



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Buch

**Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias
bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo**

São José do Rio Preto
2019

Bruna Buch

**Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias
bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, 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.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco

São José do Rio Preto
2019

Buch, Bruna.

Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo / Bruna Buch. -- São José do Rio Preto, 2019

189 f.: il., tabs.

Orientador: Luis Henrique Zanini Branco

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Cianobactéria - São José do Rio Preto, Região de (SP) - Classificação. 3. Filogenia. 4. Marcadores genéticos. 5. Cianotoxinas. I. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Buch

**Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias
bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, 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.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Célia Leite Sant’Anna
Instituto de Botânica – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Marli de Fátima Fiore
CENA/USP – Câmpus de Piracicaba

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa de Paiva Azevedo
Instituto de Botânica – São Paulo

Dr. Diego Bonaldo Genuário
EMBRAPA Meio Ambiente – Jaguariúna

São José do Rio Preto
05 de dezembro de 2018

*Para os fascinantes seres por nós
denominados **cianobactérias**, dedico.*



AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos os professores que fizeram parte do meu processo educacional nos últimos 30 anos, desde 1988, quando iniciei meus estudos na Escola Estadual Maria de Lourdes Silveira Cosentino. Ainda me lembro dos rostos e das vozes das professoras. A professora Marizete que me ensinou sobre disciplina e o respeito ao espaço coletivo e a professora Maria Aparecida que me ensinou sobre acolhimento e perseverança, foi dela que recebi o poema em destaque na epígrafe (traduzido para o português) quando conclui a quarta série do antigo primário. Desde então, tenho recebido de dezenas de professores, informações, ensinamentos, orientações, sabedorias, conselhos, críticas e elogios, que contribuíram para a formação do meu caráter e da minha identidade como profissional.

Agradeço aos meus pais, Luiz Antonio e Maria Helena, por todos os esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui. Pela memória de meu pai, que com muito custo me tirava da cama cedo e não me deixava faltar a escola, nem quando eu simulava uma febre. Pela memória de minha mãe, que com determinação me estimulou a prestar o vestibular e me sustentou durante os anos da minha graduação e mestrado, meu exemplo de força e amor. Sem eles a luz do conhecimento não brilharia em minha vida.

Agradeço às minhas tias, primos e primas, minhas irmãs Beatriz e Bianca, e toda minha família que sempre esteve ao meu lado nos momentos de perdas e nos momentos de conquistas e alegrias.

Agradeço ao Gabriel Lourenço Brejão, meu companheiro de vida, meu amigo, por sempre me apoiar em tudo, por ouvir os meus lamentos com paciência, acolher minhas dores e medos com amor, rir de bobagens quando eu preciso relaxar e pelas críticas necessárias em meus momentos de confusão. Agradeço a família Brejão, Walmir e Avani, por me acolher com tanto carinho e por toda alegria e amor que compartilham conosco.

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco, por me receber em seu laboratório nos últimos quatro anos, pela confiança, paciência, amizade, pelos conhecimentos compartilhados e por todo suporte necessário às minhas coletas, cultivos, análises e redações de artigos, e por sempre mostrar que os manuscritos podiam ser melhorados.

Agradeço aos colegas que me receberam no B.E.T.A: Nádia, Mariéllen, Monica, Náthali, Natália, Marcella, Douglas e Anna, pelos momentos compartilhados, pelos cafés que eu não tomei, por tudo que me ensinaram e pelo apoio que me deram. Agradeço especialmente à Mariéllen, pelas coletas, pelas longas conversas filosóficas, por tudo que me ensinou e pela

parceria nas análises e artigos. Agradeço à Náthali por toda ajuda nos isolamentos das cepas e análises moleculares, e por permitir que eu praticasse a habilidade de ouvir (tantas conversas!).

Agradeço à Maria Angélica, por concordar em se perder comigo pelo sertão do noroeste paulista atrás de reservatórios para coletar.

Agradeço ao Prof. Dr. Orlando Necchi Jr., pelo compartilhamento do espaço, dos equipamentos e reagentes utilizados para a realização deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Lilian Casatti, por nos emprestar a sonda multiparâmetros e à Prof. Dra. Maria Stela Castilho Noll por compartilhar o uso da sonda conosco.

Agradeço à Profa. Dra. Eleni Gomes, pelo conhecimento proporcionado durante as disciplinas, por permitir o acesso ao seu laboratório para a extração das toxinas e pelos conselhos e orientações oferecidos. Agradeço também a todos os alunos e pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

Agradeço à Profa. Dra. Paula Rahal e ao Laboratório de Estudos Genômicos, pelo acesso aos equipamentos e reagentes emprestados.

Agradeço à Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pelo empréstimo das cepas de cianobactérias tóxicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato José Reis Molica, por todas as instruções à distância referentes à extração de toxinas, por me receber em seu laboratório, em sua família, e por todo conhecimento compartilhado na UFRPE para a realização das análises cromatográficas.

Agradeço à Dra. Marise Marques, por me receber em sua casa em Garanhuns durante o tempo em que trabalhei na UFRPE, por ser minha guia turística e por todo carinho dispensado em tão pouco tempo de convivência.

Agradeço aos amigos do CEBB Rio Preto, por me apresentarem à meditação e pelas conversas em roda tão necessárias em tempos desafiadores.

Agradeço ao Departamento de Zoologia e Botânica e aos seus colaboradores pelo apoio e por toda infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia (IBILCE/UNESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil- (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“If you can’t be a pine on the top of the hill,
Be a scrub in the valley – but be
The best little scrub by the side of the hill;
Be a bush, if you can’t be a tree.
If you can’t be a bush, be a bit of the grass,
And some highway happier make;
If you can’t be a muskie, then just be a bass-
But the liveliest bass in the lake!
We can’t all be captains, we’ve got to be crew,
There’s something for all of us here.
There’s big work to do and there’s lesser to do
And the task we must do is the near.
If you can’t be a highway, then just be a trail,
If you can’t be the sun, be a star;
It isn’t by size that you win or you fail-
Be the best of whatever you are!”

Douglas Malloch

RESUMO

As cianobactérias são importantes componentes das comunidades aquáticas em diversos ecossistemas, graças a longa história evolutiva do grupo que desenvolveu diversas adaptações fisiológicas e citológicas que permitiram a sua dominância ao redor do globo. As cianobactérias são também as bactérias fotossintetizantes com a morfologia mais diversificada e, embora essa qualidade tenha sido extensivamente utilizada pelos cientistas para a delimitação dos táxons e reconstrução da história evolutiva, vem perdendo cada vez mais espaço para o uso de marcadores moleculares, os quais são capazes de inferir relações filogenéticas mais robustas e que mais proximamente refletem o percurso evolutivo traçado por esses microrganismos. Desse modo, o objetivo da realização deste estudo foi caracterizar taxonomicamente populações de cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo, utilizando uma abordagem polifásica, por meio do uso do gene rRNA 16S e da estrutura secundária do ITS 16S-23S, além de considerar aspectos morfológicos e ecológicos. Como resultado deste trabalho, 41 populações de cianobactérias bentônicas foram avaliadas, sendo alocadas em 15 gêneros distribuídos em 11 famílias e cinco ordens. A ordem Oscillatoriales foi a mais representativa entre as populações estudadas (68,3%, 28 populações), seguida pela ordem Synechococcales (19,5%, 8 populações). A análise filogenética do gene rRNA 16S foi capaz de revelar a presença de táxons crípticos, que embora apresentem morfologia correspondente com táxons já descritos, formaram clados separados, indicando se tratarem de táxons ainda não conhecidos, e esse foi o caso de 13 populações aqui estudadas. Parte dos táxons crípticos foi trabalhada em maior profundidade, resultando em três manuscritos apresentados na forma de capítulos que correspondem à descrição dos novos gêneros e espécies *Koinonema pervagatum* (Capítulo III) e *Blennothricopsis periphytica* (Capítulo IV), além da descrição de três novas espécies para o gênero *Phormidium* (Capítulo V), com o registro da

primeira espécie bentônica produtora de microcistina para o estado de São Paulo. Embora a prospecção dos genótipos tóxicos, utilizando marcadores específicos para os genes *mcyE* e *sxtA* responsáveis pela síntese de microcistinas e saxitoxinas, respectivamente, tenha revelado apenas uma linhagem tóxica, esse resultado é positivo do ponto de vista de impactos relacionados à presença de cianobactérias em corpos d'água para uso público. Entretanto, mostra a importância dos estudos de prospecção de toxinas em cianobactérias bentônicas no Brasil, ainda pouco explorados.

Palavras-chave: RNAr 16S. 16S-23S ITS. Filogenia. Cianotoxina.

ABSTRACT

Cyanobacteria are important components of aquatic communities in different ecosystems, thanks to its long evolutionary history that provided several physiological and ecological adaptations, allowing them to spread around the globe. Cyanobacteria are also the most morphological diversified photossintetic bacterial group and, despite many taxonomists have extensively used this character to delimit taxa and to reconstruct their evolutionary history, it has been losing its prominence to molecular markers, which are most suited to infer robust phylogenetic relationships that properly reflect the evolutionary path followed by these organisms. Therefore, the aim of the study was to taxonomically characterize benthic cyanobacterial populations in lentic habitats from the Northwest region of São Paulo state, using a polyphasic approach, through the phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene and the 16S-23S ITS secondary structure, aside from morphological and ecological aspects. As result, 41 benthic cyanobacterial populations were evaluated and assigned to 15 genera distributed in 11 families and five orders. The Oscillatoriales order was the most representative among all (69.3%, 28 populations), followed by the Synechococcales (19.5%, eight populations). The 16S rRNA phylogenetic analysis revealed the presence of cryptotaxa, which, despite morphologically resembling previously described taxa, formed separated clades, suggesting not yet acknowledged taxa. That was the case of 13 populations studied. Some of these cryptotaxa were deeper evaluated in three manuscripts presented here as chapters and described as the new genera and species *Koinonema pervagatum* (Chapter III) and *Blennothricopsis periphytica* (Chapter IV), the description of three new species from the *Phormidium* genus (Chapter V) and the first record of a benthic microcystin producing cyanobacteria in the São Paulo state. Although the toxic genotypes prospection using specific molecular markers for the *mcyE* and *sxtA* genes, responsible for microcystin and saxitoxin production, respectively,

revealed only one toxic strain, it demonstrates a positive result regarding the impact caused by toxic cyanobacterial strains in waters for public use worldwide. However, it highlights the importance of studies on potentially toxic benthic cyanobacterial communities, still little explored in Brazil.

Keywords: 16S rRNA. 16S-23S ITS. Phylogeny. Cyanotoxin.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Considerações gerais

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19

CAPÍTULO II – Cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos do noroeste do estado de São Paulo

1	INTRODUÇÃO	33
2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

CAPÍTULO III - A widespread cyanobacterium supported by polyphasic approach: proposition of *Koinonema pervagatum* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales)

1	RESUMO	97
2	INTRODUÇÃO	98
3	MATERIAL E MÉTODOS	99
4	RESULTADOS	102
5	DISCUSSÃO	110
6	REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO IV - *Blennothricopsis periphytica* sp. gen. et sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a new cryptic cyanobacterial genus

1	RESUMO	120
2	INTRODUÇÃO	121
3	MATERIAL E MÉTODOS	123
4	RESULTADOS	126
5	DISCUSSÃO	132
6	REFERÊNCIAS	137

CAPÍTULO V – New *Phormidium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) species from Brazil: documentation of a microcystin producer strain

1	RESUMO	145
2	INTRODUÇÃO	146
3	MATERIAL E MÉTODOS	148
4	RESULTADOS	153
5	DISCUSSÃO	168
6	REFERÊNCIAS	174

CAPÍTULO FINAL

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS	182
REFERÊNCIAS	183

CAPÍTULO I – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de formas de vida na natureza está relacionada ao surgimento e estabelecimento das cianobactérias, bactérias que realizam fotossíntese oxigênica e que foram os responsáveis pelo acúmulo do gás oxigênio na atmosfera terrestre (MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., STAHL, D.A., CLARK, 2012). Estima-se que as cianobactérias divergiram há 2,7 bilhões de anos, a partir de um ancestral anaeróbico fototrófico, e, desde então, conquistaram os mais diversos habitats, graças à grande capacidade adaptativa inerente às bactérias (LEE, 1999; MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., STAHL, D.A., CLARK, 2012, SCIUTO & MORO 2015). A conquista dos ambientes aquáticos e terrestres, bem como de regiões de clima extremo como desertos, geleiras e fontes termais, é consequência de uma série de adaptações fisiológicas, citológicas e morfológicas, e que podem apresentar importância econômica, tanto pelo impacto prejudicial, como nas florações tóxicas, quanto pelos serviços ecossistêmicos prestados, como o sequestro de carbono, ou pela aplicação terapêutica de alguns componentes bioativos (SHARMA; RAI; STAL, 2014).

O conhecimento taxonômico atual sobre as cianobactérias é consequência do trabalho inicial dos taxonomistas clássicos, interessados em classificá-las segundo a sua forma e papel na natureza. Deste modo, as primeiras classificações foram baseadas principalmente em caracteres morfológicos e ecológicos e realizadas por botânicos, uma vez que esses organismos eram atribuídos a ordem Schizophyta, dentro de sistemas botânicos artificiais como o de Wettstein (1934), juntamente com outras bactérias não fotossintetizantes.

Botânicos como Agardh, Kützing e Gomont descreveram diversos gêneros e espécies de cianobactérias ao longo do século 19 baseados em sistemas artificiais, até a metade do século 20. Com o desenvolvimento de tecnologias que permitiram aprofundar o estudo das células e o reconhecimento das cianobactérias como separadas dos eucariotos fotossintetizantes, foi proposto por Stanier et al. (1978) que as cianobactérias fossem classificadas segundo o Código

Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (LAPAGE et al. 1975) e, então, Rippka et al. (1979) propuseram um código de classificação bacteriológica para o grupo.

Uma das exigências do Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (LAPAGE et al. 1975) para a descrição de novos táxons é o estabelecimento de culturas puras como testemunho e, nesse caso, o trabalho de Rippka et al. (1979) possibilitou que outros tipos de abordagens taxonômicas fossem utilizados nos organismos vivos cuja aplicação em materiais de herbário, como estabelecido pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (STAFLEU et al. 1972) naquela época, não eram viáveis.

A partir do desenvolvimento das técnicas de biologia celular e molecular, os parâmetros de definição taxonômica mudaram progressivamente do nível dos organismos para o nível celular e deste para o nível molecular. Assim, Woese et al. (1987) propuseram a divisão de toda a vida no planeta em três domínios com base no gene RNAr 16S: Archaea, Bacteria e Eucarya. Deste modo, as técnicas moleculares proporcionaram a construção de sistemas de classificação filogenéticos capazes de inferir as relações de parentesco e a história evolutiva dos organismos, principalmente daqueles com morfologia simples e poucos caracteres distintivos, como as bactérias.

