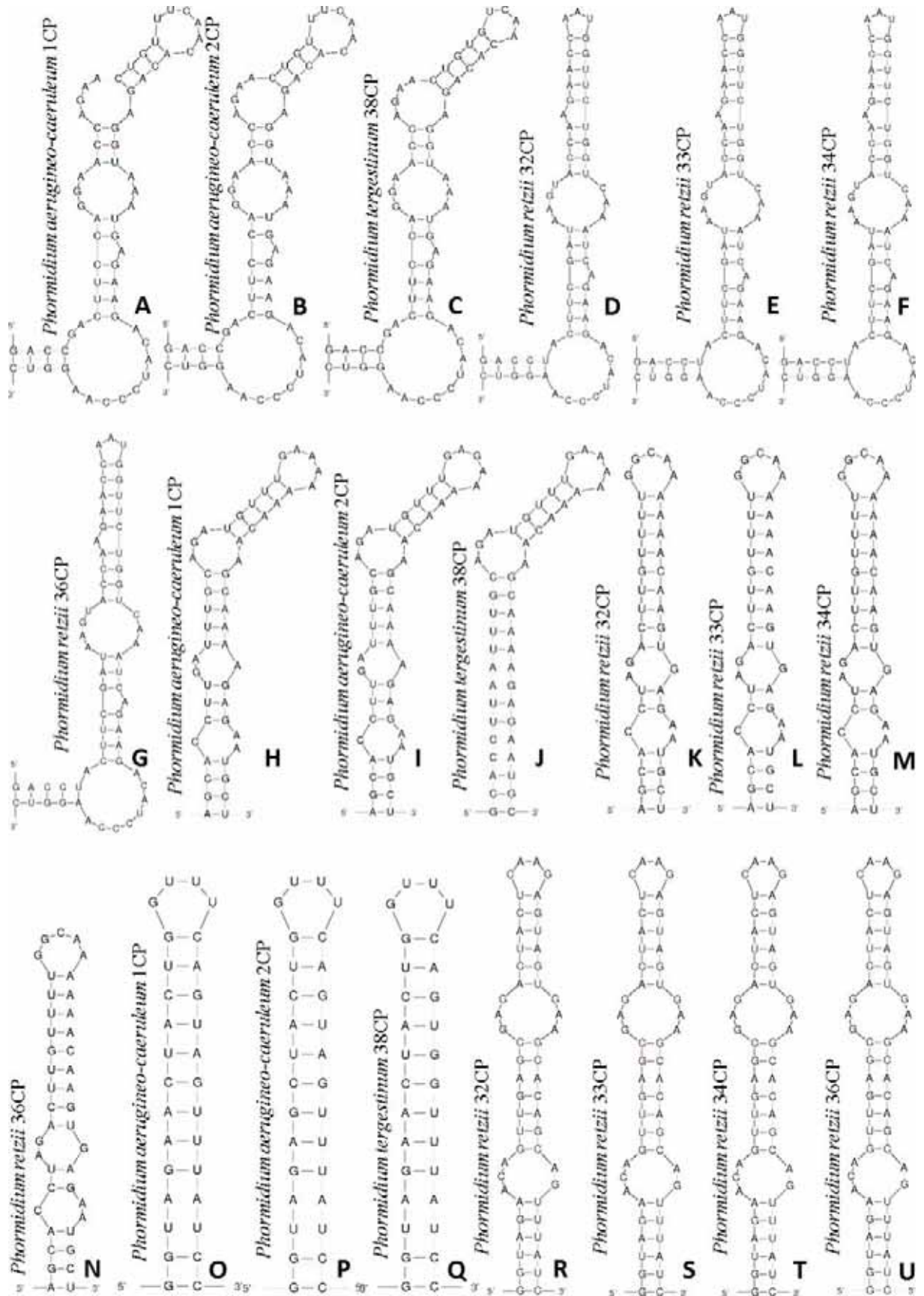


Figura 41. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo VII. A-G. Região D1-D1'; H-N. Região Box-B; O-U. Região V3.

4.4.9 Grupo VIII

O grupo VIII, que apresentou alto suporte (98%-ML, 98%-NJ, 0,97-IB) é formado por 8 linhagens de ambientes aerofíticos (rochas, solos e troncos de árvores) brasileiros, sendo sete sequenciadas no presente estudo (Figura 42). As relações entre as linhagens desse grupo não são claras, pois os ramos internos não apresentaram suporte estatístico, com exceção do clado formado pelas linhagens 44CP, 45CP, 46CP e *Phormidium* sp. B-Tom. A similaridade entre as sequências do RNAr 16S é superior a 96,3% (Tabela 10). Este clado mostrou-se geneticamente distinto das demais linhagens incluídas na análise, com similaridade inferior a 94,8%, correspondendo a uma divergência superior a 59 nucleotídeos.



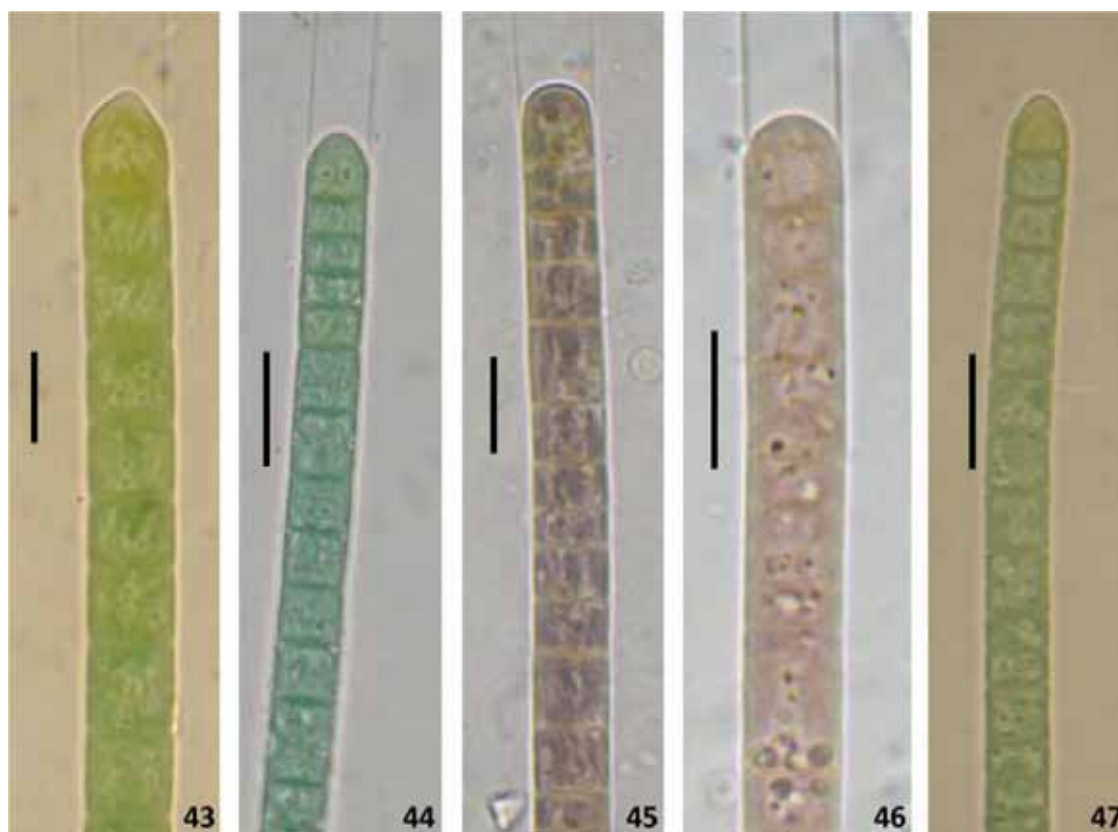
Figura 42. Detalhe do grupo VIII da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As sequências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

Tabela 10. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens pertencentes ao grupo VIII.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>Phormidium crouanii</i> (7CP)	ID	98,2	96,3	97,3	96,8	97	97	97,7
2- <i>Phormidium</i> sp.1 (41CP)	25	ID	96,5	97,3	97	97,2	97,2	98,1
3- <i>Phormidium</i> sp.2 (42CP)	52	49	ID	97	96,3	96,6	96,6	97,4
4- <i>Phormidium</i> sp.3 (43CP)	38	38	42	ID	97	97,3	97,3	98,2
5- <i>Phormidium</i> sp.4 (46CP)	45	42	51	41	ID	99,7	99,7	99,4
6- <i>Phormidium</i> sp.4 (45CP)	41	38	47	37	4	ID	100	99,7
7- <i>Phormidium</i> sp.4 (44CP)	41	38	47	37	4	0	ID	99,7
8- <i>Phormidium</i> sp.1 B-Tom	25	21	29	20	6	3	3	ID

O grupo caracteriza-se por desenvolver tricomas retos e não atenuados no ápice e células apicais cilíndrico-arredondadas a levemente cônicas (Figuras 43-47). O formato levemente cônico observado nas células apicais de algumas populações pode estar relacionado com o desenvolvimento de parede externa espessada (Figuras 43 e 47). No entanto, esta característica não foi citada para *Phormidium* sp. B-Tom (LOKMER, 2007). O clado interno, formado pelas linhagens 44CP, 45CP, 46CP e *Phormidium* sp. B-Tom, apresentou similaridade variando entre 99,4 e 100% (Tabela 10), indicando que todas pertencem à mesma espécie.

Segundo Lokmer (2007) e Strunecky (2011), a linhagem *Phormidium* sp. B-Tom é proximamente relacionada a linhagens de *Wilmottia*. No presente estudo, as linhagens de *Wilmottia* posicionaram-se como grupo-irmão do clado formado pelos grupos VII e VIII.



Figuras 43-47. 43. *Phormidium crouanii*; 44. *Phormidium* sp.1; 45. *Phormidium* sp.2; 46. *Phormidium* sp.3; 47. *Phormidium* sp.4. (Escala: 10 µm)

Das oito linhagens integrantes do grupo VIII, sete possuem sequências do ITS 16S-23S, seis delas obtidas no presente estudo e os comprimentos dessas sequências variaram de 375 a 433 pares de bases. Todas as linhagens apresentaram apenas o RNAt^{lle}.

As regiões D1-D1', Box-B e V3 mostraram estrutura secundária com quatro conformações distintas: 1 - exibidas pela linhagem *Phormidium* sp.1 (41CP); 2 - *Phormidium* sp.2 (42CP); 3 - *Phormidium* sp.3 (43CP) 4 - *Phormidium* sp.4 (44 CP, 45CP e 46CP) e *Phormidium* sp. B-Tom (Figuras 48 e 49).

A análise filogenética com base no RNAr 16S mostra que o clado trata-se de um grupo (gênero) distinto dos demais, apresentando alto suporte. Este clado é composto por cinco diferentes grupos (espécies) e as análises morfológicas e do ITS 16S-23S corroboram a topologia gerada nas análises do RNAr 16S.

Na filogenia construída, os grupos VII e VIII são irmãos, no entanto, essa relação não apresenta suporte consistente, sendo impossível maiores inferências quanto à relação entre estes grupos. Ambos pertencem ao grupo e V de Komárek & Anagnostidis (2005), que se caracteriza por organismos com tricomas cilíndricos, não atenuados e células apicais cilíndrico arredondadas a levemente cônicas. Assim, a congruência entre o hábito das populações e os agrupamentos pode ser observada, sendo o grupo VII formado pelas populações aquáticas e o grupo VIII, pelas populações aerofíticas.

Alguns trabalhos também relatam a correlação entre caracteres filogenéticos e ecológicos ou ecofisiológicos: Garcia-Pichel et al. (1998) mostraram o clado bem definido, com base no RNAr 16S, formado por cianobactérias unicelulares de habitats hipersalinos de várias regiões geográficas. O mesmo foi observado para linhagens marinhas de *Phormidium* (PFEIFFER & PALINSKA, 2002) e para linhagens psicrófilas de *Phormidium* da Antártica (NADEAU et al., 2001). No entanto, Abed et al. (2002) mostraram que *Trichodesmium* e *Hydrocoleum*, dois gêneros morfológica e filogeneticamente próximos, divergem

ecologicamente, sendo o primeiro planctônico, enquanto o outro forma massas em oceanos tropicais.

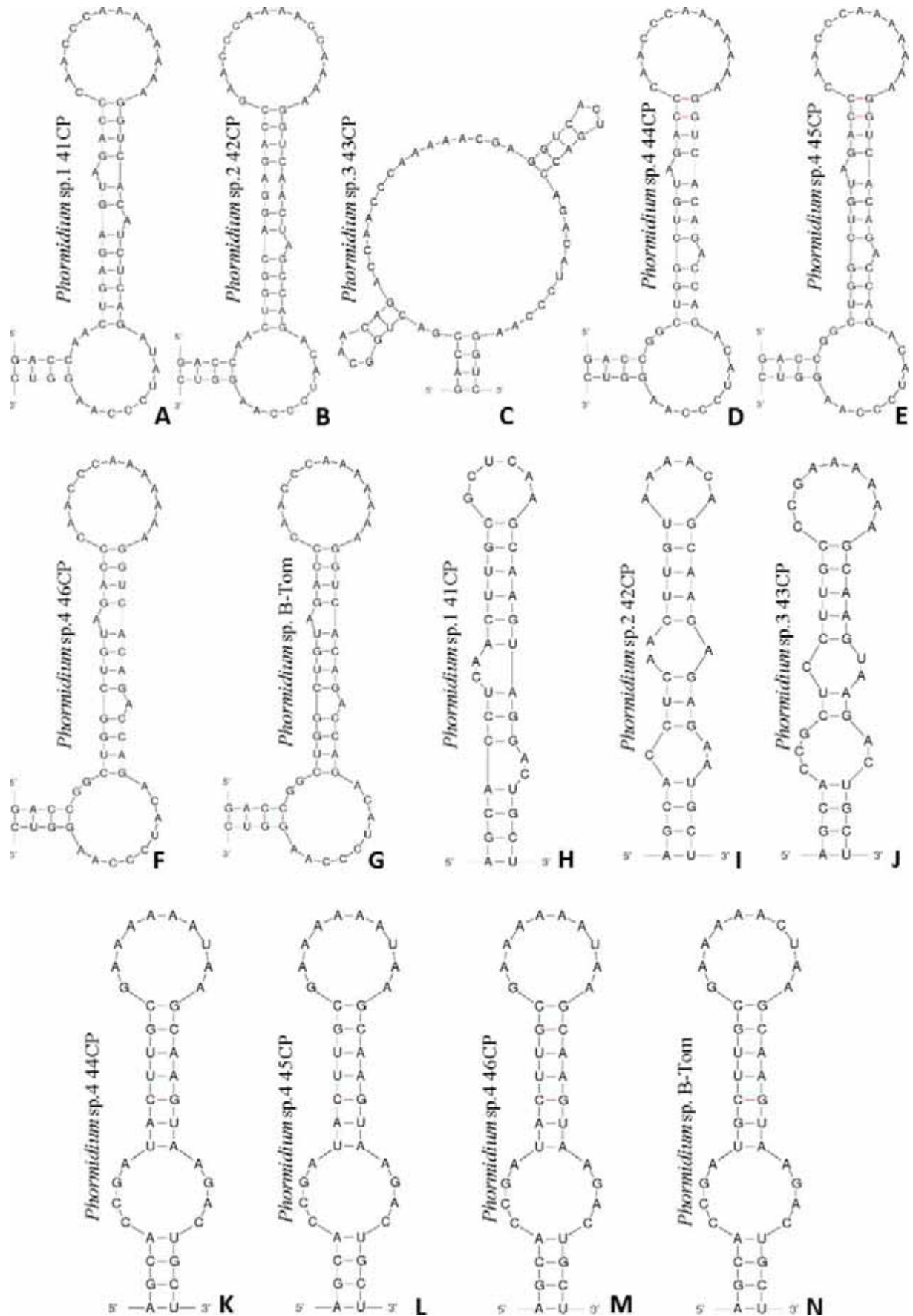


Figura 48. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo VIII. A-G. Região D1-D1'; H-N. Região Box-B.

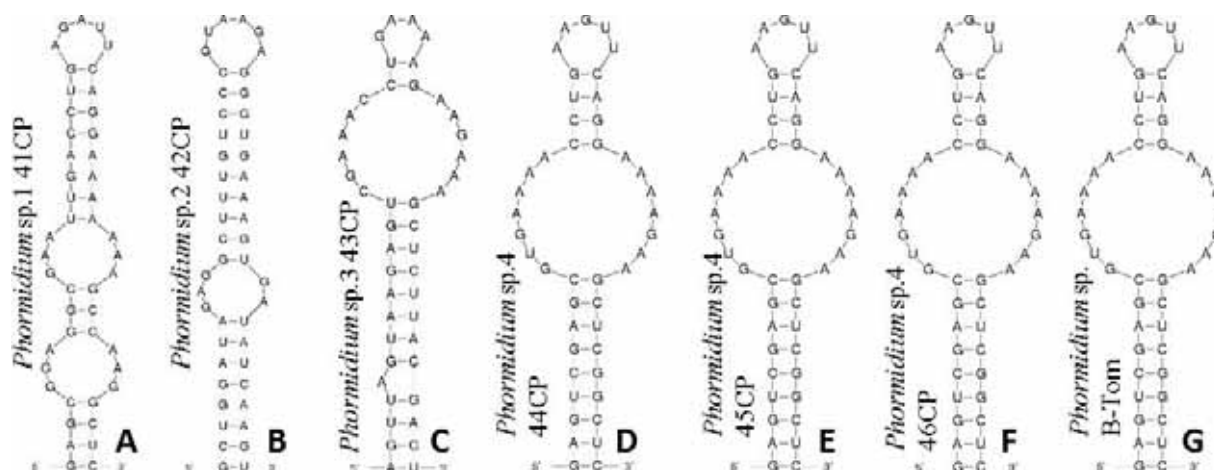


Figura 49. Estruturas secundárias da região V3 do ITS 16S-23S das linhagens de *Phormidium* do grupo VIII.

O alto suporte dos grupos VII e VIII, a evidente separação destes das outras linhagens analisadas e a clara distinção morfológica das demais espécies de *Phormidium*, mostram que os clados correspondem a dois novos gêneros, que possuem morfologia semelhante (tricomas não atenuados no ápice e células isodiamétricas ou levemente mais curtas ou longas que largas) e características ecológicas distintas.

4.4.10 Grupo IX

O clado constituído por 18 linhagens sequenciadas neste estudo e quatro linhagens de *Wilmottia murrayi* apresentou alto suporte estatístico (99%-ML, 99%-NJ, 0,98-IB) (Figura 50). As linhagens que constituem este grupo apresentam características morfológicas similares, no entanto provém de diferentes tipos de ambientes e regiões geográficas. As linhagens com sequências depositadas no *GenBank* são provenientes de lagos eutróficos da Nova Zelândia (*Wilmottia murrayi* CYN 76), lagos na Antártica (*W. murrayi* Ant-Ph58 e ANTLPE 2) e crescendo em ambiente aerofítico sobre ossos de baleia na Antártica (*W. murrayi* KGI 28).