Atualmente, a classificação das cianobactérias é feita segundo uma abordagem polifásica onde a avaliação genética, utilizando, principalmente, o gene RNAr 16S, além de outros genes, p.ex. *rpoC1* e *rbcL*, formam a base à qual outros critérios diagnósticos como a morfologia, a ecofisiologia e a ecologia são combinados (KOMÁREK, 2016). Stackebrandt & Goebel (2006), após observarem que duas linhagens de bactérias pertencentes a um mesmo gênero segundo a porcentagem de hibridização DNA-DNA, também compartilhavam uma similaridade de pelo menos 95% entre as sequências do RNAr 16S, propuseram esse valor de similaridade como critério para a separação entre dois gêneros, e como critério de separação de duas espécies, propuseram valores entre 98,7-99% de similaridade. Ainda, Kim et al. (2014)

consideraram adequado o valor de 98,65% de similaridade após realizarem um teste estatístico de validação cruzada de dois critérios para estabelecer um limite para diferenciação de duas espécies utilizando a similaridade genética entre sequências de rRNA 16S. Além disso, devido ao caráter conservativo do gene rRNA 16S, que em alguns casos não é suficiente para separar espécies muito próximas, outros marcadores, como a estrutura secundária de regiões do ITS 16S-23S, vem sendo utilizados para essa finalidade (ITEMAN et al., 2000).

Os estudos taxonômicos realizados desde o início do século 19 até os dias atuais têm permitido a reconstrução da história evolutiva das cianobactérias. De acordo com Schirmer et al. (2011), os dados acumulados sobre a diversidade morfológica do grupo e a obtenção de centenas de sequências do rRNA 16S têm demonstrado que a evolução das cianobactérias se deu não pelo aumento progressivo na complexidade de formas, das unicelulares para as multicelulares, mas sim por repetidas perdas e reaquisições da complexidade morfológica ao longo de bilhões de anos do processo evolutivo, tornando difícil o estabelecimento de linhagens monofiléticas com base nesse critério. Além disso, os autores observaram que a maior parte das linhagens de cianobactérias conhecidas atualmente possui um ancestral multicelular em comum, e que reversões de formas multicelulares para unicelulares e vice-versa teriam ocorrido para os gêneros *Synechococcus* e *Spirulina*, respectivamente.

Deste modo, a convergência morfológica de linhagens distintas sob condições ambientais similares tem resultado na descrição de novos táxons denominados crípticos. Segundo Komárek et al. (2014), os criptotáxons podem ser definidos como aqueles que apresentam uma certa diferença molecular, mas sem distinção morfológica suficiente. Este é o caso de diversos gêneros descritos recentemente ao redor do mundo (CHATCHAWAN et al., 2012; OSORIO-SANTOS et al., 2014; DVORÁK et al., 2015), cuja documentação se faz necessária para estimar efetivamente a biodiversidade do grupo, uma vez que essa tem sido

subestimada historicamente pela utilização apenas de caracteres morfológicos (DVOŘÁK et al., 2015; KOMÁREK, 2016; ROTT; PENTECOST; MAREŠ, 2018).

A diversidade morfológica e genética de cianobactérias é o resultado de bilhões de anos de adaptações a diferentes tipos de habitats ao redor do mundo. A presença desses microorganismos é notável quando condições ambientais favoráveis propiciam o crescimento rápido e massivo de populações de cianobactérias planctônicas na superfície de corpos de água doce ou salgada denominadas florações, ou na formação de extensos tapetes de cianobactérias bentônicas no fundo de lagos, riachos e ambientes costeiros marinhos. A dominância e o crescimento excessivo de cianobactérias nesses ambientes aquáticos são muitas vezes acompanhados da produção de metabólitos secundários tóxicos, responsáveis por diversos casos de intoxicação, e até mortes.

O primeiro caso documentado de intoxicação animal por ingestão de água contaminada por uma floração de cianobactéria ocorreu em 1878 e a população predominante encontrada pertencia à espécie *Nodularia spumigena* e, a partir daí diversos casos de intoxicação começaram a ser registrados (GORHAM, 1960; CARMICHAEL et al., 2001). Entretanto, a identificação dos principais metabólitos tóxicos encontrados em florações só foi realizada na década de 1980, classificando-os em citotóxicos, neurotóxicos e hepatotóxicos (CARMICHAEL, 1992). Desde então, especial atenção tem sido dedicada à detecção de toxinas em espécies planctônicas formadoras de florações no mundo todo e inclusive no Brasil, onde o monitoramento da densidade de cianobactérias e quantidades de cianotoxinas presentes em corpos d'água utilizados para abastecimento público é garantido por lei e está previsto na Portaria N° 2.914 do Ministério da Saúde de 12 de dezembro de 2011.

A Portaria N° 2.914/11 estabelece que a análise de cianotoxinas na água do manancial deve ser feita semanalmente quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células/mL. Entretanto, o monitoramento através de coleta feita com redes de plâncton acaba por

desconsiderar as espécies bentônicas. As cianobactérias bentônicas são aquelas encontradas em ambientes aquáticos rasos aderidas ao substrato, onde há a penetração de luz suficiente para o seu desenvolvimento, ocorrendo em comunidades que exibem complexas interações ecológicas entre espécies, podendo formar tapetes (*mats*) e sendo também encontradas aderidas às macrófitas ou a outras estruturas submersas, compondo a comunidade perifítica (STAL, 2012).

Ocorrências de intoxicação e morte de animais por cianobactérias bentônicas, bem como sua presença em reservatórios para abastecimento, já foram documentadas na Europa (Suíça), Oceania (Nova Zelândia), África (Egito) e América do Norte (Estados Unidos) (MEZ et al., 1996; HAMILL, 2001; MOHAMED; EL-SHAROUNY; ALI, 2006; IZAGUIRRE; JUNGBLUT; NEILAN, 2007; WOOD et al., 2010; HARLAND et al., 2014). As principais toxinas encontradas nesses estudos foram as microcistinas e as anatoxinas, produzidas por linhagens pertencentes aos gêneros *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anabaena* e *Nostoc*. No Brasil, espécies de cianobactérias bentônicas produtoras de toxinas foram relatadas para os gêneros *Fischerella* (FIORE et al., 2009), *Nostoc* (GENUÁRIO et al., 2010), *Geitlerinema*, *Cylindrospermum* e *Phormidium* (BORGES et al., 2015), e as toxinas observadas foram as microcistinas e as saxitoxinas.

Na região noroeste do estado de São Paulo, as cianobactérias bentônicas são componentes importantes da comunidade aquática. Necchi-Júnior et al. (1995) observaram que a presença de cianobactérias correspondeu a 35% da comunidade observada em 44 riachos do noroeste paulista, sendo identificadas populações alocadas nos gêneros *Calothrix*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Scytonema*. Branco et al. (2001) avaliaram especificamente as cianobactérias de 172 riachos de diferentes biomas do estado de São Paulo e observaram que a região noroeste do estado apresentou o maior número de táxons quando comparada aos biomas mata atlântica, floresta tropical, floresta subtropical, cerrado e regiões de água dura. Foram observadas 14 espécies na área, de um total de 34 para o estado.

Pereira e Branco (2010) analisaram a composição de cianobactérias de nascentes da região de São José do Rio Preto e observaram representantes das divisões Cyanophyta e Chlorophyta, sendo que a primeira correspondeu a 54% (seis espécies) dos táxons encontrados.

Deste modo, faz-se necessário o conhecimento das espécies que compõem as comunidades bentônicas também em ambientes lênticos, principalmente aqueles utilizados para o abastecimento público de água (reservatórios) e para recreação (lagoas e lagos ornamentais), e o potencial tóxico desses organismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

No Brasil, são escassos os trabalhos sobre a diversidade de cianobactérias bentônicas e seu potencial prejudicial referente a produção de toxinas em reservatórios de uso público. Deste modo, o trabalho tem como objetivo a caracterização taxonômica das cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo e a prospecção de cianotoxinas.

2.2 Específicos

1. Coleta e cultivo de amostras de cianobactérias bentônicas provenientes de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo.
2. Estudo morfológico das amostras de campo e de cultivos.
3. Caracterização molecular das cepas isoladas por meio de marcadores específicos.
4. A partir das cepas isoladas, avaliar a produção e/ou capacidade de produção das toxinas mais frequentemente produzidas por cianobactérias.

2.3 Hipóteses

Com base nos dados disponíveis em literatura é possível estabelecer as seguintes hipóteses de trabalho:

Hipótese 1: os grupos de cianobactérias mais frequentemente encontrados deverão ser os das Oscillatoriales e Synechococcales. Membros das ordens Nostocales, Pleurocapsales, Chroococcidiopsidales e Chroococcales deverão apresentar frequência de ocorrência inferior.

Hipótese 2: os estudos taxonômicos revelarão uma flora com ocorrências de espécies já descritas na literatura específica, mas novos táxons para a ciência deverão ser registrados.

Hipótese 3: espera-se o reconhecimento da existência de espécies crípticas, ou seja, de populações com similaridade com táxons já descritos em termos morfológicos, mas com diferenciação genética suficiente para caracterização de novos táxons para a ciência.

Hipótese 4: haverá registro de capacidade ou de produção efetiva de toxinas por algumas cepas encontradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A região Noroeste Paulista está localizada na bacia dos rios Turvo Grande e São José dos Dourados. Esta região era originalmente coberta por floresta estacional semidecídua (SILVA et al. 2007) e desde a metade do século 19 vem experienciando altas taxas de desmatamento para o cultivo de café e, mais tarde, para a criação de pastagens para a produção de gado (MONBEIG 1998). O solo da região é caracterizado por substratos não consolidados de areia/argila (IPT 1999) e o clima é tropical com temperaturas médias máximas entre 31 e 32°C e médias mínimas entre 13 e 14°C (SILVA et al. 2007).

A área de estudo compreendeu 17 ambientes lênticos (Tabela 1, Figura 1), distribuídos tanto em áreas urbanas, na forma de represas de abastecimento e lagos ornamentais, como em áreas rurais, na forma de lagoas para dessedentação animal e pesca recreativa (Figura 2). Para cada ambiente amostrado, foram tomados dados de posicionamento global e altitude (GPS

Garmin, modelo E-trex Vista), e parâmetros ambientais, tais como temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH (Tabela 1) foram avaliados para caracterização geral do ambiente.

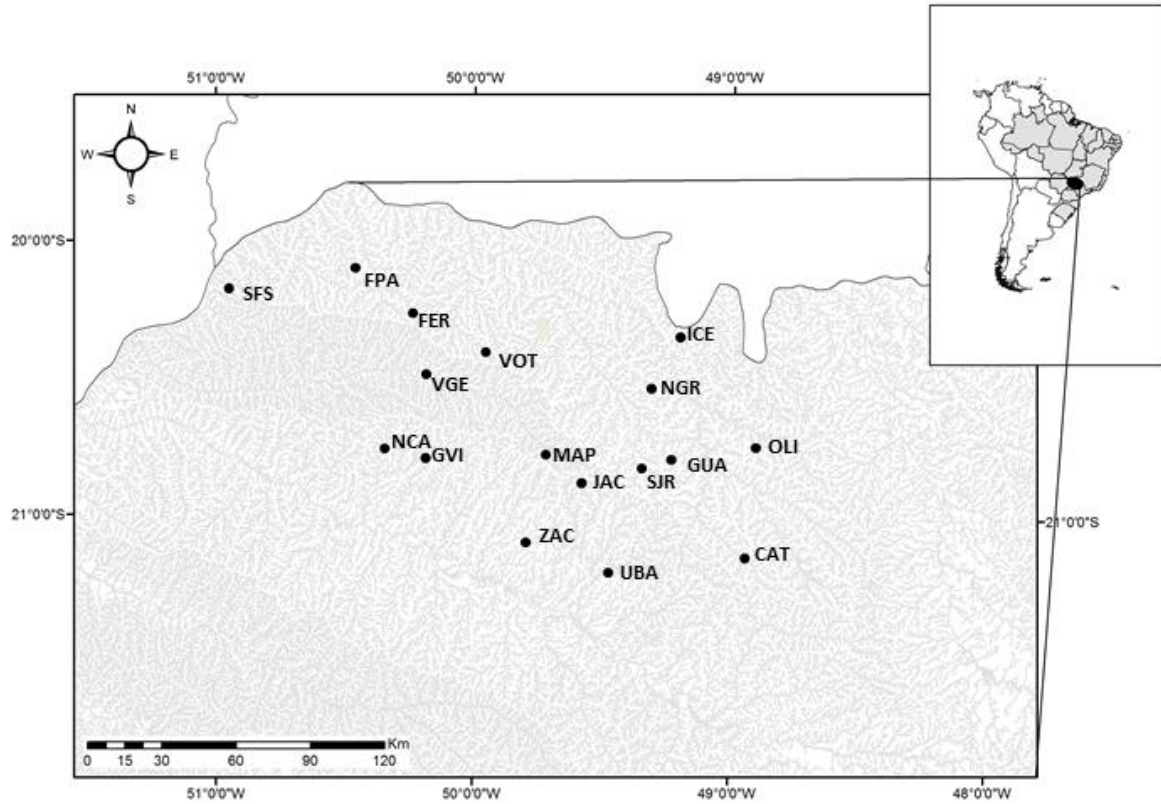


Figura 1. Distribuição dos locais de amostragem de cianobactérias bentônicas no noroeste paulista.



Figura 2. Imagens de alguns locais amostrados. A. Vertedouro na represa de Santa Fé do Sul. B. Represa de Votuporanga. C. Lago ornamental em Valentim Gentil. D. Lagoa em área rural em Ubarana.

Tabela 1. Descrição dos locais de amostragem de cianobactérias bentônicas do noroeste paulista.

Cidade	Data	Código	Coordenadas	Tipo de ambiente	Substrato	Temperatura da água (°C)	Condutividade (µS/cm)	Oxigênio dissolvido (%)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH
Catanduva	30/10/2016	CAT	S 21°09'01.9" O 48°56'29.4"	Represa	Sedimento	23,5	20	42,8	3,60	5,85
Fátima Paulista	04/06/2015	FPA	S20°06'05,7" O50°27'38,7"	Represa	Rocha	24,4	7	48,0	3,96	5,84
Fernandópolis	05/06/2015	FER	S20°15'58,3" O50°14'11,8"	Represa	Sedimento	24,5	22	68,3	5,70	7,22
Gastão Vidigal	24/09/2015	GVI	S 20°47'39.3" O 50°11'08.4"	Lagoa em área rural	Concreto (vertedouro)	27,6	11	15,1	1,92	6,49
Guapiaçu	26/09/2015	GUA	S 20°47'39.9" O 49°13'51.4"	Represa	Sedimento	25,5	10	90,5	7,4	6,72
Icém	18/08/2015	ICE	S20°20'48,9" O49°12'04,6"	Represa	Sedimento	24,5	6	41,7	3,55	6,41
Jaci	21/10/2015	JAC	S 20°52'53.9" O 49°34'44.7"	Lagoa em área rural	Rocha	27,6	7	68,9	5,42	6,16
Monte Aprazível	24/09/2015	MAP	S 20°46'46.3" O 49°43'04.9"	Lago ornamental	Rocha	28,9	11	20,2	5,20	7,04
Nova Castilho	24/09/2015	NCA	S 20°45'38.8" O 0°20'38.3"	Lagoa em área rural	Sedimento	27,4	10	-	-	8,09

Tabela 1. (conclusão)

Cidade	Data	Código	Coordenadas	Tipo de ambiente	Substrato	Temperatura da água (°C)	Condutividade (µS/cm)	Oxigênio dissolvido (%)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH
Nova Granada	18/08/2015	NGR	S20°32'09,4" O49°18'38,5"	Represa	Concreto (vertedouro)	22,0	11	13,0	1,12	6,23
Olímpia	30/10/2016	OLI	S 20°44'50,5" O 48°54'11,2"	Represa	Concreto (vertedouro)	21,8	11	60,1	5,37	6,37
Santa Fé do Sul	04/06/2015	SFS	S20°10'34,0" O50°56'59,5"	Represa	Concreto (vertedouro)	26,6	10	48,0	3,92	6,50
São José do Rio Preto	18/08/2015	SJR	S20°49'36,6" O 49°20'42,4"	Represa	Sedimento	21,9	8	41,3	3,61	6,99
Ubarana	21/10/2015	UBA	S 21°06'01,8" O 49°47'42,7"	Lagoa em área rural	Sedimento	28,0	8	91,2	7,81	7,14
Valentim Gentil	04/06/2015	VGE	S20°29'18,3" O50°11'07,3"	Lago ornamental	Sedimento	20,1	33	48,4	4,40	7,04
Votuporanga	05/06/2015	VOT	S20°24'25,9" O49°57'16,7"	Represa	Sedimento	22,9	11	42,6	3,68	6,47
Zacarias	21/10/2015	ZAC	S 21°03'15,5" O 50°02'51,6"	Represa	Sedimento	27,9	3	91,7	7,17	6,21

3.2 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas no período de maio a setembro de 2015 e de junho a outubro de 2016. Para obtenção de material bentônico, os crescimentos macroscópicos (submersos) (Figura 3) foram procurados aleatoriamente por caminhada junto à margem dos corpos d'água amostrados. Após encontrados, foram recolhidos com o auxílio de espátulas ou por meio da raspagem de substratos e armazenados em frascos transparentes para transporte ao laboratório. Parte do material coletado foi fixado em formaldeído 4% e depositado no Herbário SJRP (THIERS, 2018) para testemunho, e parte foi mantido vivo, sob refrigeração, e utilizado para as atividades de isolamento e cultivo.