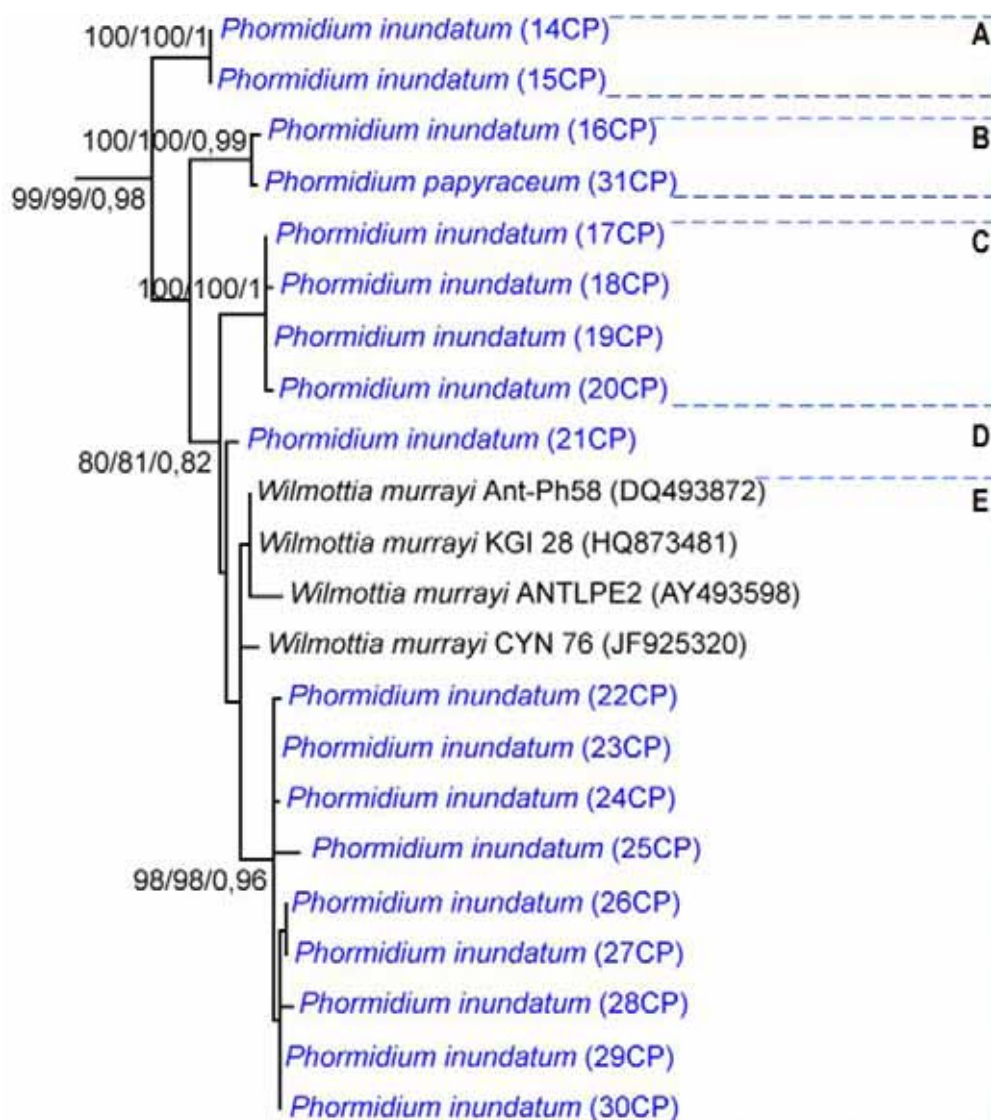


Figura 50. Detalhe do grupo IX da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseado no gene RNAr 16S. As seqüências geradas neste estudo estão em azul. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 80% para os métodos de ML, NJ e de 0,8 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos.

As linhagens sequenciadas neste estudo foram coletadas tanto em ambientes aquáticos (14CP, 16CP, 20CP, 22CP, 25CP, 31CP) como em ambientes aerofíticos (solos – 18CP, 24CP, 27CP, 28CP e troncos de árvores – 15CP, 17CP, 19CP, 21CP, 23CP, 26CP, 29CP, 30CP) de regiões tropicais e subtropicais do Brasil. Dentro deste clado, cinco subgrupos (A, B, C, D e E) podem ser observados. Os subgrupos A, B, C e D são compostos por linhagens sequenciadas no presente estudo. O subgrupo E é constituído por linhagens da Antártica e da Nova Zelândia, e nove linhagens brasileiras, também apresentando alto suporte. A similaridade entre as

sequências do RNAr 16S das linhagens integrantes do grupo IX é superior a 95% e internamente aos grupos, superior a 97,4% (Tabela 11).

Dezenove linhagens possuem os ITS 16S-23S sequenciados, cujos comprimentos variaram de 391 a 452 pares de bases. Todas as linhagens do grupo apresentaram apenas o RNAt^{lle}.

As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 apresentaram grande variação, onde D1-D1' e Box-B exibiram seis conformações diferentes e V3, sete (Figuras 51-54).

De acordo Strunecky et al. (2011), *Wilmottia* é um gênero proximamente relacionado aos gêneros *Geitlerinema*, *Phormidesmis*, *Leptolynbya* e *Halomicronema*, no entanto, esta relação não foi observada neste estudo. O clado *Wilmottia* posicionou-se como grupo-irmão de outras linhagens de *Phormidium* (grupos VII e VIII), com similaridade do RNAr 16S inferior a 95%, e longe das linhagens de *Geitlerinema* e *Leptolynbya*.

A estreita relação entre as linhagens que compõem o grupo IX indicam que estas pertencem ao gênero *Wilmottia*. Este resultado corrobora a suposição feita por Strunecky et al. (2011) de que *Phormidium inundatum* e *P. papyraceum* devem ser transferidos para *Wilmottia*. No mesmo estudo, os autores argumentam sobre a possibilidade de *P. crouanii* também pertencer a *Wilmottia*, no entanto, a população brasileira de *P. crouanii* posicionou-se no grupo VIII e a similaridade entre essa população e as populações do grupo IX foi inferior a 94%, não confirmando tal indicação.

A topologia do grupo IX indica que a identificação das espécies que pertencem ao clado não pode ser feita por meio da diferenciação morfológica ou ecológica. Da mesma forma que o hábito aerofítico de algumas populações e o aquático de outras não é congruente com a filogenia, a estrutura secundária das regiões D1-D1', Box-B e V3 do ITS 16S-23S também não, indicando a necessidade de estudos taxonômicos mais profundos e a utilização de outros

marcadores moleculares, uma vez que o grupo apresentou heterogeneidade quanto à ecologia, baixa diversidade morfológica e alta similaridade no RNAr 16S.

Tabela 11. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as seqüências de RNAr 16S das linhagens de *Phormidium* e *Wilmottia* pertencentes ao grupo IX.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1-P. inundatum 14CP	ID	100	95,3	95	96,4	96,3	96,4	96,3	95,7	95,7	97,8	95,9	95,5	96,4	96,4	96,4	96,1	96,4	96,4	96,3	96,4	96,4
2-P. inundatum 15CP	0	ID	95,3	95	96,4	96,3	96,4	96,3	95,7	95,7	97,8	95,9	95,5	96,4	96,4	96,4	96,1	96,4	96,4	96,3	96,4	96,4
3-P. inundatum 16CP	63	63	ID	98,9	96,6	96,5	96,6	96,5	96,4	96,4	98	96,2	95,9	96,4	96,4	96,4	96,2	96,3	96,2	96,1	96,3	96,3
4-P. papyraceum 31CP	68	68	14	ID	95,9	95,8	95,9	95,8	96,0	95,6	97,5	96	95,2	95,6	95,5	95,6	95,3	95,4	95,3	95,3	95,4	95,4
5-P. inundatum 17CP	49	49	46	56	ID	99,9	100	99,9	97,2	97,6	98,5	97,2	97,2	98,5	98,4	98,4	98,2	98,3	98,3	98,2	98,3	98,3
6-P. inundatum 18CP	50	50	47	57	1	ID	99,9	99,8	97,2	97,5	98,4	97,1	97,2	98,4	98,3	98,3	98,1	98,2	98,2	98,1	98,3	98,3
7-P. inundatum 19CP	49	49	46	56	0	1	ID	99,9	97,2	97,6	98,5	97,2	97,2	98,5	98,4	98,4	98,2	98,3	98,3	98,2	98,3	98,3
8-P. inundatum 20CP	50	50	47	57	1	2	1	ID	97,2	97,5	98,4	97,1	97,2	98,4	98,3	98,3	98,1	98,2	98,2	98,1	98,3	98,3
9-P. inundatum 21CP	58	58	48	54	37	38	37	38	ID	98,6	99,5	98,8	98	97,5	97,4	97,5	97,3	97,5	97,4	97,3	97,5	97,5
10-W. murrayi AntPh 58	58	58	49	59	32	33	32	33	19	ID	99,8	98,4	99	98,4	98,3	98,3	98,3	98,3	98,2	98,1	98,3	98,3
11-W. murrayi KGI 28	23	23	21	27	16	17	16	17	5	2	ID	99,3	99,5	99,3	99,3	99,3	99	99,2	99,2	99,1	99,3	99,3
12-W. murrayi ANTILPE 2	55	55	51	54	38	39	38	39	16	21	7	ID	98	97,5	97,5	97,5	97,4	97,6	97,5	97,4	97,5	97,5
13-W. murrayi CYN 76	61	61	55	65	37	38	37	38	26	13	5	26	ID	98	98	98,0	97,9	98,1	98	97,9	98	98,0
14-P. inundatum 22CP	48	48	48	60	20	21	20	21	34	21	7	33	26	ID	99,7	99,7	99,5	99,6	99,6	99,5	99,7	99,7
15-P. inundatum 23CP	49	49	49	61	21	22	21	22	35	22	7	34	27	3	ID	99,7	99,4	99,5	99,5	99,4	99,6	99,6
16-P. inundatum 24CP	49	49	48	60	21	22	21	22	34	22	7	33	27	3	4	ID	99,4	99,5	99,5	99,4	99,6	99,6
17-P. inundatum 25CP	52	52	51	63	24	25	24	25	36	23	10	35	28	6	7	7	ID	99,4	99,3	99,2	99,4	99,4
18-P. inundatum 26CP	49	49	50	62	23	24	23	24	33	22	8	32	25	5	6	6	7	ID	99,8	99,6	99,7	99,7
19-P. inundatum 27CP	49	49	51	63	23	24	23	24	35	24	8	34	27	5	6	6	9	2	ID	99,6	99,7	99,7
20-P. inundatum 28CP	50	50	52	64	24	25	24	25	36	25	9	35	28	6	7	7	10	5	5	ID	99,7	99,7
21-P. inundatum 29CP	48	48	50	62	22	23	22	23	34	23	7	33	26	4	5	5	8	3	3	4	ID	99,8
22-P. inundatum 30CP	48	48	50	62	22	23	22	23	34	23	7	33	26	4	5	5	8	3	3	4	2	ID

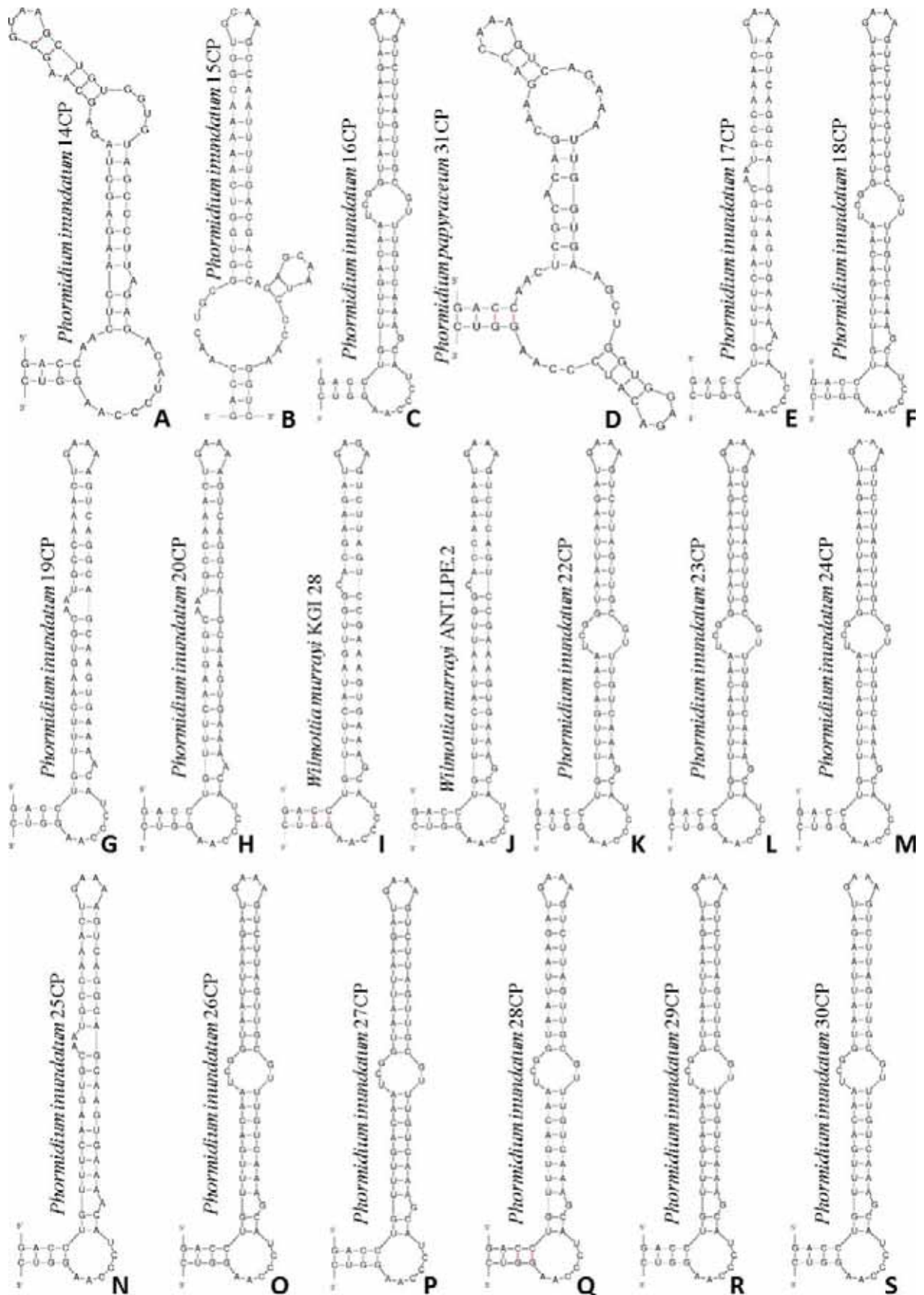


Figura 51. Estruturas secundárias da região D1-D1' do ITS 16S-23S das linhagens do grupo IX. A-B. Subgrupo A; C-D. Subgrupo B; E-H. Subgrupo C; I-S. Subgrupo E.

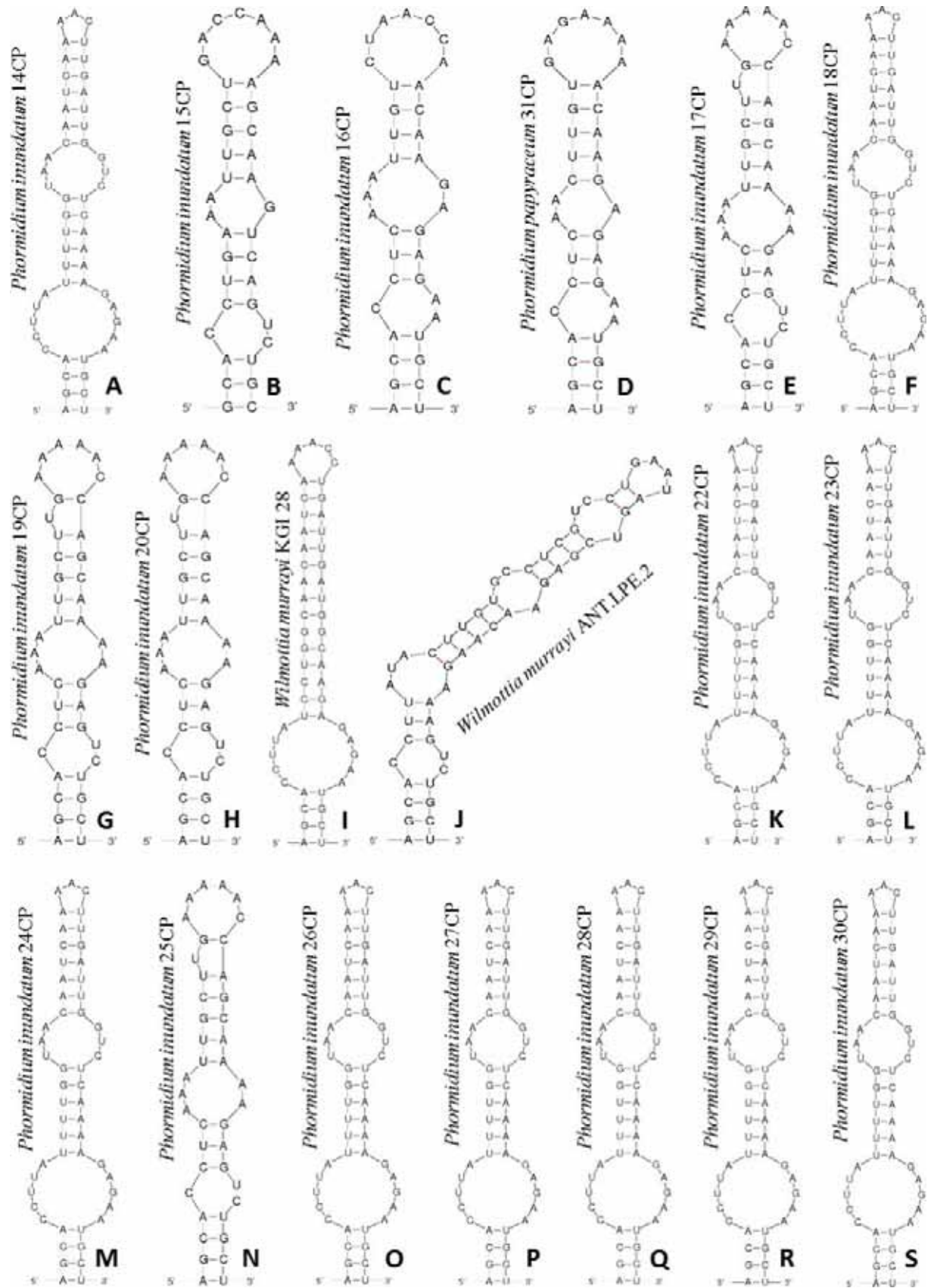


Figura 52. Estruturas secundárias da região Box-B do ITS 16S-23S das linhagens do grupo IX. A-B. Subgrupo A; C-D. Subgrupo B; E-H. Subgrupo C; I-S. Subgrupo E.