3.3 Isolamento e cultivo

As massas macroscópicas foram observadas em microscópio estereoscópico (Zeiss) para análise das características gerais e, depois, os organismos foram estudados em microscópio fotônico Olympus BH2 e fotografados com câmera digital Sony DSC-W150, ajustada diretamente a ocular.

As amostras foram inoculadas sob condições assépticas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido BG-11 (RIPPKA et al., 1979) e os inóculos foram acondicionados em estufas incubadoras sob condições controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1$), irradiância ($50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoper\u00edodo (14h luz e 10h escuro). Ap\u00f3s a observa\u00e7\u00e3o do crescimento das cianobact\u00e9rias nos meios de cultura, os procedimentos para isolamento das linhagens foram realizados com o m\u00e9todo de “pescaria” com pipeta tipo Pasteur, sob microsc\u00f3pio fot\u00f4nico invertido Leica DMIL LED.

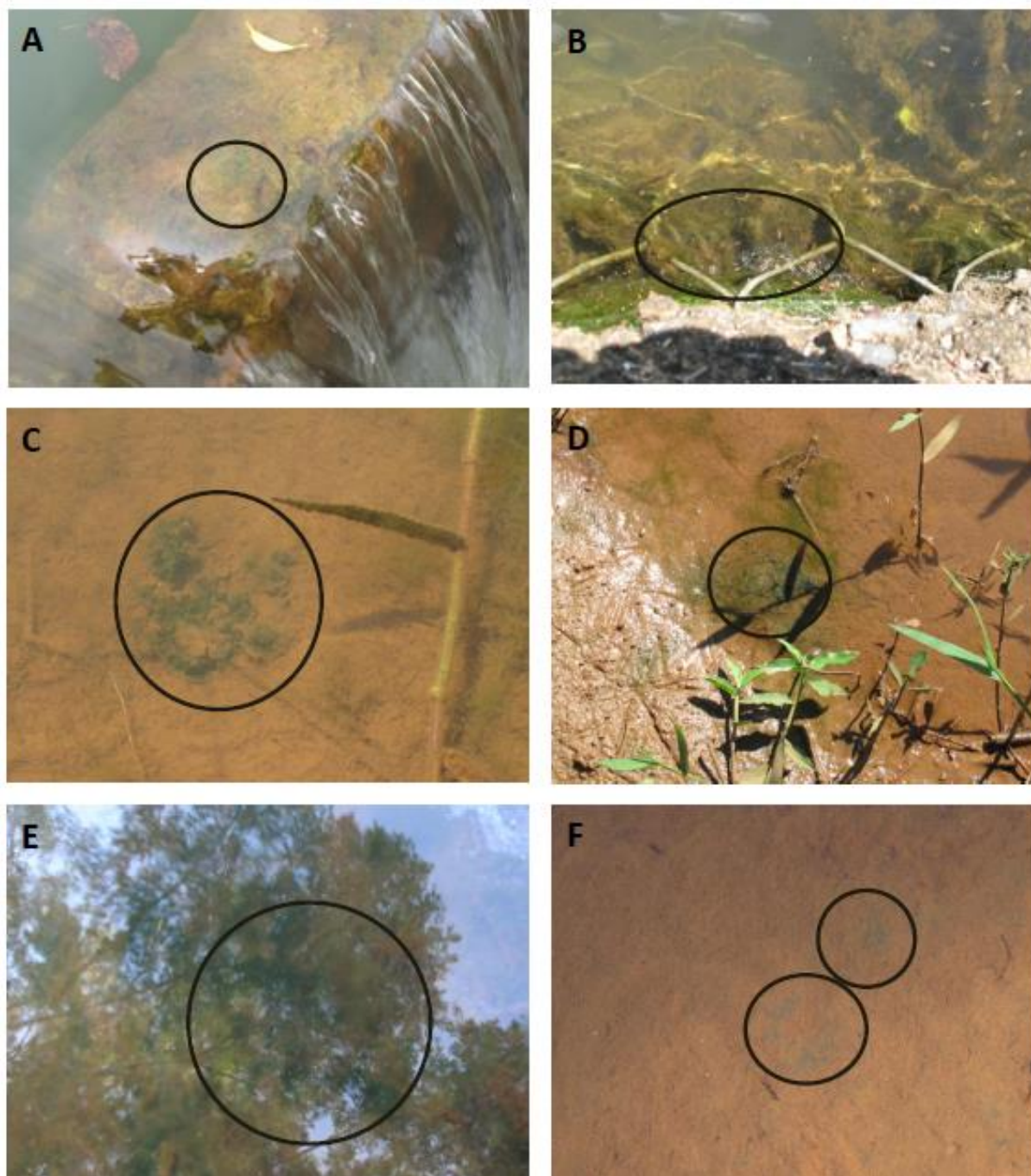


Figura 3. Massas de cianobactérias bentônicas na natureza formando manchas esverdeadas (representadas no interior dos círculos) aderidas em vertedouros (A) e margens de represas em mureta (B) e sedimento (C-F).

3.4 Caracterização morfológica

Os espécimes foram analisados segundo suas características taxonômicas, tais como: 1) células solitárias ou agrupadas em colônias ou em tricomas; 2) tamanho e forma das células solitárias; 3) presença de bainha; 4) estrutura dos tricomas 5) forma e dimensões celulares. Para obtenção da diversidade morfológica das populações encontradas, foram tomadas medidas de diâmetro celular, do filamento e/ou do tricoma de 30 organismos e de cada um destes foram feitas 20 medidas de comprimento celular. Nas descrições das espécies, foram utilizadas as abreviações diâm. para diâmetro celular e compr. para comprimento celular.

As identificações foram feitas de acordo com a literatura específica para cada grupo e o sistema de classificação adotado foi aquele proposto por Komárek et al. (2014).

3.5 Caracterização molecular

Os estudos moleculares foram realizados a partir de culturas uniespecíficas mantidas em cultivos artificiais. As células foram concentradas por meio de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com água deionizada visando a retirada dos nutrientes do meio de cultura e dos possíveis contaminantes. A extração do DNA genômico foi feita utilizando-se o *kit* MoBio PowerSoil DNA Isolation (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

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). O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

A amplificação das sequências de interesse (rRNA 16S e ITS 16S-23S) foi feita por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), primeiramente utilizando os iniciadores 359F (5'GGGAATTTTCCGCAATGGG3') 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 anteriormente.

A clonagem das sequências do RNAr 16S e do ITS 16S-23S produzidas na PCR foi realizada 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* DH5α foi feita através de choque térmico. Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α 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 µL 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 µg.mL⁻¹ de meio. As placas foram incubadas por 13-16 horas, sob temperatura de 37°C e células competentes de *E. coli* DH5-α foram transformadas. A presença de insertos nas células transformadas foi checada por meio de PCR das colônias com coloração branca.

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 µL de reação de PCR 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 anteriormente.

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) segundo
 instruções do fabricante.

As amostras foram sequenciadas usando-se o *kit* “Big Dye Terminator” versão 3.0 (Life
 Technologies). Para a reação foram utilizados 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol
 do iniciador M13F (5'GCCAGGGTTTCCAGTCACGA3'), 357F
 (5'CCTACGGGAGGCAGCAG3'), 704R (5'TCTACGSTATTCACCSCTAC3'), 1114F
 (5'GCAACGAGCGCAACCC3'), 1494R (5'TACGGCTACCTTGTTACGAC3') e Sp6R
 (5'ATTTAGGTGACACTATAGAA3') (NEILAN, 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” versao 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 R 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).

3.6 Análise filogenética

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 rRNA 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 e o último no programa Geneious 11.1.2 (<https://www.geneious.com>). A robustez das árvores construídas foi estimada por análise de reamostragem (*bootstrap*) para 1.000 replicações. O número de sítios informativos foi calculado. As análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) foram rodadas com o modelo de distância GTR+G+I. A porcentagem de identidade entre as sequências analisadas foi realizada no programa Geneious 11.1.2 (<https://www.geneious.com>).

As linhagens *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 e PCC8105 (números de acesso *GenBank*: NR074282, NC005125, AF132791) foram utilizadas como grupo externo.

3.7 Análise 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, RNAtIle, V2, RNAtAla, 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).

3.8 Prospeção de toxinas

Os espécimes isolados foram cultivados sob as condições descritas no item 2.3 para a formação de biomassa suficiente. Para a prospecção dos genótipos tóxicos foi realizada a amplificação do domínio protéico AMT, localizado nos módulos *mcyE* e *ndaF* do complexo enzimático da microcistina e da nodularina, respectivamente (JUNGBLUT & NEILAN, 2006), utilizando os primers HEPF (5'TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC3') e HEPR (5'AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT3'); e do gene *sxtA*, relacionado com a produção de saxitoxina (BALLOT et al., 2010), utilizando os primers *sxtaf* (5'GCGTACATCCAAGCTGGACTCG3') and *sxtar* (5'GTAGTCCAGCTAAGGCACTTGC3'). Cada reação consistiu em: 5 µL de tampão de PCR 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 pmol de cada iniciador, 1,25 U de Top Taq DNA Polimerase (Qiagen, 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: 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, 15 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, extensão final de 72°C por 8 minutos. Aliquotas (1 µL) dos DNAs amplificados foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 0,3%, EDTA 0,5 M) e GelRedTM 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).

Como controle positivo foram usadas linhagens reconhecidamente produtoras de toxinas: *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, produtora de microcistina, e *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302, produtora de saxitoxina.

A avaliação das toxinas efetivamente produzidas foi realizada por meio de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para análise de microcistina. O equipamento utilizado consistia de três bombas de propulsão (LC-20AT, LC-20AD, LC-20AD), degaseificador (20A5-DGU), sistema de derivatização pós-coluna, forno (CTO-20A), detector de fluorescência (RF-10AXL), detector UV-vis com arranjo de diodo (SPD-M20A), amostrador automático (SIL20AHT), controlador de sistema para conexão com os módulos de computador (CBM20A) e *software* LC Solution para aquisição e processamento dos dados (Shimadzu Proeminance) (BORGES et al., 2015). As amostras foram liofilizadas e, em seguida, extraídas com metanol 75%, segundo Fastner et al. (1998). Após a extração, as amostras foram secas em evaporador rotativo e ressuspensas em metanol 20%, grau HPLC, e mantidas a -18°C até o momento da análise. Foi utilizada uma coluna de C18 (250 x 4 mm), forno a 40°C e um gradiente de água: acetonitrila contendo em cada uma 0,05% de ácido trifluoracético (LAWTON et al., 1994). A identificação da microcistina foi feita pelo seu espectro de absorção e comparação com o padrão de microcistina-LR.

CAPÍTULO II – Cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos do noroeste do estado de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre as comunidades de cianobactérias bentônicas em ambientes de água doce lênticos e lóticos têm ganhado atenção nos últimos anos. O catalisador destes estudos tem sido o crescente registro de casos de intoxicação por cianobactérias bentônicas em diversos países. O primeiro caso relacionado com a presença desses organismos foi documentado por Mez et al. (1996), ao tentar elucidar a causa da mortandade de bezerros em pastos alpinos na Suíça. Os autores observaram o crescimento de cianobactérias bentônicas formando densos e extensos tapetes, aderidos ao substrato e sobre rochas submersas, nos lagos alpinos; sendo que a população predominante pertencia à espécie *Oscillatoria limosa*, e a toxina encontrada foi a microcistina-LR (MEZ et al. 1996).

As comunidades de cianobactérias bentônicas de água doce ocorrem em lagos, riachos e rios em uma variedade de substratos, desde os naturais, como rochas e sedimentos, até os artificiais, como vertedouros, e também associadas à macrófitas. Essas comunidades são formadas por complexas interações ecológicas entre as cianobactérias e outros organismos como bactérias heterotróficas, fungos e algas (SCOTT & MARCARELLI, 2012). Os fatores ecológicos mais importantes no estabelecimento das comunidades bentônicas são distúrbios físicos (ciclos de seca/chuva e ação do vento), luz, temperatura, nutrientes (nitrogênio e fósforo) e herbivoria (SCOTT & MARCARELLI, 2012). Apesar da disponibilidade de nutrientes ser um fator importante para as comunidades bentônicas, crescimentos extensivos já foram observados em ambientes oligotróficos, onde a entrada de luz é favorecida pela transparência da água (QUIBLIER et al. 2013).

As espécies de cianobactérias predominantes nas comunidades bentônicas são, em sua maioria, filamentosas e móveis, pertencentes principalmente à ordem Oscillatoriales, e.g. *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Microcoleus* (MEZ et al., 1997, 1998; HITZFELD et al., 2000; ABOAL et al., 2005; GUGGER et al., 2005; WOOD et al., 2010; BORGES et al. 2015),

mas também com representantes das ordens Synechococcales, e.g. *Leptolyngbya*, *Aphanothece* e *Synechococcus* (DASEY et al., 2005; KRIENITZ et al., 2003; MOHAMED, 2008), e Nostocales, e.g. *Anabaena* e *Scytonema* (MOHAMED et al., 2006; SMITH et al., 2011).