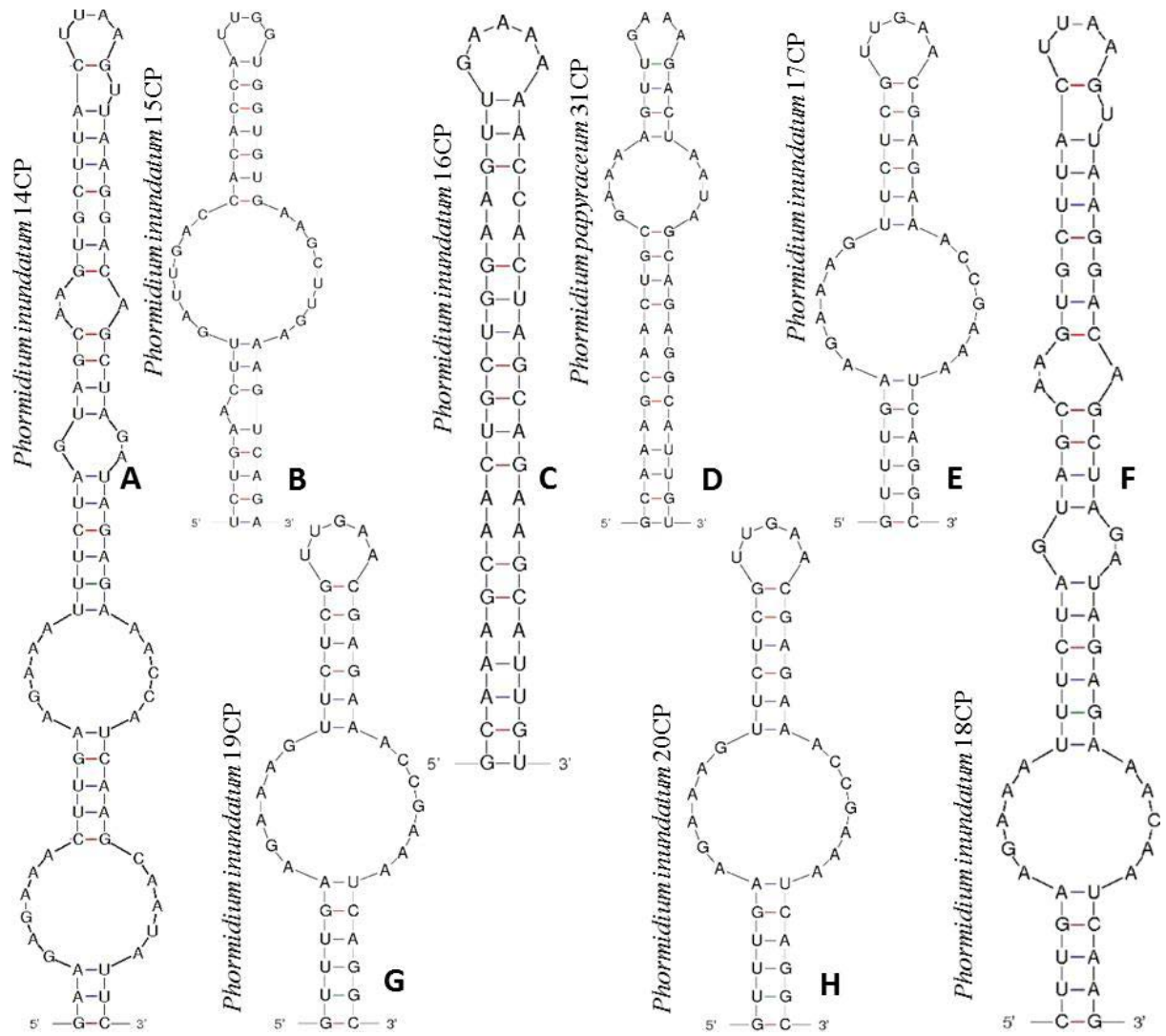


Figura 53. Estruturas secundárias da região V3 do ITS 16S-23S das linhagens do grupo IX. **A-B.** Subgrupo A; **C-D.** Subgrupo B; **E-H.** Subgrupo C.

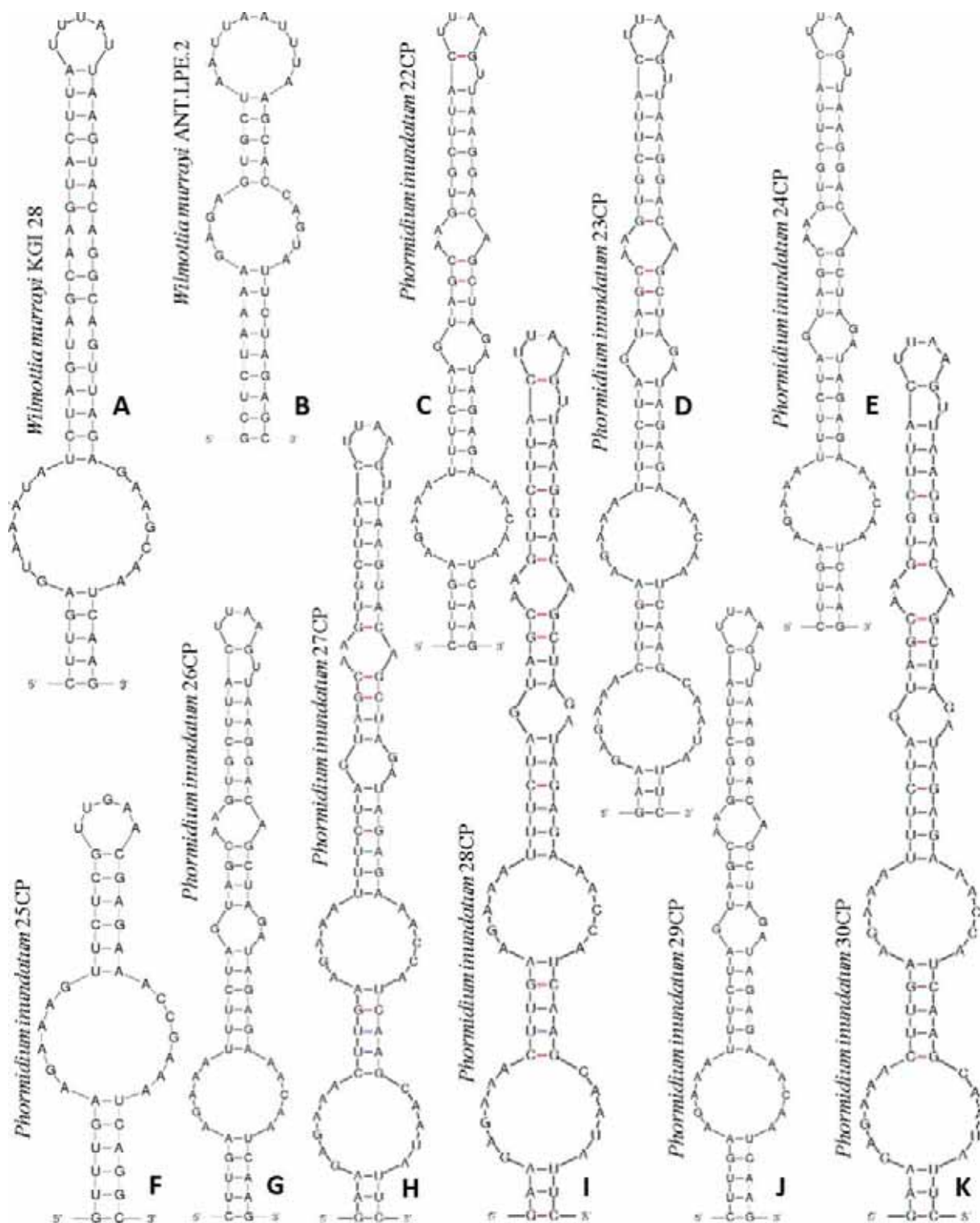


Figura 54. A-K. Estruturas secundárias da região V3 do ITS 16S-23S das linhagens do subgrupo E do grupo IX.

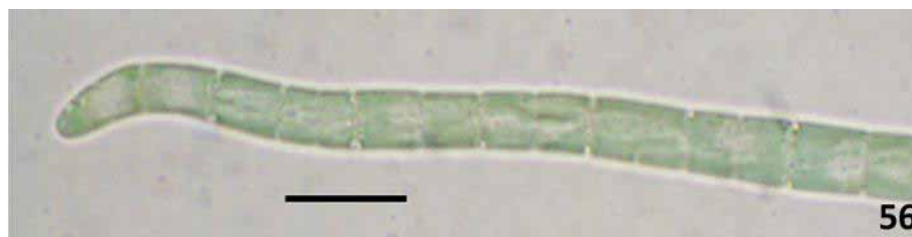


Figura 56. *Phormidium terebriforme* (grupo X). (Escala: 10 μ m)

O ITS 16S-23S de *Phormidium terebriforme* foi sequenciado e apresentou 405 pares de bases, onde os dois RNAt (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}) foram identificados. Apenas as regiões D1-D1' e Box-B foram identificadas e suas estruturas secundárias foram produzidas (Figura 57). Não foi feita comparações dessas estruturas com as de outras linhagens, pois *Phormidium* sp. ETS05 não teve seu ITS 16S-23S sequenciado.