Um levantamento realizado por Branco et al. (2001) em 172 riachos da região Noroeste do estado de São Paulo, utilizando apenas caracteres morfológicos e ecológicos para a identificação taxonômica, revelou 34 táxons pertencentes às ordens Synechococcales (11,7%), Oscillatoriales (53%), Nostocales (32,3%) e Pleurocapsales (3%), sendo que *Phormidium retzii* foi a espécie mais frequente na área amostrada. Alguns táxons observados neste estudo foram *Geitlerinema splendidum*, *Leptolyngbya perelegans*, *Lyngbya martensiana*, *Oscillatoria princeps*, *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium irriguum*, *P. aerugineo-caeruleum*, *Calothrix difusa* e *Hapalosiphon flexuosus*. Outro estudo realizado por Necchi et al. (2011) sobre a flora de macroalgas em riachos de fragmentos florestais da região Noroeste do estado de São Paulo observou que 38% (sete espécies) dos táxons encontrados pertenciam ao grupo Cyanobacteria e as espécies registradas foram: *Geitlerinema splendidum*, *Jaaginema homogeneous*, *Microcoleus subtorulosus*, *Oscillatoria tenuis*, *Phormidium retzii*, *Scytonema arcangeli* e *Trichocoleus sociatus*.

Casos de intoxicação provocados por cianobactérias bentônicas ainda não foram observados no Brasil, embora táxons produtores de toxinas já tenham sido registrados nos estados de São Paulo, Pernambuco e Ceará (FIORE et al. 2009, GENUÁRIO et al. 2010, BORGES et al. 2015). Deste modo, a caracterização das comunidades bentônicas em ambientes de água doce, bem como a prospecção de toxinas associadas, permite a elaboração e a adoção de eventuais estratégias de monitoramento e controle destes microrganismos, assim como já vem sendo realizado para as cianobactérias planctônicas formadoras de florações potencialmente tóxicas.

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi caracterizar taxonomicamente as cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste paulista, por meio da análise filogenética do gene RNAr 16S e da estrutura secundária do 16S-23S ITS, associando também informações sobre a ecologia e a morfologia dos táxons encontrados. Também foi avaliado o potencial tóxico desses organismos pela verificação da amplificação de genes associados à produção de microcistina (*mcyE*) e saxitoxina (*sxtA*).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas 41 populações de cianobactérias bentônicas pela análise filogenética do gene RNAr 16S, da estrutura secundária do ITS 16S-23S e de aspectos morfológicos, as quais foram alocadas em 17 gêneros distribuídos em 11 famílias e cinco ordens (Tabela 2). A ordem Oscillatoriales foi a mais representativa entre as populações estudadas (68,3%, 28 populações), seguida pela ordem Synechococcales (19,5%, oito populações). As ordens Spirulinales (duas populações), Chroococcales (uma população) e Nostocales (duas populações) foram as menos representativas e corresponderam juntas a 12,2%.

Inicialmente, as linhagens foram isoladas e identificadas segundo a sua morfologia, entretanto, a caracterização a partir da análise das sequências do RNAr 16S apresentou algumas divergências com a análise morfológica preliminar, sendo que 16,6% das populações (sete) tiveram valores de similaridade abaixo de 95% no BLAST, sugerindo que não correspondem a nenhuma linhagem conhecida, em nível genérico, com sequência disponível. Além disso, essas sequências ficaram isoladas nas análises filogenéticas, sem relação com os clados aos quais houve semelhança morfológica. Por outro lado, a morfologia de algumas dessas linhagens corresponde a táxons já descritos, como é o caso, das linhagens GUA2 e SFS9 com morfologia equivalente à espécie *Anagnostidinema lemmermannii*, VOT2, similar a espécies do gênero *Oculatella*, e SFS3, equivalente à *Blennothrix*.

A maior parte das linhagens estudadas apresentou valores de similaridade $\geq 95\%$ no BLAST e a morfologia das mesmas foi equivalente aos táxons com os quais houve correspondência genética. São os casos das linhagens identificadas como *Leptolyngbya boryana* (SJR5 e MAP2), *Spirulina subsalsa* (SJR1 e VGE3), *Geitlerinema splendidum* (FPA2 e GUA1), e *Planktothricoides raciborskii* (FER1), as quais também foram agrupadas em clados bem suportados com as sequências do mesmo gênero. Outras linhagens corresponderam geneticamente a táxons reconhecidamente polifiléticos, como *Anathece* (CAT2 e UBA1), *Leptolyngbya* (JAC1 e FER5), *Phormidium* (NCA1, SFS1, UBA3, FPA1 e OLI7) e *Calothrix* (OLI3), para os quais as relações filogenéticas necessitam ser revisadas, uma vez que novos táxons vêm sendo descritos a partir destes.

As 41 populações analisadas neste estudo foram avaliadas quanto a presença de genes relacionados à produção de toxinas e apenas a linhagem *Phormidium* sp. SFS1 apresentou o gene produtor de microcistina/nodularina. Além disso, embora a presença dos genótipos tóxicos não tenha sido observada, foram selecionadas 19 linhagens além da SFS1 para efetivamente testar a produção de toxinas. Entretanto, confirmando os resultados da análise molecular para a detecção de genótipos tóxicos, a efetiva produção de microcistina foi observada apenas para a linhagem SFS1. Os dados referentes à espécie tóxica *Phormidium* sp. SFS1 encontram-se no **Capítulo V**.

Tabela 2. Classificação segundo critérios morfológicos e moleculares (RNAr 16S) e origem das populações estudadas no estado de São Paulo.

Ordem	Família	Espécie	Origem	Código	BLAST	
					(%)	Linhagem
Synechococcales	Synechococcaceae	<i>Anathece</i> sp.1	Catanduva	CAT2	98	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920
		<i>Anathece</i> sp.1	Ubarana	UBA1	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920
	Pseudanabaenaceae	<i>Pseudanabaena galeata</i>	Santa Fé do Sul	SFS8	94	Uncultured bacterium
	Leptolyngbyaceae	<i>Leptolyngbya boryana</i>	S. J. do Rio Preto	SJR5	100	<i>Leptolyngbya</i> sp. CCALA84
		<i>Leptolyngbya boryana</i>	Monte Aprazível	MAP2	99	<i>L. boryana</i> NIES2135
		<i>Leptolyngbya</i> sp.1	Jaci	JAC1	97	Leptolyngbyaceae EY07-AM2
		<i>Leptolyngbya</i> sp.2	Fernandópolis	FER5	98	<i>Leptolyngbya</i> sp. BN22
		<i>Oculatella</i> sp.1	Votuporanga	VOT2	94	<i>Trichocoleus desertorum</i> WJT40-NPBG2
Spirulinales	Spirulinaceae	<i>Spirulina subsalsa</i>	S. J. do Rio Preto	SJR1/VGE3	99	<i>Spirulina subsalsa</i> NIES598
Chroococcales	Chroococcaceae	<i>Geminocystis</i> sp.	Icém	ICE1	99	<i>Geminocystis</i> sp. NIES3709
Oscillatoriales	Coleofasciculaceae	<i>Geitlerinema splendidum</i>	Fátima Paulista	FPA2	99	<i>G. splendidum</i> CCALA1004
		<i>Geitlerinema splendidum</i>	Guapiaçu	GUA1	99	<i>G. splendidum</i> CCALA1004
		<i>Anagnostidinema</i> sp.1	Guapiaçu	GUA2	94	<i>L. planctonica</i> CCALA10031
		<i>Anagnostidinema</i> sp.1	Santa Fé do Sul	SFS9	94	<i>L. planctonica</i> CCALA10031

Tabela 2. (continuação)

Ordem	Família	Espécie	Origem	Código	BLAST	
					(%)	Linhagem
Oscillatoriales	Coleofasciculaceae	<i>Anagnostidinema</i> sp.2	Catanduva	CAT3	99	<i>A. cf. lemmermannii</i> P-SA
		<i>Anagnostidinema</i> sp.2	Monte Aprazível	MAP1	99	<i>A. cf. lemmermannii</i> P-SA
		<i>Anagnostidinema</i> sp.2	S. José do Rio Preto	SJR3	99	<i>A. cf. lemmermannii</i> P-SA
		<i>Anagnostidinema</i> sp.2	Santa Fé do Sul	SFS6	99	<i>A. cf. lemmermannii</i> P-SA
		<i>Anagnostidinema</i> sp.2	Zacarias	ZAC4	99	<i>A. cf. lemmermannii</i> P-SA
	Microcoleaceae	<i>Planktothricoides</i>	Fernandópolis	FER1	98	<i>P. raciborskii</i> OR1-1
		<i>raciborskii</i>				
		<i>Koinonema pervagatum</i>	S. José do Rio Preto	SJR2	99	<i>Phormidium</i> sp. ETS-05
		<i>Koinonema pervagatum</i>	Icém	ICE3	99	<i>Phormidium</i> sp. ETS-05
		<i>Koinonema pervagatum</i>	Gastão Vidigal	GVI2	99	<i>Phormidium</i> sp. ETS-05
		<i>Microcoleus</i> sp.1	Olímpia	OLI1	97	<i>Microcoleus setchellianus</i> CCALA149
		<i>Microcoleus</i> sp.2	Votuporanga	VOT6	97	<i>M. setchellianus</i> CCALA149
		<i>Microcoleus</i> sp.3	Nova Granada	NGR1	97	<i>M. setchellianus</i> CCALA149
		<i>Microcoleus</i> sp.4	Gastão Vidigal	GVI1	98	<i>M. setchellianus</i> CCALA149
	Oscillatoriaceae	<i>Phormidium</i> sp.1	Fátima Paulista	FPA1	98	<i>P. cf irriguum</i> CCALA759
		<i>Phormidium</i> sp.2	Nova Castilho	NCA1	97	<i>P. cf irriguum</i> CCALA759
		<i>Phormidium</i> sp.3	Ubarana	UBA3	98	<i>P. cf irriguum</i> CCALA759
		<i>Phormidium</i> sp.4	Santa Fé do Sul	SFS1	98	<i>P. cf irriguum</i> CCALA759

Tabela 2. (conclusão)

Ordem	Família	Espécie	Origem	Código	BLAST	
					(%)	Linhagem
Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria proboscidea</i>	Ubarana	UBA2	98	<i>Oscillatoria</i> sp. ETS-06
		<i>Blennothricopsis periphytica</i>	Santa Fé do Sul	SFS3	94	<i>Blennothrix</i> sp. AQS
		Oscillatoriaceae sp.1	Monte Aprazível	MAP3	93	Uncultured cyanobacterium
		Oscillatoriaceae sp.2	Catanduva	CAT5	95	<i>Lyngbya hieronymusii</i> N-929
		Oscillatoriaceae sp.3	Zacarias	ZAC1	95	Uncultured bacterium
		Oscillatoriaceae sp.4	Olímpia	OLI7	98	<i>Phormidium uncinatum</i> SAG8179
Nostocales	Gomontiellaceae	<i>Komvophoron constrictum</i>	Icém	ICE2	96	<i>Komvophoron hindakii</i> K9-3P6
	Rivulariaceae	<i>Calothrix</i> sp.	Olímpia	OLI3	98	<i>Calothrix</i> sp. UAM374
	Hapalosiphonaceae	<i>Westiellopsis</i> sp.	Fátima Paulista	FPA3	99	<i>Westiellopsis</i> sp. Ar73

4.1. Ordem Synechococcales

A ordem Synechococcales foi representada por oito táxons distribuídos em três famílias: Synechococcaceae, Pseudanabaenaceae e Leptolyngbyaceae (Fig. 1). Synechococcales é um grupo grande, abrangendo mais de 70 gêneros, e com representantes unicelulares e filamentosos distribuídos em 11 famílias (KOMÁREK et al., 2014).

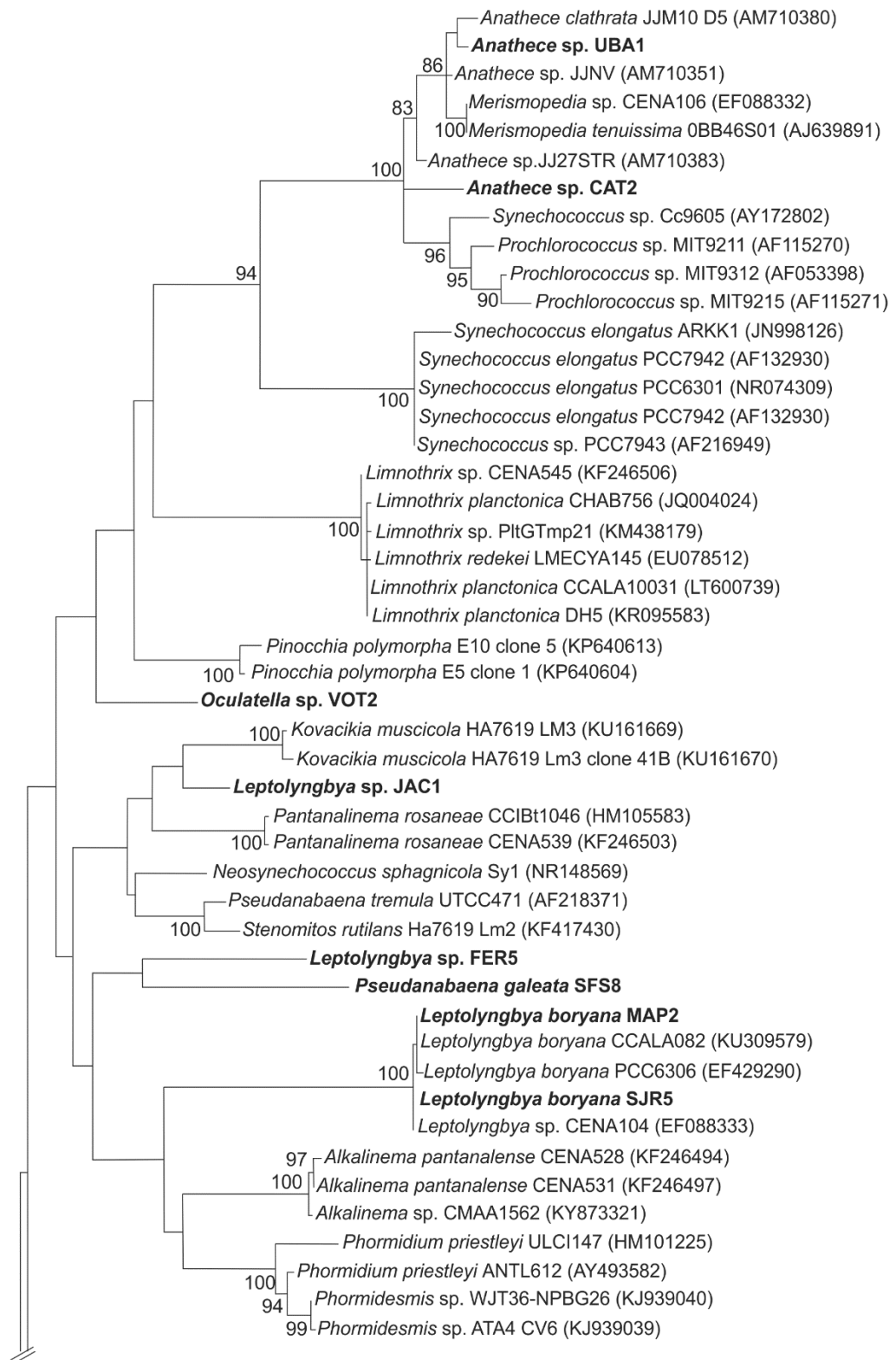


Fig. 1. Árvore consenso (parcial) das Synechococcales com base em seqüências do gene RNAr 16S de 17 linhagens sequenciadas neste estudo (em negrito) e 96 linhagens disponíveis no *GenBank* e construída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Os valores de *bootstrap* acima de 70% para a ML estão representados junto aos ramos.

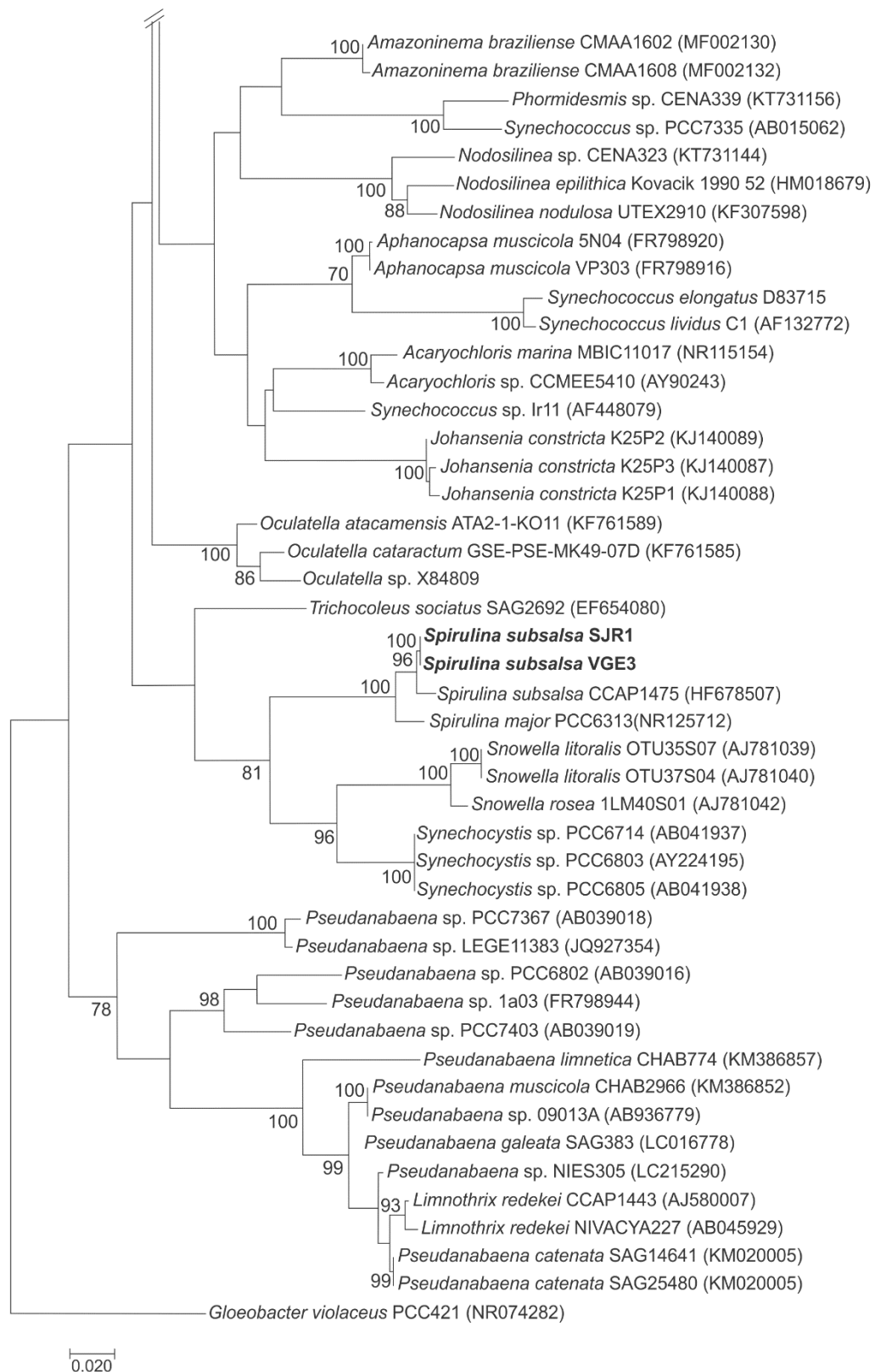


Fig. 1. (cont.) Barra = 0,02 número de substituição de nucleotídeos por site.

4.1.1. Família Synechococcaceae

Neste trabalho, encontramos duas populações de Synechococcaceae (CAT2 e UBA1), sendo identificadas como pertencentes ao gênero *Anathece*, mas não puderam ser identificadas em nível específico (Fig. 2).

Na análise filogenética, as sequências de *Anathece* sp. ficaram agrupadas com outras linhagens dos gêneros *Anathece*, *Synechococcus*, *Merismopedia* e *Prochlorococcus*, num clado com alto suporte (ML- 96%), indicando uma relação muito próxima entre estes táxons (Fig. 1). O gênero *Anathece* foi separado de *Aphanothece* por meio da análise do RNAr 16S e de caracteres morfológicos e ultra-estruturais (KOMÁREK et al. 2011). A morfologia do gênero corresponde a pequenas células ovais ou em forma de bastão (<2µm) irregularmente situadas dentro de uma mucilagem amorfa e fina, sem nenhum envelope celular. A maior parte das espécies é planctônica, com alguns representantes bentônicos (KOMÁREK et al. 2011).

A linhagem CAT2 apresentou uma sequência de ITS 16S-23S de 755 pares de bases e a presença dos dois RNAs transportadores. As regiões D1-D1', Box-B e V3 foram construídas, apesar dos trechos iniciais conservados que definem essas regiões nas cianobactérias tenham sofrido algumas alterações neste grupo (Fig.3). Além disso, não há sequências do ITS de outras linhagens do gênero no *GenBank* para alinhamento e comparação. Não foi possível obter a sequência completa do ITS 16S-23S para a linhagem UBA1, portanto, apenas a estrutura secundária da região D1-D1' foi apresentada (Fig. 3).

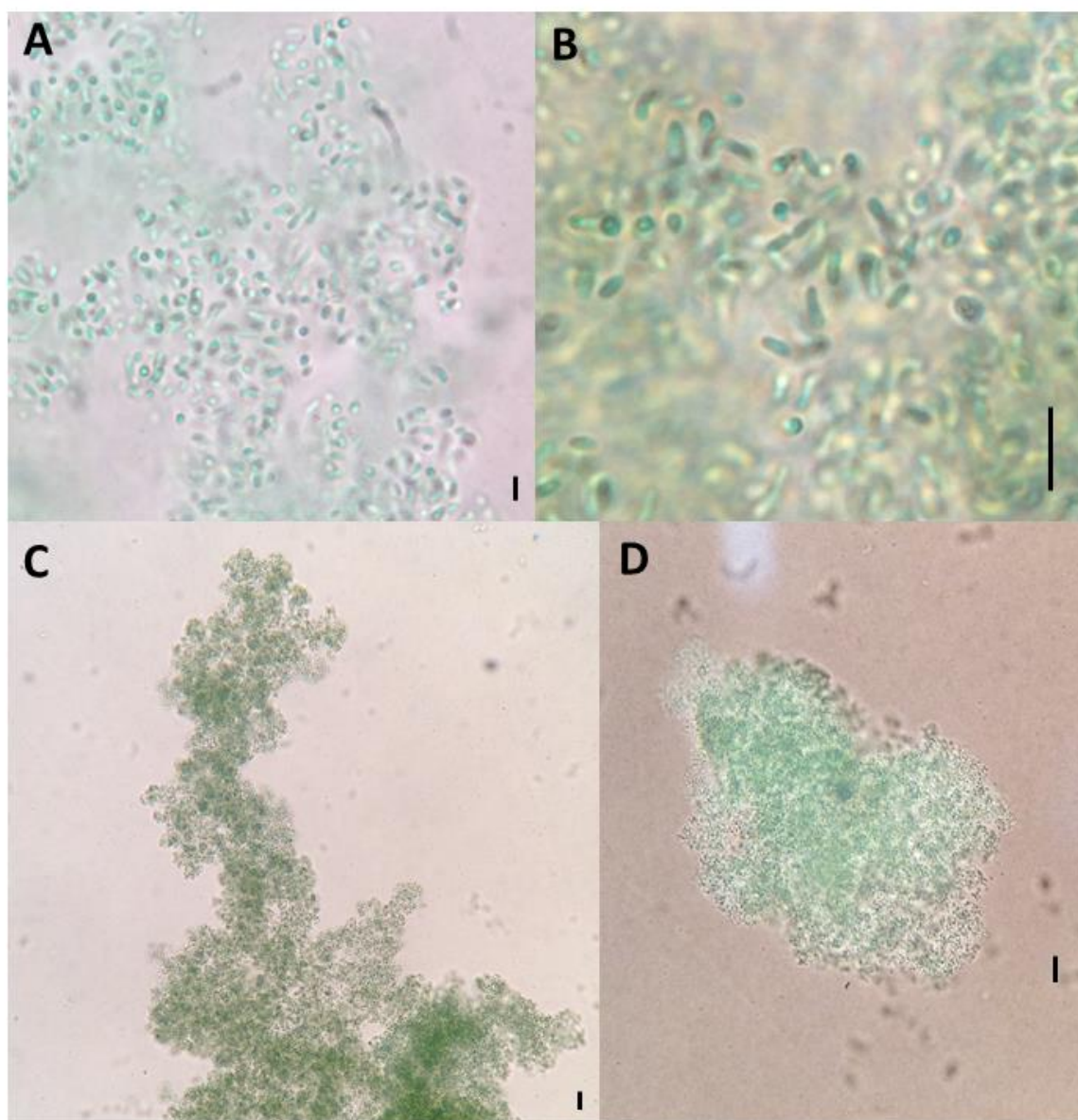


Fig. 2. Células irregularmente agrupadas em *Anathece* sp. linhagem UBA1 (A, C, D) e CAT2 (B), e aspecto das colônias (C-D). Barra: 2 μm (A), 5 μm (B) e 10 μm (C-D).

Anathece sp.

(Figura 2A-D)

Colônias irregularmente esféricas ou alongadas, achatadas, formando vários agregados de células densos e irregulares. Mucilagem fina, sem cor, difluente nas margens. Célula finas, em formato de bastão, 2-4 vezes mais compridas do que largas, conteúdo homogêneo verde-claro, 1,5-3 μm de compr. x 0,5-1 μm de diâm.

Amostras: CAT2 e UBA1

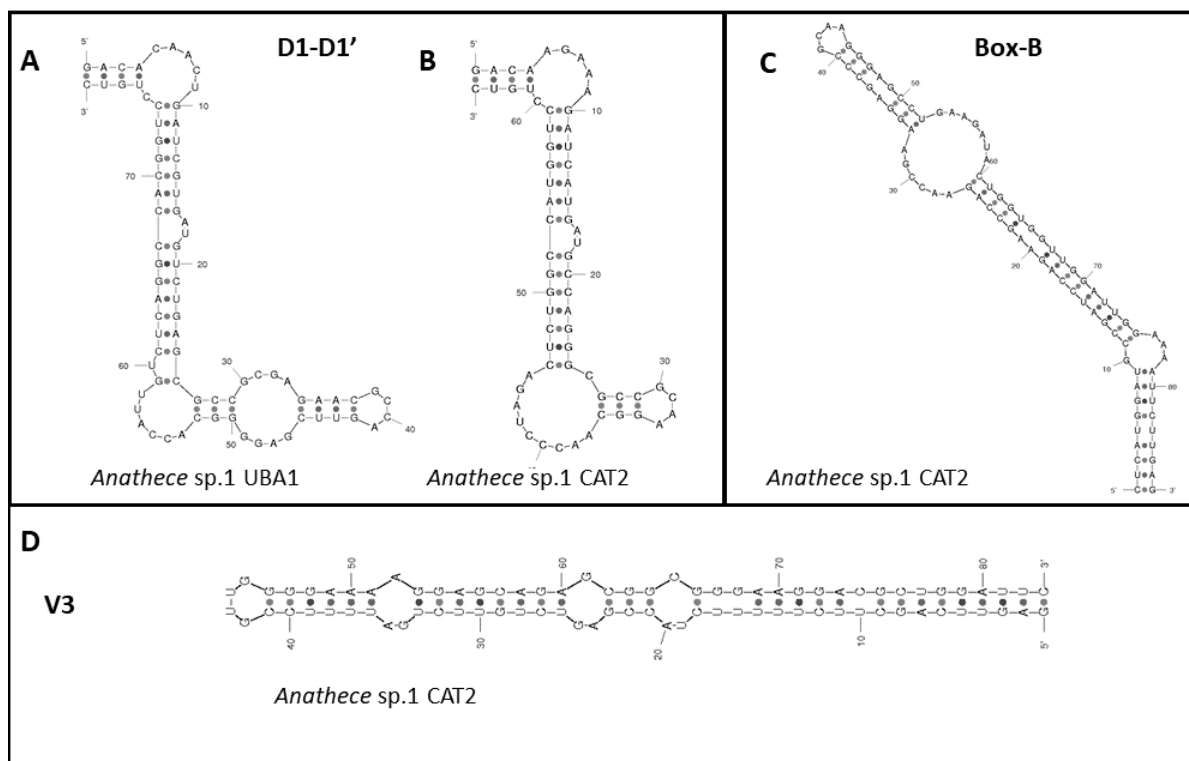


Fig. 3. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A-B) Box-B (C) e V3 (D) de *Anathece sp.1*.

4.1.2. Família Pseudanabaenaceae

Apenas uma população de Pseudanabaenaceae foi encontrada neste trabalho, e foi identificada como *Pseudanabaena galeata* (linhagem SFS8).

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *Pseudanabaena galeata* é uma espécie que ocorre em água doce, com hábito bentônico e provavelmente cosmopolita. A linhagem SFS8, além de apresentar ecologia correspondente a *P. galeata*, apresentou medidas celulares equivalentes a espécie tipo (tricomatos constritos 0,8-2,4 µm de diâm., células 2,0-7,0 µm de compr.) e presença de aerótopos polares (Fig. 4).

Pseudanabaena é um gênero polifilético para o qual é necessária uma revisão taxonômica. Deste modo, é provável que novos gêneros crípticos sejam descritos a partir de

Pseudanabaena (KOMÁREK et al. 2014). A análise filogenética da sequência do RNAr 16S da linhagem SFS8 não agrupou essa linhagem com os demais representantes do gênero *Pseudanabaena*, indicando que a mesma possa ser um novo gênero críptico.

A linhagem SFS8 apresentou sequência de ITS 16S-23S de 446 pares de bases e ambos os transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}) foram observados. As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 das três linhagens encontram-se na figura 5.

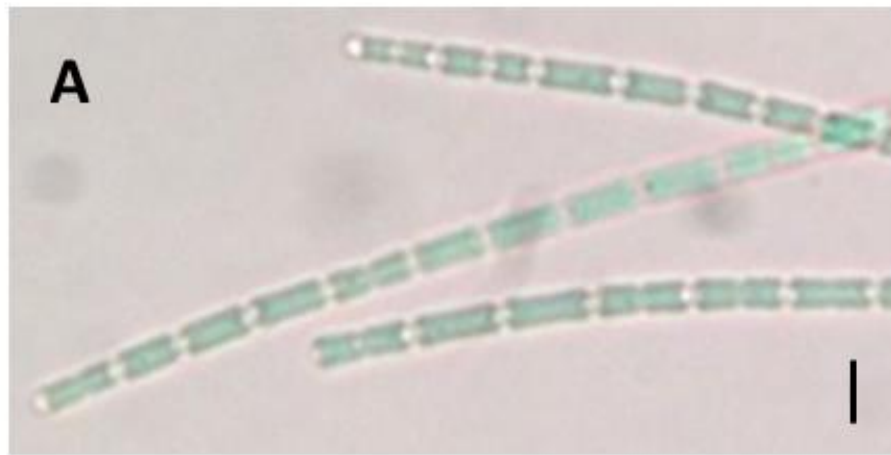


Fig. 4. Fotomicrografia de *Pseudanabaena galeata*. Barras: 2 μ m.