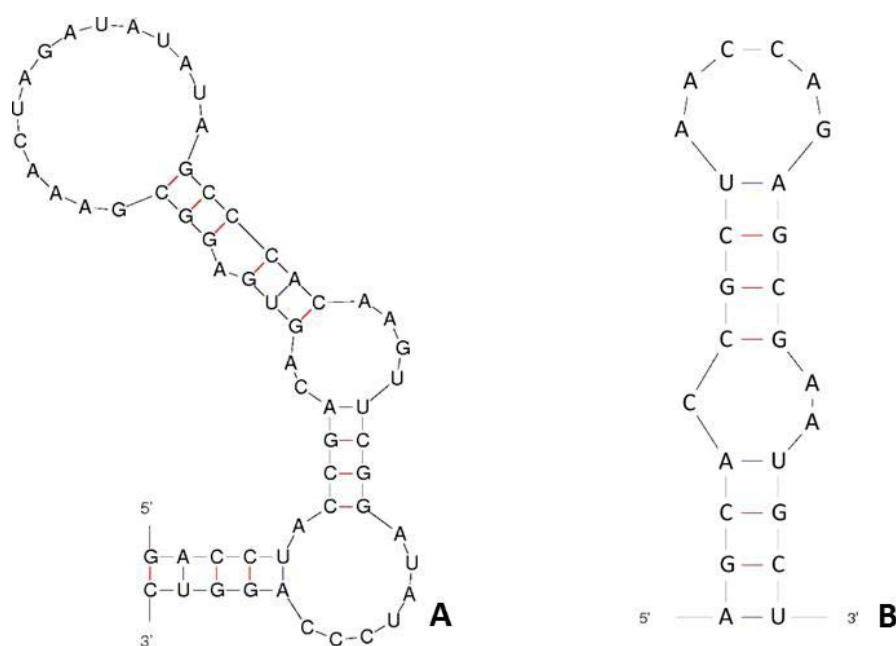


Figura 57. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' e Box-B do ITS 16S-23S de *Phormidium terebriforme* (grupo X). **A.** Região D1-D1'; **B.** Região Box-B.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante os últimos 25 anos, o entendimento das relações evolutivas entre microrganismos aumentou grandemente devido, principalmente, ao uso de sequências do gene RNAr 16S. Essa abordagem, iniciada por Woese et al. (1990), vem sendo amplamente utilizada e tornou-se base para a definição de grupos taxonômicos em Cyanobacteria. Enquanto alguns gêneros tradicionais, tais como *Arthrospira* (NELISSEN et al., 1994, MANEN & FALQUET, 2002; ZHANG et al., 2005), *Microcoleus* (NEILAN et al., 1997; OTSUKA et al., 1998) e *Planktothrix* (SUDA et al., 2002; KOMÁREK & KOMÁRKOVÁ, 2004), apresentaram suporte molecular, outros, como *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Phormidium*, mostraram-se heterogêneos (HROUZE et al., 2005; RAJANIEMI et al., 2005a; 2005b; WILLAME et al., 2006). Geralmente, uma similaridade de 95% do RNAr 16S é considerada o limite entre dois gêneros (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994), no entanto, este valor não é fixo para separação genérica, pois outros marcadores (como os ecológicos e morfológicos) precisam ser considerados.

De acordo com as análises feitas neste estudo, o RNAr 16S mostrou-se um bom marcador molecular para nível genérico. A origem polifilética de *Phormidium* já foi mencionada por Taton et al. (2006), Palinska & Marquardt (2008) e Strunecky et al. (2010). As 52 linhagens de *Phormidium* sequenciadas neste estudo, mais uma vez, indicaram a heterogeneidade do gênero, reforçando os questionamentos sobre a fragilidade dos critérios morfológicos utilizados para a definição de gêneros e espécies.

As 60 linhagens deste estudo agruparam-se em sete clados com alto suporte, que correspondem a novos gêneros para a ciência (grupos III, IV, V, VII, VIII, X e subgrupo A de *Porphyrosiphon*). Além disso, o RNAr 16S também conferiu suporte molecular para o gênero *Porphyrosiphon*.

De forma geral, foi observada congruência entre a filogenia construída e a morfologia do ápice dos tricomas exibida pelos grupos. Os grupos III, IV e X foram exceções a esta correspondência, onde linhagens com morfologia similar (tricomas atenuados e curvos no ápice), posicionaram-se distantes entre si devido a diferenças nas sequências moleculares. Os demais clados compostos por linhagens de *Phormidium* apresentaram características morfológicas definidas. Os grupos I e II, próximos entre si, formam tricomas atenuados no ápice e células apicais com caliptra, correspondendo ao grupo *Microcoleus* definido por Strunecky et al. (2013). Os grupos V e VI, também proximamente relacionados, apresentaram tricomas com células distintamente mais curtas que largas, correspondendo ao grupo VIII apresentado por Komárek & Anagnostidis (2005). Os grupos VII e VIII, grupos-irmãos, desenvolvem tricomas não atenuados e células apicais cilíndrico-arredondadas, correspondendo ao grupo V de Komárek & Anagnostidis (2005). Da mesma forma, todas as linhagens com tricomas não atenuados e células apicais cônico-arredondadas, correspondente ao grupo IV estabelecido por Komárek & Anagnostidis (2005), formaram um grupo monofilético com alto suporte (grupo IX) e se agruparam com linhagens do gênero *Wilmottia*, indicando a necessidade de transferências de *Phormidium inundatum* e *P. papyraceum* para *Wilmottia*, como Strunecky et al. (2011) haviam comentado. Finalmente, as linhagens que desenvolveram tricomas com bainhas mucilaginosas obrigatórias, espessas e lameladas formaram um clado consistente, o grupo *Porphyrosiphon*.

Da mesma forma, Chatchawan et al. (2012) observaram congruência entre filogenia e características morfológicas do tricoma, no qual o clado formado pela linhagem *Oxynema thaianum* e outras duas linhagens abrangeu organismos com tricomas atenuados e curvos no ápice e células apicais acuminadas, correspondendo ao grupo I de Komárek & Anagnostidis (2005).

Diferentemente da morfologia dos tricomas, a capacidade de formar aerótopos não se mostrou congruente com a filogenia proposta, uma vez que as linhagens pertencentes aos gêneros *Aerosakkonema*, *Desertifilum*, *Planktothrix* e *Planktohricoides* posicionaram-se distantes umas das outras. Os resultados sugerem, portanto, que a formação de aerótopos não é um caráter filogeneticamente informativo e a capacidade de formar tais estruturas foi adquirida mais de uma vez no processo evolutivo. Este resultado é consistente com estudos publicados por Suda et al. (2002) e Thu et al. (2012).

Com exceção dos grupos IV e VII, compostos apenas por linhagens brasileiras, os clados formados na árvore não parecem seguir padrões geográficos ou climáticos, já que populações de regiões distantes geograficamente situam-se próximas na árvore, assim como populações de climas tropicais e temperados. Da mesma forma, não foi observada congruência entre aspectos ecológicos e a filogenia apresentada, pois a maioria dos ramos internos da árvore incluem linhagens com ecologia diversa, englobando tanto formas de ambientes aquáticos quanto aerofíticos. Excetuam-se o grupo VII, composto apenas por linhagens aquáticas, e o grupo VIII e o grupo *Porphyrosiphon*, cujos integrantes são aerofíticos. Diferentemente, o grupo IV englobou linhagens aerofíticas e aquáticas, porém estas organizaram-se em dois ramos separados e com alto suporte cada um.

Uma vez que o RNAr 16S é conhecido por ser conservado e com valor filogenético relativamente baixo em nível específico (FOX et al., 1992), o espaçador intergênico 16S-23S vem sendo utilizado com o intuito de acessar a variabilidade intragenérica.

Os primeiros estudos com o ITS 16S-23S analisavam a configuração do espaçador, presença de RNAs transportadores e comprimento das sequências (ITEMAN et al., 2000; BOYER et al., 2001; 2002). Segundo Boyer et al. (2001), o padrão de configuração do ITS 16S-23S (presença e ausência dos RNAs transportadores) pode ser útil em estudos filogenéticos em níveis taxonômicos superiores. Embora ITSs sem RNAs transportadores ou com apenas o

RNA^t_{Ile}, também sejam observados, Boyer et al. (2001) comentam que o padrão de configuração mais frequente em Cyanobacteria é a presença de ambos os RNAs transportadores (RNA^t_{Ile} e RNA^t_{Ala}), também observados no trabalhos de Nelissen et al. (1994), Iteman et al. (2000) e Flechtner et al. (2002). No presente estudo essa tendência não foi observada, pois das 50 sequências obtidas, apenas 12 apresentaram os dois RNAs transportadores e quatro não apresentaram nenhum deles (Tabela 4, página 95).

Não foi possível alinhar as sequências do ITS 16S-23S obtidas neste estudo para análises filogenéticas. As sequências estudadas foram divididas em 15 regiões (Tabela 3, página 89), dentre as quais apenas quatro (RNA^t_{Ile}, RNA^t_{Ala}, Box-A e D4) apresentaram o mesmo número de pares de bases. As outras 11 regiões mostraram-se variáveis quanto ao comprimento e parecem ter uma história evolutiva de múltiplas inserções e deleções, bem como substituições únicas de bases. Como o alinhamento para análises filogenéticas assume homologias para as bases da mesma posição, e como grande parte dessas sequências apresentaram regiões muito variáveis, não foi possível inferir homologias.

Neste estudo, as análises das estruturas secundárias de regiões conservadas do ITS 16S-23S esclareceram as relações entre as linhagens na maioria dos grupos formados (grupos *Planktothrix*, *Porphyrosiphon*, I, II, III, V, VII e VIII), quando analisados individualmente, enquanto nos grupos IV e IX, essas relações permaneceram não resolvidas.

Da mesma forma, no grupo *Porphyrosiphon*, as estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 também corroboraram a filogenia construída com base no RNAr 16S. A região D1-D1' mostrou-se mais variada. As linhagens *Porphyrosiphon* sp.1 e *Porphyrosiphon* sp.2 apresentaram regiões Box-B e V3 com estruturas secundárias idênticas, embora tenham apresentados sequências diferentes, indicando a proximidade evolutiva entre essas linhagens. Assim como o RNAr 16S indicou a alta diversidade genética de *P. notarisii*, as estruturas das três regiões das linhagens dessa espécie apresentaram configurações distintas, sugerindo tratar-

se de uma espécie coletiva. Os dois marcadores moleculares mostraram os mesmos resultados e ambos refutaram os marcadores morfológicos.

Nos grupos I e II, as variações das estruturas secundárias das três regiões analisadas correspondem aos ramos internos formados, corroborando a filogenia construída para o grupo. Da mesma forma, as estruturas secundárias das três regiões analisadas apresentaram configurações correspondentes aos ramos internos, tanto no grupo VII como no grupo VIII.

No grupo III, as três regiões do ITS 16S-23S mostraram-se conservadas em todas as linhagens obtidas no *GenBank*, dando suporte ao RNAr 16S, que mostrou alta similaridade entre essas linhagens (99-99,6%).