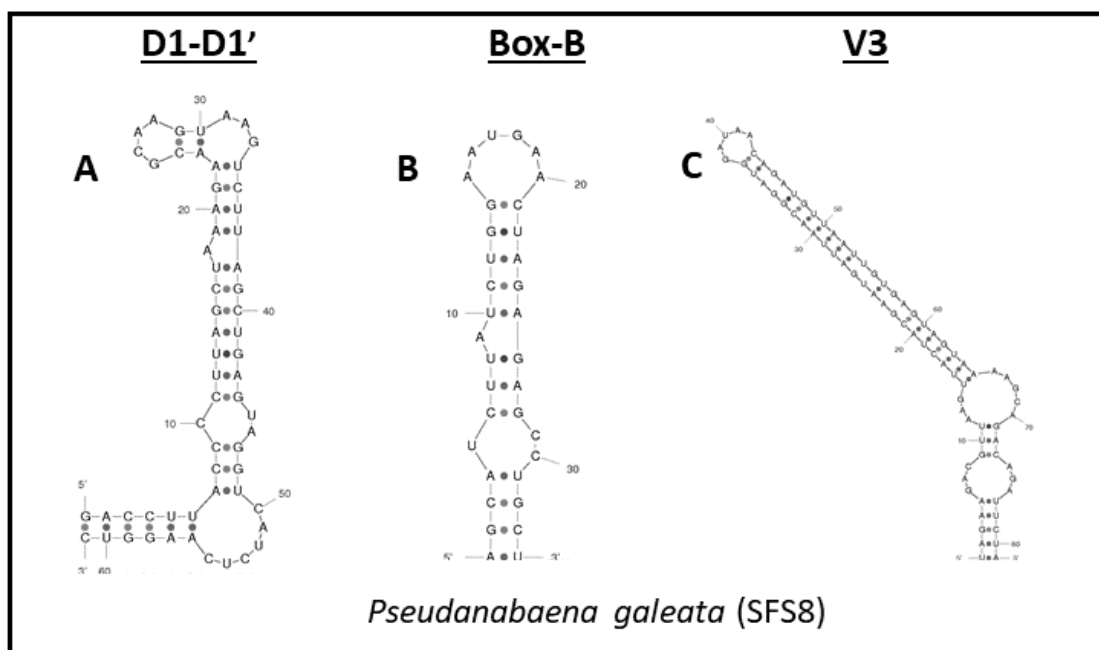


Fig. 5. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), Box-B (B) e V3 (C) de *Pseudanabaena galeata*.

Pseudanabaena galeata Böcher, *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Meddelelser* 21: 1-46, 1949.

(Figura 4)

Tricomas emaranhados, flexuosos, retos a curvos, levemente atenuados, constrictos, 1,0 µm de diâm., sem motilidade, sem bainha; células cilíndricas mais longas que largas, 1,5-4,0 µm de compr., conteúdo celular homogêneo verde-azulado, presença de aerótopos polares.

Amostra: SFS8

4.1.3. Família Leptolyngbyaceae

Neste trabalho, encontramos cinco populações de Leptolyngbyaceae, sendo identificadas como pertencentes aos gêneros *Leptolyngbya* e *Oculatella*. As linhagens MAP2 e SJR5 foram identificadas como *L. boryana* Anagnostidis et Komárek e as linhagens JAC1, FER5 e VOT2 não foram identificadas em nível específico, sendo separadas em *Leptolyngbya* sp.1, *Leptolyngbya* sp.2 e *Oculatella* sp., respectivamente.

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *Leptolyngbya* é o gênero mais comum entre as cianobactérias, com numerosas espécies morfológicamente simples, tornando difícil a sua identificação. Entretanto, em razão de características ecológicas distintas, uma vez que ocorrem em ambientes aquáticos (marinho e de água doce) e terrestres, as espécies foram divididas em sete grupos ecológicos para facilitar a identificação. Além disso, *Leptolyngbya* é um táxon polifilético e a diversidade genética do grupo pode ser maior que a diversidade morfológica (JOHANSEN et al. 2011).

Leptolyngbya boryana é uma espécie de água doce com células curtas, encontrada sobre algas e plantas aquáticas nas margens de corpos de água, e distribuída pela Europa e Ásia Central (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). As linhagens aqui estudadas também foram coletadas às margens de represas, aderidas a substratos formando massas com outras espécies de cianobactérias. As dimensões celulares de *L. boryana* encontrada neste estudo corresponderam àquelas apresentadas na descrição da espécie tipo *L. boryana* (tricomas 0,6-2,0 µm de diâm., células 1,3-3,0 µm de compr.) (Fig. 6).

A partir da análise das sequências do RNAr 16S, a linhagens de *L. boryana* formaram um clado bem suportado (ML-100%) com outras linhagens da mesma espécie e com a linhagem de referência PCC6306 (Fig. 1). Os valores de similaridade entre as linhagens do clado estiveram acima de 99% (Tabela 3).

As linhagens de *L. boryana* apresentaram sequências de ITS 16S-23S com 467 e 479 pares de bases, respectivamente. Utilizamos a linhagem referência *L. boryana* PCC6306, entretanto a sequência do ITS 16S-23S está incompleta. Foi observada a presença dos dois RNAs transportadores (RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}) em todas as sequências analisadas.

Tabela 3. Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências de RNAr 16S das linhagens de *Leptolyngbya*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>L. boryana</i> (MAP2)		100	99,74	99,91	99,73	99,48	99,74	99,57	99,05	99,82
2. <i>L. boryana</i> (SJR5)	0		99,74	99,91	99,73	99,48	99,74	99,57	99,05	99,82
3. <i>L. boryana</i> CCALA1076	3	3		100	100	99,74	100	99,83	99,31	99,91
4. <i>L. boryana</i> NIES2135	1	1	0		100	99,73	100	99,82	99,28	99,93
5. <i>L. boryana</i> CCALA082	3	3	0	0		99,72	100	99,82	99,54	99,90
6. <i>L. boryana</i> PCC6306	6	6	3	3	3		99,74	99,91	99,05	99,64
7. <i>L. foveolarum</i> VP108	3	3	0	0	0	3		99,83	99,31	99,93
8. <i>L. tenerrima</i> UTCC77	5	5	2	2	2	1	2		99,14	99,73
9. <i>L. corticola</i> CCALA085	11	11	8	8	5	11	8	10		99,19
10. <i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104	2	2	1	1	1	4	1	3	9	

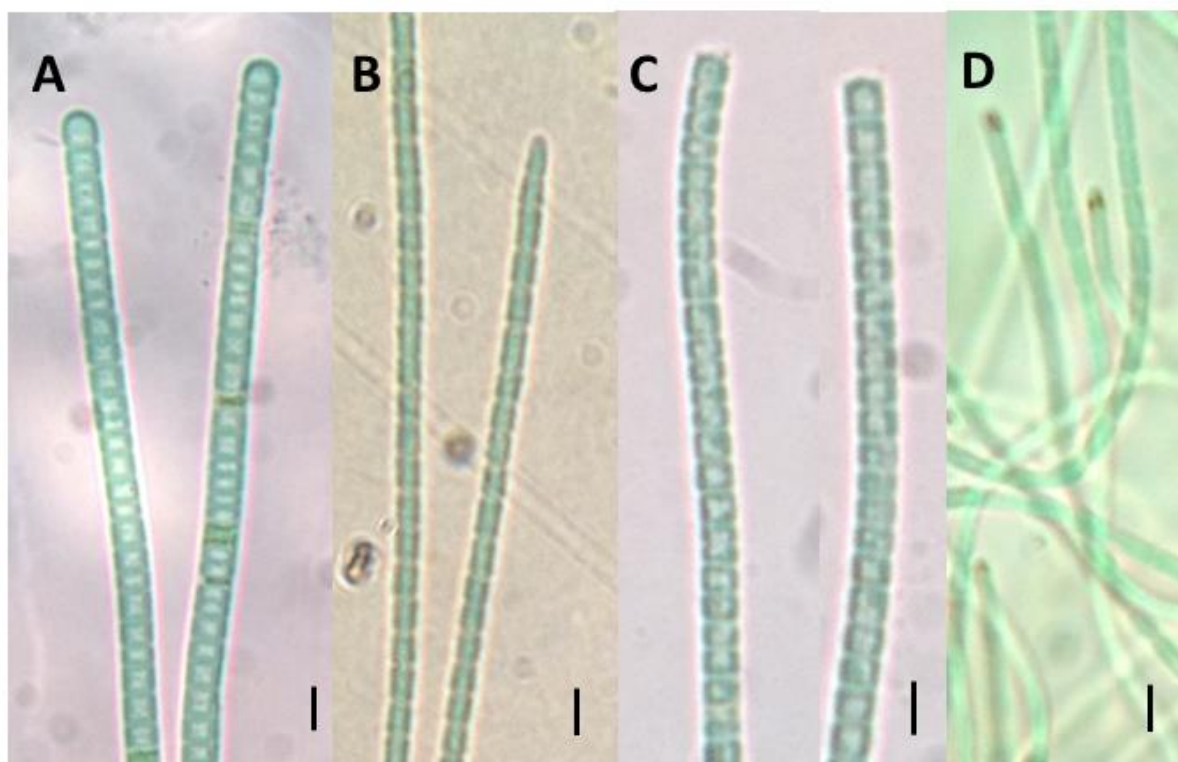


Fig. 6. Fotomicrografias de *L. boryana* (A), *Leptolyngbya* sp.1 (B), *Leptolyngbya* sp.2 (C) e *Oculatella* sp. (D). Barras: 2 µm.

As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 foram bastante similares entre as linhagens MAP2 e SJR5 (Fig. 7). As demais linhagens de *Leptolyngbya* apresentaram estruturas secundárias para as três regiões diferentes entre si, confirmando a separação encontrada pela análise genética do RNAr 16S.

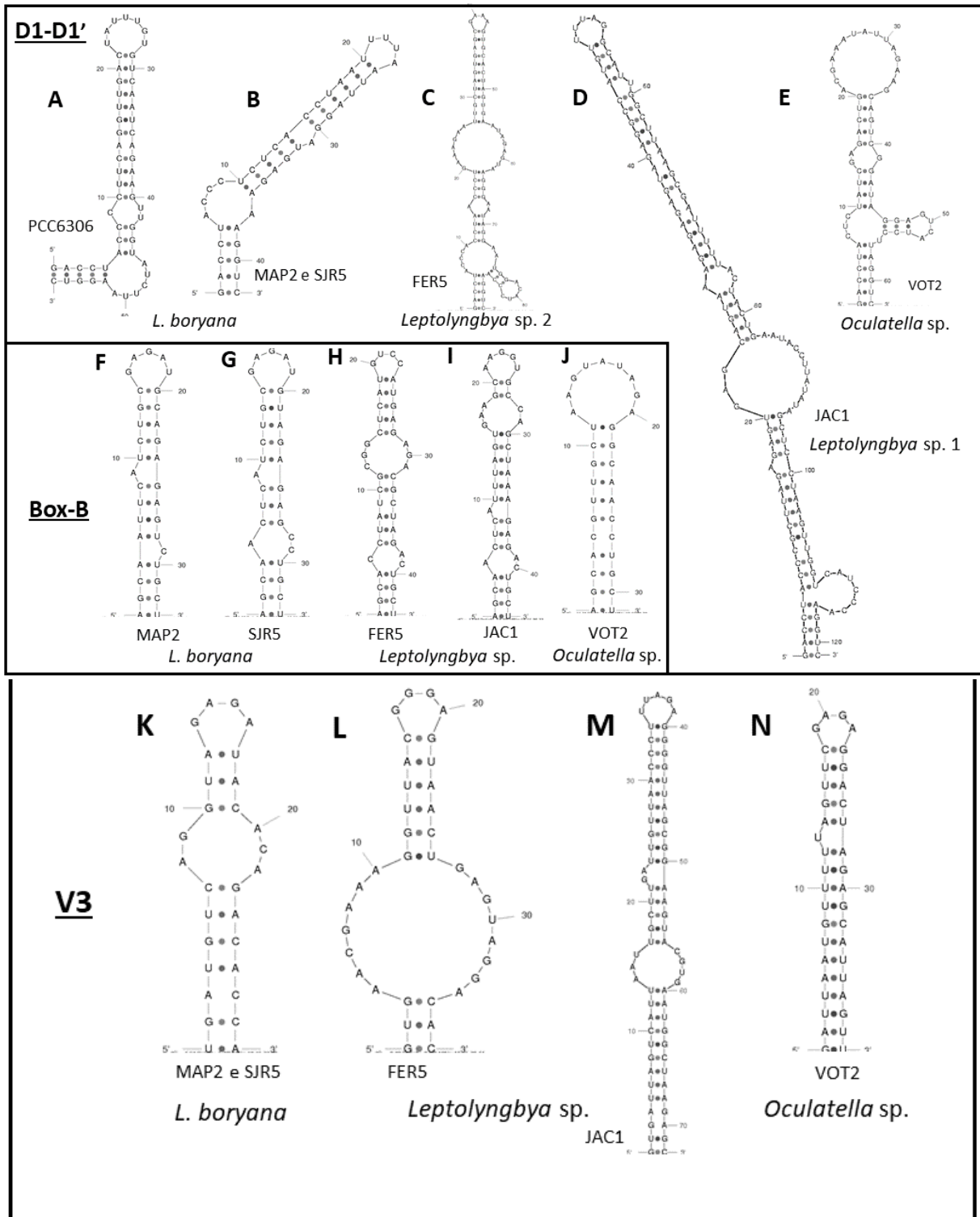


Fig. 7. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A-E), Box-B (F-J) e V3 (K-N) de *L. boryana* PCC6306 (A), *L. boryana* (B,F,G,H,K), *Leptolyngbya* sp.1 (D,I,M), *Leptolyngbya* sp.2 (C,H,L), e *Oculatella* sp. (E,J,N).

A topologia da árvore filogenética revelou que as linhagens *Leptolyngbya* sp.1, *Leptolyngbya* sp.2 e *Oculatella* sp. pertencem a táxons diferentes daqueles para os quais a morfologia dessas linhagens foi correspondente, e os dados obtidos serão aprofundados para tentar estabelecer o posicionamento dessas linhagens ou a sua descrição como novos táxons.

As linhagens *Leptolyngbya* sp.1, *Leptolyngbya* sp.2 e *Oculatella* sp. apresentaram sequências de ITS 16S-23S de 696, 543 e 544 pares de bases, respectivamente, e ambos os transportadores (RNA^t_{Ile} e RNA^t_{Ala}) foram observados em todas as linhagens. As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 das três linhagens encontram-se na figura 7.

Leptolyngbya boryana Anagnostidis et Komárek, *Archiv für Hydrobiologie, Supplementband* 80: 327-472. 1988.

(Figura 6A)

Filamentos agrupados e emaranhados, flexuosos, retos a curvos, não atenuados, bainha fina e hialina; tricomas 1,5-3,0 µm de diâm., constritos, sem motilidade; células isodiamétricas, 1,0-3,0 µm de compr., conteúdo celular homogêneo verde-azulado, célula apical arredondada.

Amostras: MAP2 e SJR5.

Leptolyngbya sp.1

(Figura 6B)

Filamentos agrupados e emaranhados, flexuosos, retos a curvos, não atenuados, bainha fina e hialina; tricomas 1,0 µm de diâm., constritos, sem motilidade; células isodiamétricas a mais longas que largas, 1,0-3,0 µm de compr., conteúdo celular homogêneo verde-azulado, célula apical cônico arredondada.

Amostra: JAC1

Leptolyngbya sp.2

(Figura 6C)

Filamentos agrupados e emaranhados, flexuosos, retos a curvos, não atenuados, bainha fina e hialina; tricomas 1,0-2,0 µm de diâm., constritos, sem motilidade; células isodiamétricas, 1,5-2,0 µm de compr., conteúdo celular homogêneo verde-azulado, célula apical arredondada.

Amostra: FER5

Oculatella sp.

(Figura 6D)

Filamentos agrupados e emaranhados, flexuosos, retos a curvos, não atenuados, bainha fina e hialina; tricomas 1,0-1,5 µm de diâm., constritos, sem motilidade; células isodiamétricas, 1,0-3,0 µm de compr., conteúdo celular homogêneo verde-azulado, célula apical acuminada com presença de grânulo.

Amostra: VOT2

4.2. Ordem Spirulinales

A ordem Spirulinales foi representada aqui por apenas uma linhagem pertencente a família Spirulinaceae (Fig. 1). Spirulinales é um grupo pequeno composto por apenas três gêneros distribuídos na única família reconhecida para a ordem. Os representantes desta ordem caracterizam-se por apresentarem tricomas tipicamente espiralados e sem bainha (KOMÁREK et al., 2014).

4.2.1 Família Spirulinaceae

Neste trabalho, encontramos duas populações de Spirulinaceae, sendo identificadas como pertencentes ao gênero *Spirulina*. As linhagens SJR1 e VGE3 foram identificadas como *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont.

As linhagens de *S. subsalsa* apresentaram características morfológicas (Fig. 8) e dimensões celulares similares à descrição da espécie *Spirulina subsalsa* (tricomos 1-2 µm de diâm., espiras 3-5 µm de largura e 3-5 µm de altura). Esta espécie ocorre em ambientes marinhos, em águas costeiras salobras estagnadas e em fontes termais, ocorrendo também em água doce, em pântanos aderidas ao sedimento, rochas ou algas, distribuídas mundialmente (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). Há registro dessa espécie no Brasil de acordo com os trabalhos de Werner (1988) e de Sant'Anna et al. (2011).

Segundo a análise do RNAr 16S, o agrupamento de *S. subsalsa* formado em conjunto com a linhagem referência, *S. major* PCC6306, teve alto suporte (ML- 100%), bem como a similaridade entre as sequências foi de 98,28%, corroborando a classificação da linhagem neste clado (Fig. 1).

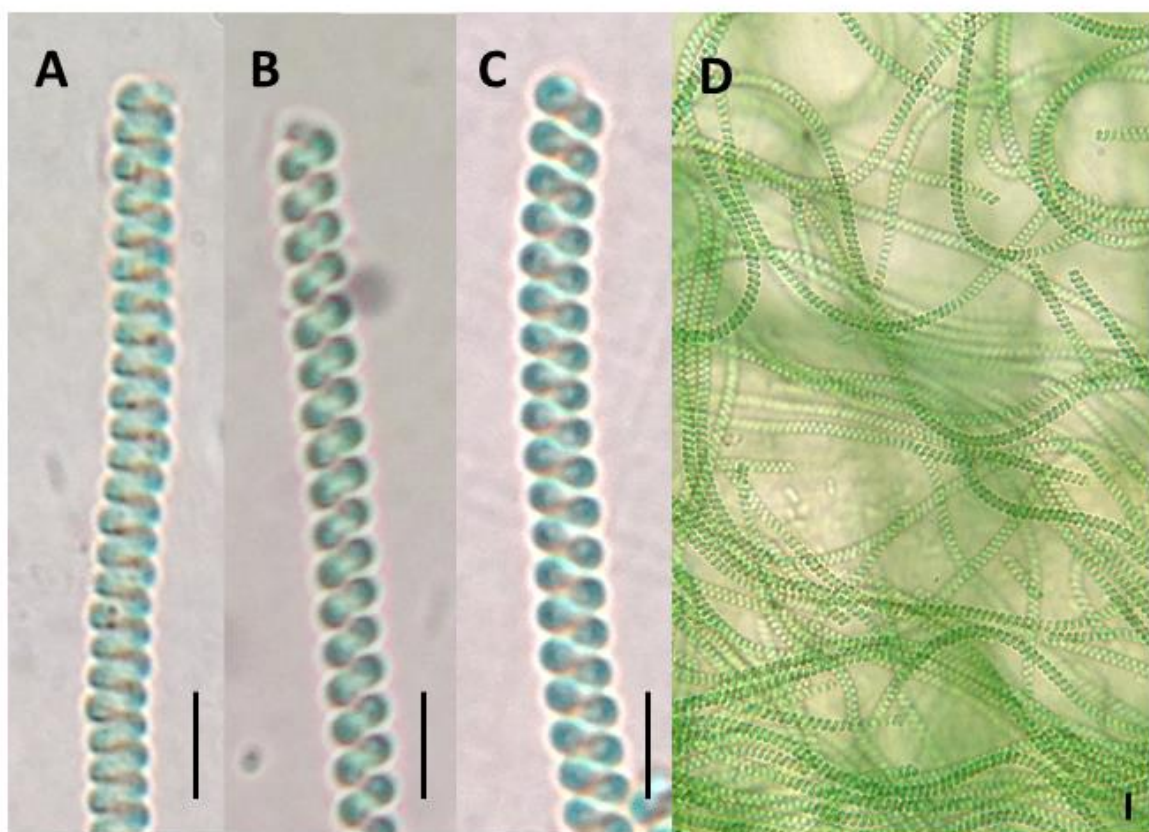


Fig. 8. Fotomicrografias de *S. subsalsa*, tricomas solitários (A-C) e emaranhados (D).

As linhagens de *S. subsalsa* apresentaram sequências de ITS 16S-23S de 381 pares de bases e foi observada a presença de apenas um dos RNA transportadores, o RNAt^{Ile} . A única linhagem com o ITS 16S-23S completo para comparação, *S. subsalsa* CCAP1475, apresentou uma sequência de 486 pares de base e também apresentou apenas o RNAt^{Ile} . A estrutura secundária das regiões Box-B e V3 foram bastante similares para as linhagens analisadas, com exceção da região D1-D1' (Fig. 9).

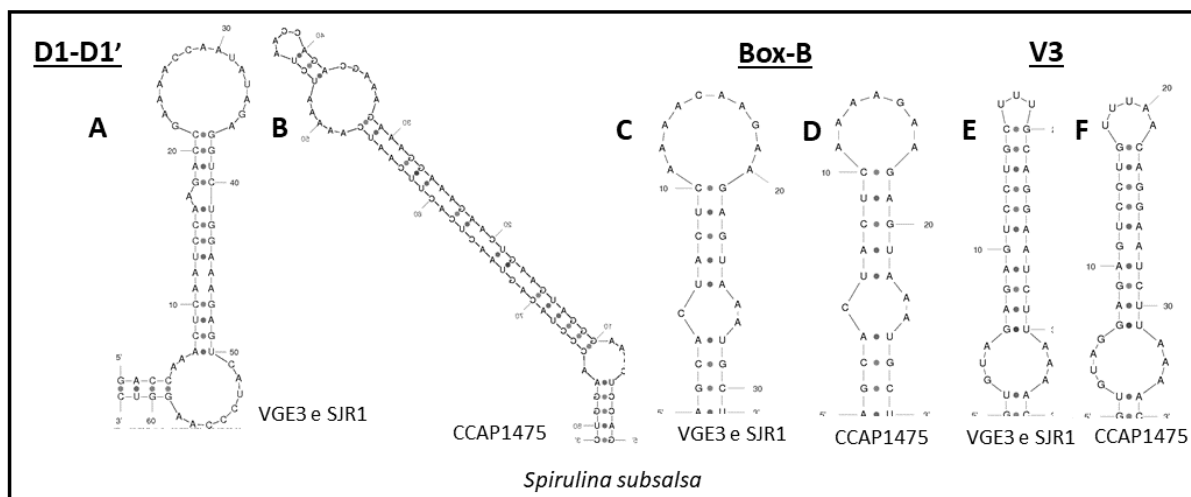


Fig. 9. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A-B) Box-B (C-D) e V3 (E-F) de *S. subsalsa* (A,C,E) e *S. subsalsa* CCAP1475 (B,D,F).

Spirulina subsalsa Oersted ex Gomont, *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7*, 16: 91-264, pls 1-7. 1892.

(Figura 8)

Tricomas densamente espiralados, emaranhados, conteúdo celular homogêneo, verde-azulado, 1,0-1,8 µm de diâm., não constritos, sem bainha; espiras firmemente unidas, 2 µm de largura, 3,0-3,5 µm de altura, intensa motilidade na forma de rotação e deslizamento, célula apical arredondada.

Amostras: SJR1 e VGE3

4.3. Ordem Chroococcales

A ordem Chroococcales foi representada aqui por apenas uma linhagem pertencente a família Chroococcaceae (Fig. 10). Chroococcales é um grupo composto apenas por cianobactérias cocóides distribuídas em oito famílias com 45 gêneros descritos (KOMÁREK et al., 2014).

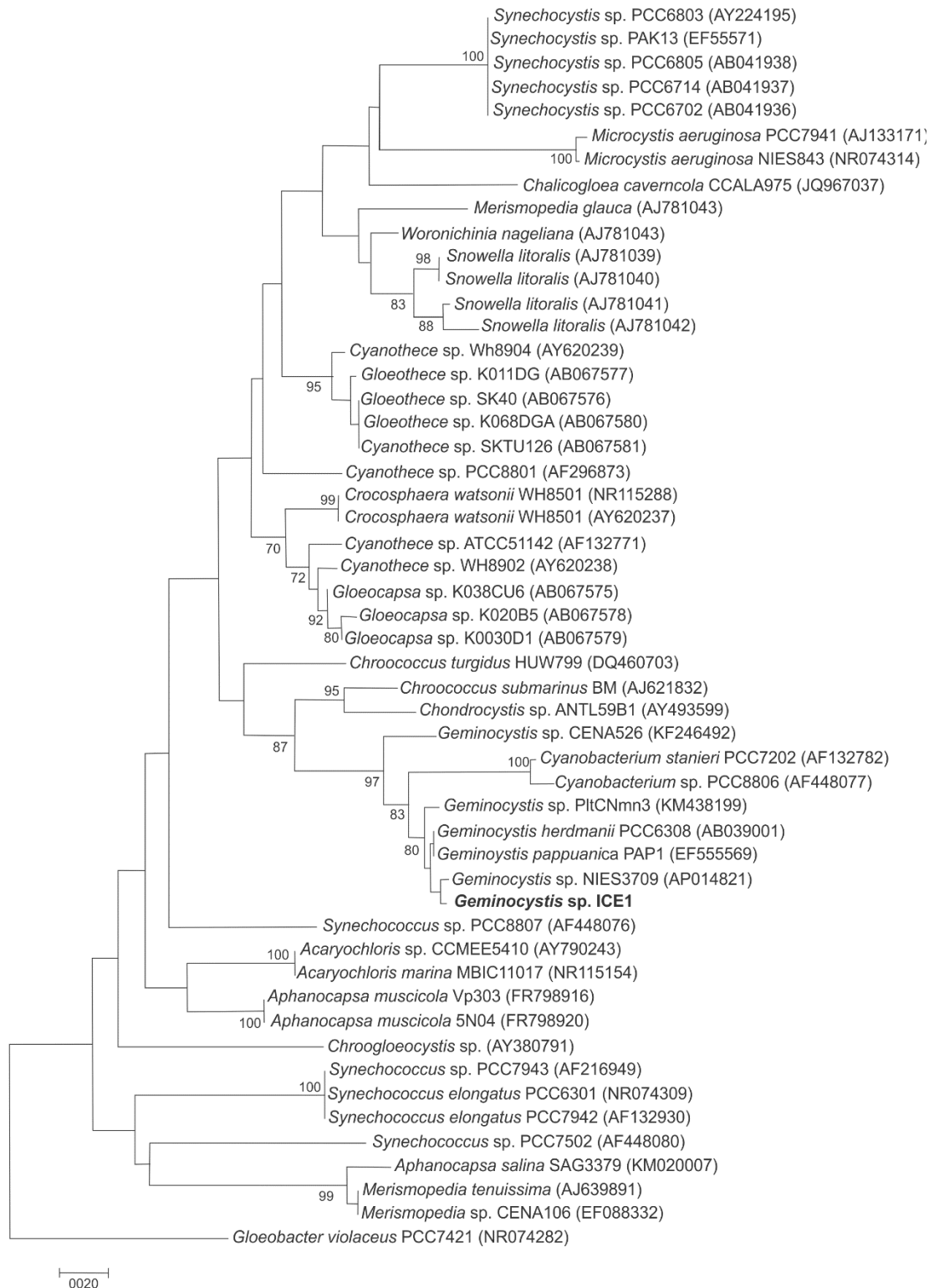


Fig. 10. Árvore consenso das Chroococcales com base em seqüências do gene RNAr 16S da linhagem *Geminocystis sp. ICE1* sequenciada neste estudo (em negrito) e 51 linhagens disponíveis no *GenBank* e construída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Os valores de *bootstrap* acima de 70% para a ML estão representados junto aos ramos. Barra = 0,02 número de substituições de nucleotídeos por site.

4.3.1. Família Chroococcaceae

Encontramos uma população de Chroococcaceae, sendo identificada como pertencentes ao gênero *Geminocystis*. A linhagem ICE1 foi identificada como *Geminocystis* sp. (Fig. 11).

Rippka e Bazire (1983) separaram o gênero *Synechocystis* em três gêneros utilizando critérios bioquímicos, sendo eles *Cyanobium*, *Cyanothece* e *Cyanobacterium* e, mais tarde, provou-se que os gêneros *Cyanobium* e *Cyanobacterium* possuíam suporte por métodos citológicos e moleculares (KOMÁREK et al. 2004). Outro novo gênero foi separado de *Synechocystis* e denominado *Geminocystis* (KORESULOVÁ et al. 2009), sendo um táxon irmão de *Cyanobacterium* e diferir deste pela posição genética (RNAr 16S <94.4%) e pelo plano de divisão.

A linhagem *Geminocystis* sp. (ICE1) ficou agrupada num clado bem suportado (ML-97%) com a linhagem referência *Cyanobacterium stanieri* PCC7202 e outras linhagens de *Cyanobacterium* e do gênero *Geminocystis* (Fig. 10). Morfologicamente, a linhagem *Geminocystis* sp. (ICE1) se assemelha à linhagem *Cyanobacterium stanieri*, entretanto, a sequência do RNAr 16S foi mais próxima do gênero *Geminocystis* (Fig. 10). Bravakos e colaboradores (2016) encontraram resultado similar, a linhagem *Geminocystis* sp. PltCNmn3 ficou agrupado com a linhagem *Geminocystis* sp. NIES3709 (ML – 92%) embora apresente apenas um plano de divisão, característico de *Cyanobacterium*.