As linhagens integrantes do grupo IX apresentaram ITS 16S-23S com estruturas secundárias bem diversificadas. Diferentemente dos demais grupos, não foi observada congruência entre os dois marcadores moleculares. Todas as linhagens do grupo IX sequenciadas neste estudo correspondem à espécie *Phormidium inundatum*, exceto *P. papyraceum* 31CP, e são morfológicamente similares às linhagens de *Wilmottia murrayi*. Embora o grupo IX seja morfológicamente bem definido, apresenta uma diversidade genética maior, evidenciada pela filogenia construída e pela diversidade de conformações das estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 do ITS 16S-23S, sugerindo que tais linhagens formam um complexo de espécies.

Analisando em nível específico, as linhagens estudadas refletem algumas incongruências entre os marcadores moleculares e morfológicos. Tais incongruências são observadas nos grupos *Porphyrosiphon*, I, II, III, IV, V e IX.

Os grupos *Porphyrosiphon* e IX apresentaram uma variação morfológica menor que a molecular (RNAr e ITS 16S-23S). As seis linhagens de *Porphyrosiphon* (página 98) organizaram-se em um clado, como esperado, embora sem suporte robusto. As linhagens *Porphyrosiphon* sp.1 e *Porphyrosiphon* sp.2, morfológica e geograficamente distintas entre si,

formaram um clado com alto suporte e geneticamente próximos (alta similaridade do RNAr 16S). As linhagens identificadas como *P. notarisii* (55CP, 56CP, 57CP e 58CP) exibiram maior variação do RNAr 16S (94,9-98,9% de similaridade) e das estruturas secundárias do ITS 16S-23S que o observado nos outros grupos da análise, a despeito de terem se agrupado em um ramo com alto suporte, de terem morfologia muito semelhante e de terem sido coletas em áreas geograficamente próximas (noroeste paulista). Estes resultados sugerem que *P. notarisii* pode abrigar espécies crípticas, pois exibe uma diversidade genética maior que a morfológica. O grupo-irmão, composto por *Porphyrosiphon* sp.1 e sp.2, provavelmente se trata de um gênero distinto, no qual as duas linhagens representam duas espécies morfológica e geneticamente diferentes

Diferentemente, a diversidade morfológica exibida pelas linhagens do grupo I, II e V é grande e não congruente com a organização dos ramos internos destes grupos.

Linhagens de *Phormidium formosum* e *P. cf. formosum* posicionaram-se em diferentes ramos na árvore filogenética (grupos III e IV, páginas 108 e 111, respectivamente), e, embora não se descarte a ideia de possíveis erros de identificação de algumas linhagens, fica evidente que a diversidade genética é maior que a morfológica. O mesmo foi observado para as linhagens de *P. cf. uncinatum* e *P. tergestinum*.

Nos grupos VII e VIII, foi possível observar relação entre a filogenia construída, as estruturas secundárias do ITS 16S-23S e os caracteres morfológicos. No grupo VII (página 122), a topologia da árvore mostrou quatro ramos internos que corresponderam às identificações das quatro espécies (*Phormidium aerugineo-caeruleum*, *P. retzii*, *P. tergestinum* e *Phormidium* sp.5) com base nos caracteres morfológicos e estas espécies apresentaram estruturas secundárias do ITS 16S-23S distintas (página 128).

Em relação a *Phormidium aerugineo-caeruleum* (página 123), os resultados indicam que populações europeias (Espanha) e brasileiras são geneticamente próximas (com alta

similaridade do RNAr 16S) e estruturas secundárias do ITS 16S-23S conservadas, indicando pertencerem à mesma espécie. Resultados assim refutam a ideia de que a distribuição geográfica é um fator limitante para a delimitação de espécies.

Phormidium retzii é considerada uma espécie cosmopolita e com uma ampla variação morfológica (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Geitler (1932) comenta que a variação atribuída a espécie indica que esta se trata de uma espécie coletiva e, segundo CASAMATTA et al., (2003), a gama de *habitats* na qual a espécie já foi relatada e o grau de variabilidade do RNAr 16S de populações da América do Norte refletem a coletividade da espécie. Gomont (1892), entretanto, salienta que *P. retzii* apresenta grande variação no diâmetro do tricoma e do comprimento relativo das células, o que é um fato comum nas espécies com ampla distribuição geográfica. Diferentemente do esperado, as cinco linhagens de *P. retzii* estudadas constituíram um clado robusto, RNAr 16S pouco variável e estruturas secundárias do ITS 16S-23S conservadas, indicando que as populações brasileiras aqui analisadas tratam-se de uma única espécie genética e morfológicamente bem definida.

Igualmente, no grupo VIII (página 129), os cinco ramos formados nas análises do RNAr 16S corresponderam às identificações das espécies (*Phormidium crouanii*, *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2, *Phormidium* sp.3 e *Phormidium* sp.4) e estas apresentaram estruturas secundárias distintas entre si (Figuras 48 e 49, páginas 132 e 133). *Phormidium* sp. B-Tom agrupou-se com as linhagens de *Phormidium* sp.4, e a alta similaridade entre suas sequências de RNAr 16S, aliada ao fato de apresentarem estruturas secundárias idênticas indicam que pertencem à mesma espécie.

Muitos estudos vêm mostrando que os critérios morfológicos tradicionalmente usados para separar gêneros e espécies não são relacionados com padrões filogenéticos (HROUZE et al., 2005; RAJANIEMI et al., 2005a; 2005b; WILLAME et al., 2006, SIEGESMUND et al., 2008; STRUNECKY et al., 2010, entre outros). Embora as análises morfológicas e moleculares

apresentadas neste estudo reflitam uma pequena parte da diversidade de Phormidioideae e, como consequência, de Cyanobacteria, os resultados produzidos corroboram outros estudos, já que demonstram que a filogenia do grupo ainda não está bem definida. Grande parte desses problemas pode ser atribuído à morfologia relativamente simples desses organismos, além da plasticidade morfológica relacionada a fatores ambientais, o que torna Phormidioideae/Cyanobacteria um grupo taxonomicamente complexo (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005).

Os dados apresentados evidenciam que as relações evolutivas entre os integrantes do grupo abordado ainda são pouco compreendidas e permitem avaliar que ainda são necessários estudos complementares, utilizando novos marcadores e incluindo mais linhagens, para a obtenção de filogenias robustas. De qualquer forma, os resultados gerados neste trabalho revelam a grande diversidade, tanto morfológica como genética, das Phormidioideae, e devem contribuir significativamente com estudos para a reestruturação de gêneros e espécies desta importante subfamília de Cyanobacteria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, R.M.M.; GARCIA-PICHEL, F.; HERNANDEZ-MARINE, M. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. **Archives of Microbiology** v. 177, n. 5, p. 361-370, 2002.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BAURAIN, D.; RENQUIN, L.; BRUBISIC, S.; SCHELDEMAN, P.; BELAY, A.; WILMOTTE, A. Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ("Spirulina"), (Cyanophyceae/Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-years-old dried samples from Africa. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 384-393, 2002.
- BERRINI, C.C.; APPOLONIA, F.; VALLE, L. D.; KOMÁREK, J.; ANDREOLI, C. Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from the Euganean thermal spring (Padua, Italy). **Algological Studies**, v. 113, n. 5, p. 73-85, 2004.
- BOYER, S.L.; FLECHTNER, V.R.; JOHANSEN, J.R. Is the ITS 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for the use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution** v. 18, n. 6, p. 1057-1069, 2001.
- BOYER, S.L.; JOHANSEN, J.R.; FLECHTNER, V.R.; HOWARD, G.L. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based in 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.; 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.
- CASAMATTA, D.A.; VIS, M.L.; SHEATH, R.G. Cryptic species in cyanobacterial systematic: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Aquatic Botany**, v. 77, n. 4, p. 295-309, 2003.
- CASTENHOLZ, R.W. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic photosynthetic bacteria. In: BOODE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2° Ed. New York, Springer. 2001. v.1, p. 474-487.
- CHATCHAWAN, T.; KOMÁREK, J.; STRUNECKY, O. SMARDA, J.; PEERAPORNPIPAL, Y. *Oxymena*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). **Cryptogamie Algologie** v. 33, n. 1, p. 41-59, 2012.
- DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research. 686p. 1959.

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

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

FLECHTNER, V.R.; BOYER, S.L.; JOHANSEN, J.R.; DeNOBLE, M. *Spirirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. **Nova Hedwigia** v. 47, n. 1-2, p. 1-24, 2002.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, K.D.; JURTSCHUK, P.J. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Journal of Systematic Bacteriology** v. 42, p. 166-170, 1992.

GARCIA-PICHEL, F.; LOPEZ-CORTEZ, A.; NUBEL, U. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.4, p. 1902-1910, 2001.

GARCIA-PICHEL, F.; NUBEL, U.; MUYZER, G. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. **Archives of Microbiology** v. 169, n. 6, p. 469-482, 1998.

GARDNER, N.L. New Myxophyceae from Porto Rico. **Memoirs of New York Botanical Garden**, v. 7, p.1-444, 1927.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: Rabenhorst's **Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz**. 2. Aufl. Leipzig, Akademische. Verlagsgesellschaft. v. 14, 1196p. 1932.

GIOVANNONI, S.J.; TURNER, S.; OLSEN, G.J.; BARNS, S.; LANE, D.J.; PACE, N.R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 8, p. 3584-3592, 1988.

GOMONT, M.M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). **Annales des Sciences Naturelles: Botanique**, sér. 7, v. 15, p. 263-368; v. 16, p. 91-264; 1892.

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

GUGGER, M.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 54, n. 2, p. 349-357, 2004.

HASLER, P.; DVORAK, P.; JOHANSEN, J.R.; KITNER, M.; ONDREJ, V.; POULICKOVA, A. Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). **Fottea**, v. 12, n. 2, p. 341-356, 2012.

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

HONDA, D.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of Five marine *Synechococcus* strains. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 6, p. 723-739, 1999.

HROUZE, P.; VENTURA, S.; LUKESOVÁ, A.; MUGNAI, M.A.; TURICCHIA, S.; KOMÁREK, J. Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and phenotypic variability. **Algological Studies** 117(1): 251-264, 2005.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 745-755, 2001.

ISHIDA, T.; WATANABE, M.M.; SUGIYAMA, J. and YOKOTA, A. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology** 201: 79-82, 2001.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N.T.; HERDMAN, M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 146, p. 1275-1286, 2000.

JOHANSEN, J.R.; KOVACIK, L.; CASAMATTA, D.A.; FUCIKOVÁ, K.; KASTOVSKY, J. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). **Nova Hedwigia**, v. 92, n. 3-4, p. 283-302, 2011.

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. Recente changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia** v. 639, p. 245-259, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota 1. Teil: Oscillatoriales**. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G; SCHAGERL, M. (Eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Heidelberg: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759p.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. **Czech Phycol.**, Olomouc, v. 4, p. 1-18, 2004.

LOKMER, A. **Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria)**. 2007. 61 f. Dissertação, University of South Bohemia, České Budejovice.

LUDWIG, W.; KLENK, H.P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematic. In: BOODE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology** 2° Ed. New York, Springer. 2001. V.1, p. 49-65.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Review** v. 15, p. 155-173, 1994.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, N.; WEISENBERGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 554-568, 1998.

MANEN, J.F.; FALQUET, J. The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 861-867, 2002.

MARQUARDT, J.; PALINSKA, K.A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 5, p. 397-413, 2007.

MORO, I.; RASCIO, N.; LA ROCCA, N.; SCIUTO, K.; PATRIZIA, A.; BRUNO, L.; ANDREOLI, C. Polyphasic characterization of a thermo-tolerant filamentous cyanobacterium isolated from the Euganean thermalmuds (Padua, Italy). **European Journal of Phycology**, v. 45, n. 2, p. 143-154, 2010.

NADEAU, T.L.; MILBRANDT, E.C.; CASTENHOLZ, R.W. Evolutionary relationships of cultivated Antarctic oscillatorians (Cyanobacteria), **Journal of Phycology** v. 37, n. 4, p. 650-654, 2001.

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

NELISSEM, B.; WILMOTTE, A.; NEEFS, J.M.; DE WACHTER, R. Phylogenetic relationships among filamentous helical Cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. **Systematic & Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 206-210, 1994.

NICHOLS, H.W. Growth media – freshwater. In: STEIN J.R. **Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 7–24, 1973.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 3327-3332, 1997.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal** v. 7, p. 113-123, 1993.

OTSUKA, S.; SUDA, S.; LI, R.H.; WATANABE, M.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. **FEMS Microbiology Letters** v. 164, n. 1, p. 119-124, 1998.

PALINSKA, K.A.; MARQUARDT, J. Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale*. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 325-335, 2008.

PFEIFFER, C.; PALINSKA, K.A. Characterization of marine *Phormidium* isolates- conformity between molecular and ecophysiological results. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 591-598, 2002.

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

RAJANIEMI, P.; HROUZEK, P.; KASTOVSKÁ, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 11-26, 2005a.

RAJANIEMI, P.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K.; SIVONEN, K. (2005b): Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. **Algological Studies** (Cyanobacterial Research 6) 117: 371-391, 2005b.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.4. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.

RIPPKA, R.; CASTENHOLZ, R.W.; HERDMAN, M. Subsection IV. (Nostocales). In: BOODE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2° Ed. New York, Springer. 2001. v. 1, p. 562-589.

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

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

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 60, n. 1-2, p. 19-58, 1995.

SCIUTO, K.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N.; LA ROCCA, N.; MORO, I. Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). **Cladistics** v.1, p. 1-18, 2011.

SIEGESMUND, M.A.; JOHANSEN, J.R.; KARSTEN, U.; FRIEDL, T. *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. **Journal of Phycology** v. 44, p. 1572-1585, 2008.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a for place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STRUNECKY, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? **Polar Biology** v. 33, p. 1419-1428, 2010.

STRUNECKY, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "*Phormidium*" *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. **Fottea**, v. 11, n. 1, p. 57-71, 2011.

STRUNECKÝ, O.; KOMÁREK, J.; ELSTER, J. Biogeography of *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) in western and central Spitsbergen. **Polish Polar Research**, v. 33, n. 4, p. 369-382, 2012.

STRUNECKÝ, O.; KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J.; LUKESOVÁ, A.; ELSTER, J. Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, 2013.

SUDA, S.; WATANABE, M.M.; OTSUKA, S.; MAHAKAHANT, A.; YONGMANITCHAI, W.; NOPARTNARAPORN, N.; LIU, Y.D.; DAY, J.G. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriid cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1577-1595, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TATON, A. GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5157-5169, 2003.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.R.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 6, p. 1257-1270, 2006.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix. **Nucleic Acids Research** v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THU, N.K.; TANABE, Y.; YOSHIDA, M.; MATSUURA, H.; WATANABE, M.M. *Aerosakkonema funiforme* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales), a new gas-vacuolated oscillatoriid cyanobacterium isolated from a mesotrophic reservoir. **Phycologia**, v. 51, n. p. 672-683, 2012.

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

WAINE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.; KANDLER, A.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MORRE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; SATRR, M.P.; TRUPER, H.G. Reporta of the Ad Hoc Committee on

reconciliation of approaches to bacterial systematic. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

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

WILMOTTE, A. Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.) The molecular biology of Cyanobacteria. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1994. cap. 1, p. 1-25.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogentic relationships among Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Volume 1. Spreinger-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg, 2001, 721p.

WOESE, C.R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews** v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 87, n. p. 4576-4579, 1990.

ZHANG, X.H.; ZHANG, X.C.; SHIRAIWA, Y.; MAO, Y.X.; SUI, Z.H.; LIU, J.J. Cloning and characterization of *hoxH* genes from *Arthrospira* and *Spirulina* and application diversity in a shallow eutrophic lake. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 365-377, 2005.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n.13, p. 3406-3415, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Os objetivos deste estudo foram atingidos e a todas as hipóteses formuladas foram confirmadas. Dos dez gêneros de Phormidioideae, quatro são registrados neste estudo e *Phormidium* foi o gênero mais bem representado, totalizando 22 espécies relatadas.

Das 27 espécies relatadas, *Phormidium animale* corresponde a novo registro de ocorrência para o Brasil e 11 permanecem sem identificação, representando novas espécies; ambos os fatos corroboram a hipótese apresentada no projeto de constatação de novos registros de ocorrência e de novas espécies para a ciência, estas que serão propostas em breve. Além das novas espécies, as análises moleculares relatam sete novos gêneros para a ciência.

Estudos morfológicos e moleculares reforçam que a circunscrição das espécies de Phormidioideae ainda é bastante confusa, especialmente daquelas pertencentes ao gênero *Phormidium*. Os marcadores morfológicos utilizados não refletem a história evolutiva do grupo e os dados moleculares existentes ainda são insuficientes para uma proposição de uma filogenia adequada aos diferentes níveis.

Grande parte das sequências disponíveis para o grupo diz respeito ao gene RNAr 16S e este marcador mostrou-se pouco informativo para níveis taxonômicos infragenéricos. O banco de dados possui um número menor de sequências do espaçador intergênico 16S-23S, impossibilitando uma análise mais profunda entre espécies filogeneticamente mais próximas.

As análises das estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 corroboraram a filogenia construída com base no RNAr 16S, embora não tenha sido possível construir filogenia com base no ITS 16S-23S para o grupo como um todo.

A formação de dois clados (grupos IV e VIII) compostos apenas por linhagens brasileiras reforça a ideia de que regiões tropicais abrigam uma flora diversa e pouco conhecida. Além disso, a topologia da árvore filogenética construída, na qual foram formados vários clados internos com alto suporte e que contêm espécies brasileiras, indica que uma alta diversidade

genética de Phormidioideae e, conseqüentemente, de Cyanobacteria, foi acessada. Deve-se destacar que grande parte desses clados corresponde a novos gêneros para a ciência, em função das interpretações modernas que implicam em análises combinadas de diferentes caracteres.

Embora alguns grupos formados tenham apresentado suporte morfológico e molecular, parte dos clados não mostrou tal congruência em nível específico, indicando que novos dados precisam ser gerados para uma melhor resolução taxonômica desse grupo.

Fica evidente o valor taxonômico dos marcadores moleculares utilizados e estes devem ser considerados a base para a construção da classificação de Phormidioideae e, conseqüentemente, de Cyanobacteria.

Em relação aos marcadores morfológicos, estes são informativos em alguns casos e não informativos em outros, sendo o caráter ápice do tricoma importante na delimitação de táxons genéricos. Dimensões celulares e características das células apicais são relevantes na delimitação de espécies em algumas linhagens. É importante salientar que não existe, até agora, um padrão que seja aplicável para a subfamília em sua totalidade, já que, no momento em que linhagens distintas são originadas a partir de um mesmo ancestral, a história evolutiva de cada uma será diferente e independente em função das pressões específicas a que estará submetida. Dessa forma, um caráter que é informativo em uma, não necessariamente será informativo na outra.

Aparentemente, a distribuição geográfica não é fator limitante para circunscrição de táxons. Exceto nos grupos IV e VIII, que são compostos apenas por linhagens brasileiras, não foi observada tendência de agrupamento de linhagens de mesma origem geográfica e alguns clados considerados robustos (p.ex. grupo IX) incluem linhagens de procedências e ambientes muito distintos. Esse estudo pode ser considerado um ponto de partida para uma avaliação geograficamente mais abrangente de Phormidioideae e fornece subsídios para estudos futuros com o grupo que, com certeza, são extremamente necessários.