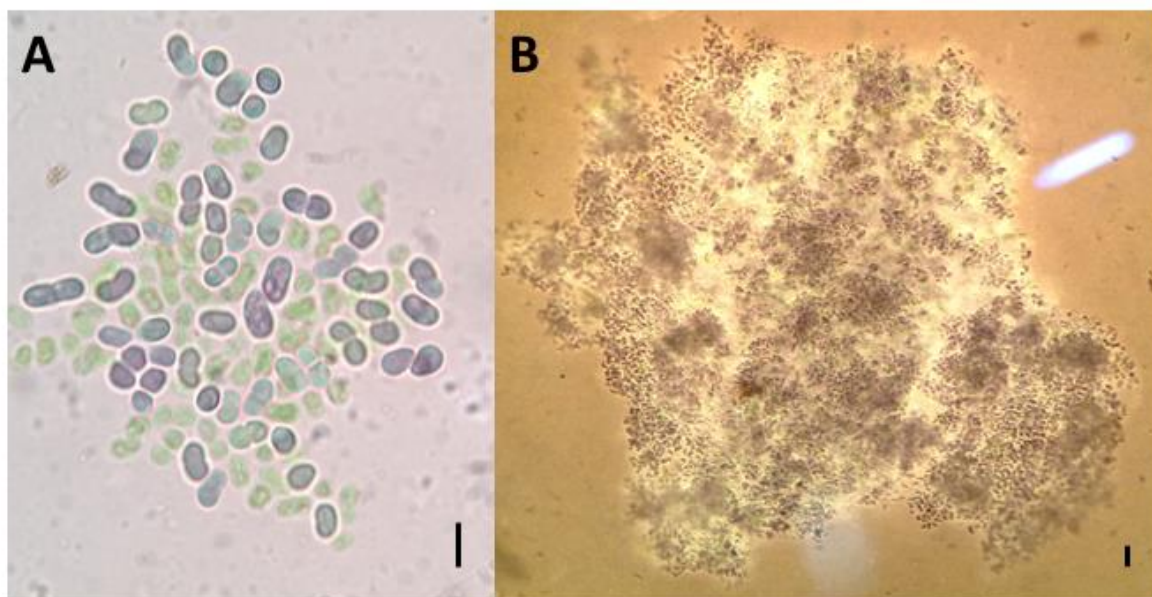


Fig. 11. Células solitárias (A) e aspecto da colônia (B), em nanquim, da linhagem *Geminocystis* sp. Barras: 2 (A) e 10 μ m (B).

Segundo Koresulová et al. (2009), *Geminocystis* pode ser caracterizado como um gênero morfologicamente e ecologicamente próximo a *Cyanobacterium*, mas diferencia-se deste pelo tipo de divisão celular (dois planos), sendo que a similaridade do RNAr 16S entre estes gêneros foi de 93 a 94%.

O ITS 16S-23S da linhagem de *Geminocystis* sp. (ICE1) e da linhagem *Geminocystis* sp. PltCNmn3 apresentaram uma sequência de 346 pares de bases, enquanto a linhagem PAP1 apresentou uma sequência incompleta de 320 pares de bases, sendo as únicas linhagens do clado com sequências de ITS 16S-23S disponíveis no *GenBank*. As linhagens estudadas apresentaram ambos os RNAs transportadores, RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala} e as estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 foram praticamente iguais entre todas (Fig. 12). No trabalho de Koresulová et al. (2009), apesar das sequências de ITS 16S-23S não estarem disponíveis no *GenBank*, as estruturas secundárias das linhagens *Cyanobacterium* sp. PCC7202 e *Geminocystis herdmanii* PCC6308 também apresentaram diferenças entre esses gêneros.

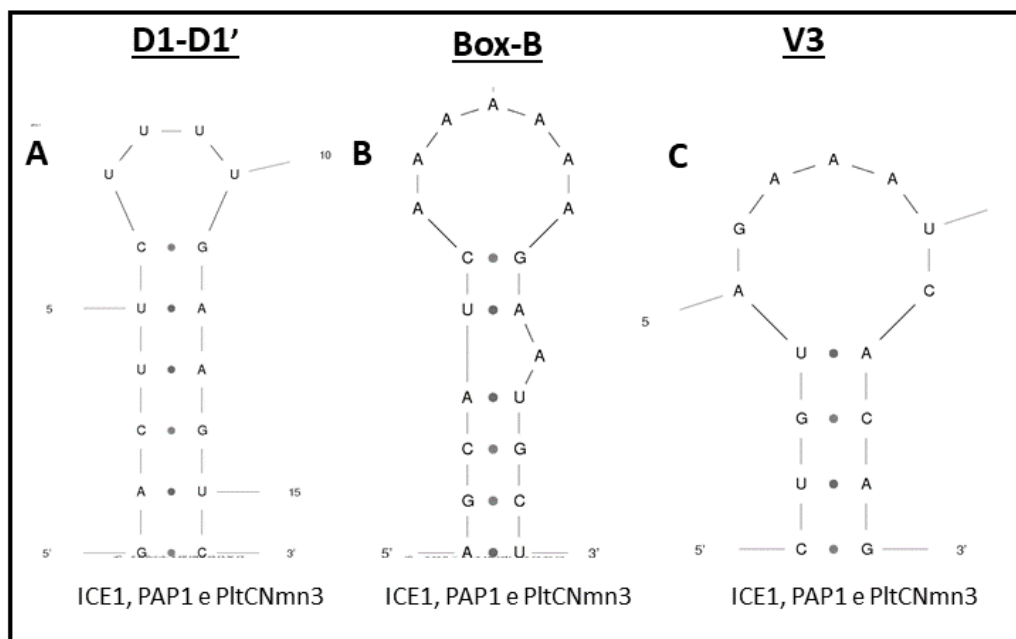


Fig. 12. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Geminocystis* sp. ICE1 e PltCNmn3 e *Geminocystis papuanica* PAP1. A. Região D1-D1'; B. Região Box-B. C. Região V3.

Geminocystis sp.

(Figuras 11A-B)

Células solitárias ou em duplas após a divisão celular, agrupadas irregularmente em colônias, sem envelope gelatinoso, mais ou menos cilíndricas, com ápice arredondado, levemente curvas, conteúdo celular homogêneo, verde-azulado, 3,0-5,0 x 2-3,5 µm. Divisão celular transversal assimétrica ao longo do eixo celular resultando em duas células filhas isomórficas.

Amostra: ICE1

4.4. Ordem Oscillatoriales

Oscillatoriales é um grupo com representantes unicelulares (*Cyanothece*) e filamentosos, distribuídos em sete famílias, abrangendo mais de 40 gêneros (KOMÁREK et al., 2014). A ordem Oscillatoriales foi representada neste estudo por 21 táxons distribuídos em quatro famílias: Coleofasciculaceae, Microcoleaceae, Oscillatoriaceae e Gomontiellaceae (Fig.

13). As linhagens observadas correspondem morfologicamente aos gêneros *Geitlerinema*, *Anagnostidinema*, *Phormidium*, *Planktothricoides*, *Microcoleus*, *Oscillatoria* e *Blennothrix*, entretanto, através da análise do RNAr 16S algumas dessas linhagens foram agrupadas em clados separados destes gêneros, sendo consideradas como novos táxons crípticos. Este é o caso das linhagens ICE3, SJR2 e GVI2, definidas como o novo gênero e espécie *Koinonema pervagatum* (**Capítulo III**), e da linhagem SFS3, definida como o novo gênero e espécie *Blennothricopsis periphytica* (**Capítulo IV**). As linhagens FPA1, NCA1, SFS1 e UBA3 identificadas como *Phormidium* também foram trabalhadas separadamente no **Capítulo V**.

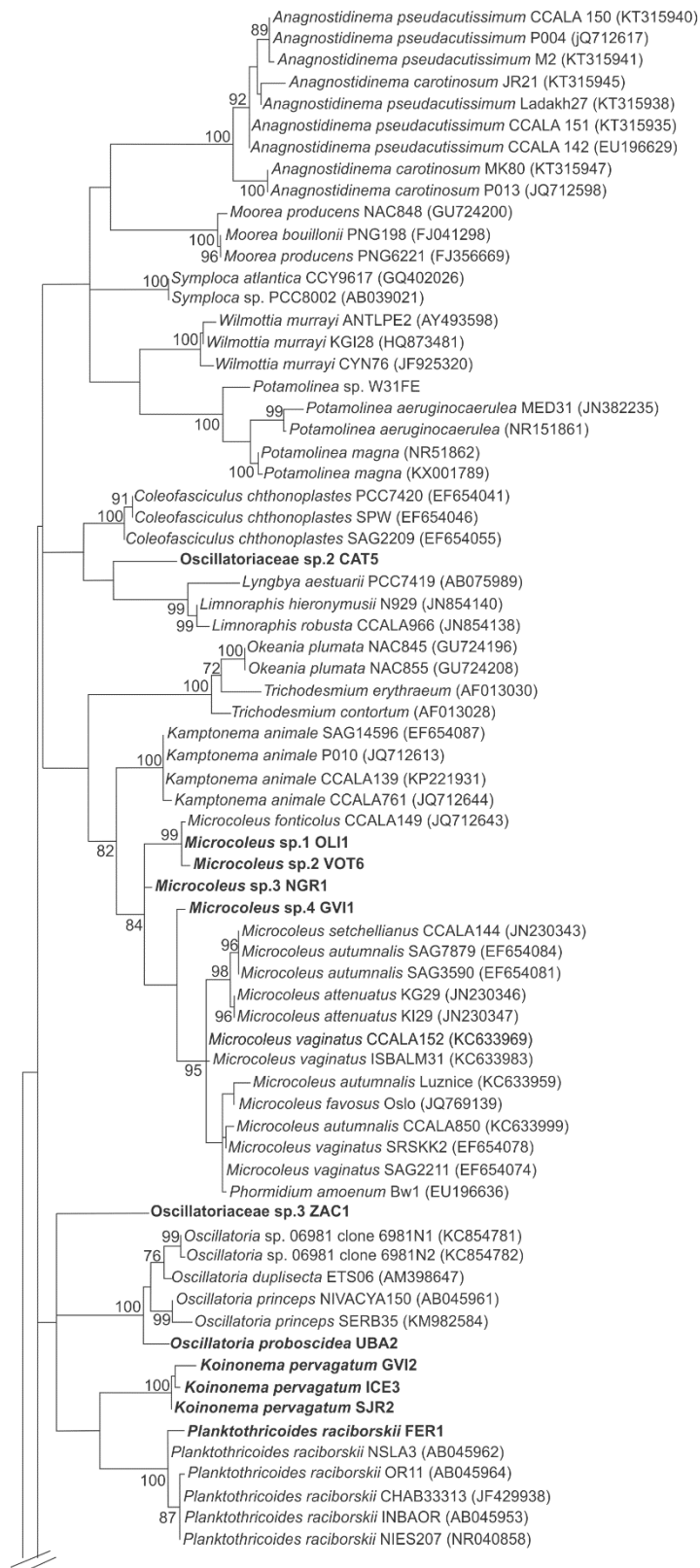


Fig. 13. Árvore consenso (parcial) das Oscillatoriales com base em sequências do gene RNAr 16S de 21 linhagens sequenciadas neste estudo (em negrito) e 89 linhagens disponíveis no *GenBank* e construída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Os valores de *bootstrap* acima de 70% para a ML estão representados junto aos ramos.

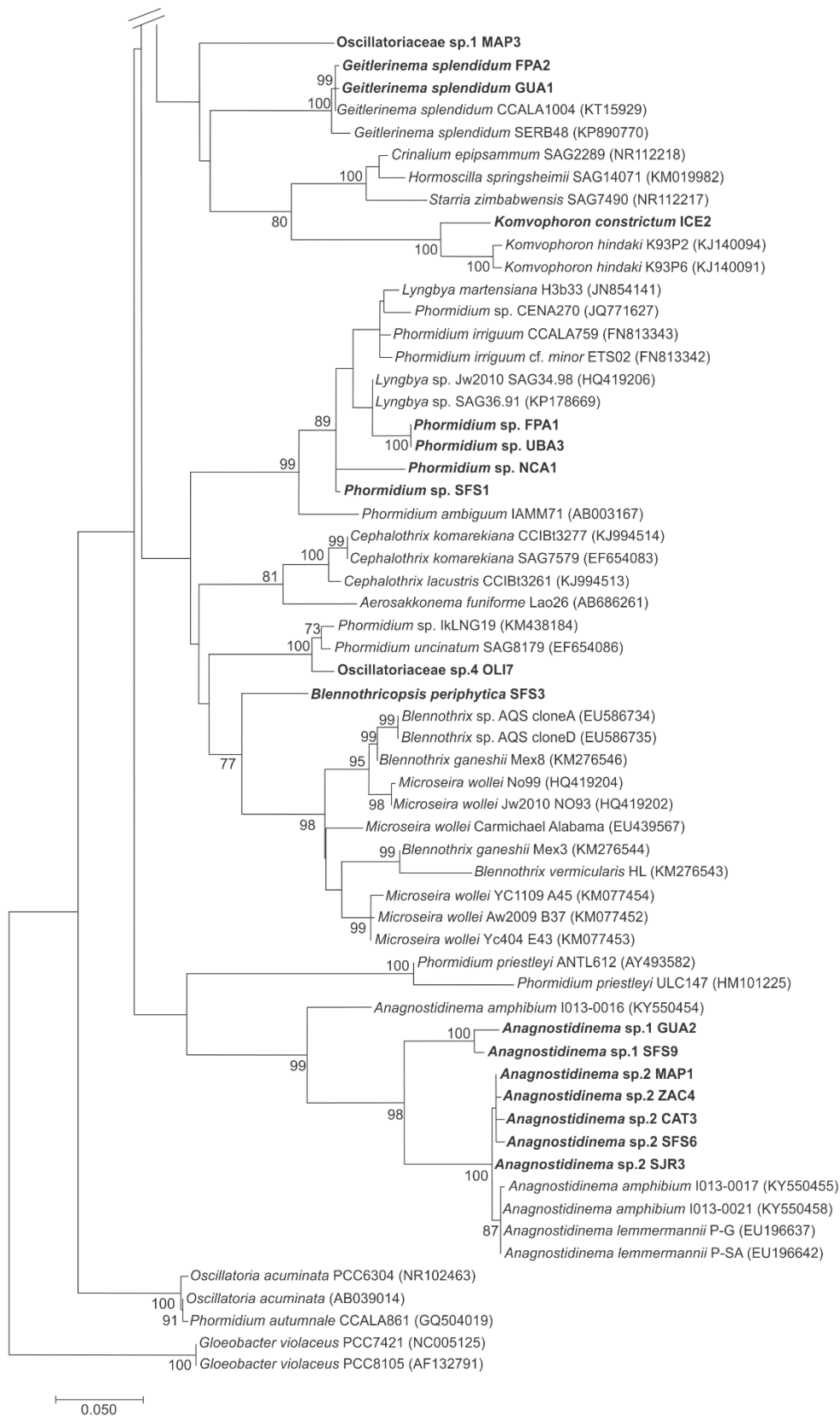


Fig. 13. (cont.) Barra = 0,02 número de substituição de nucleotídeos por site.

4.4.1. Família Coleofasciculaceae

Neste trabalho encontramos duas populações de Coleofasciculaceae (FPA2 e GUA1), sendo identificadas como pertencentes ao gênero *Geitlerinema* e à espécie *G. splendidum* (Greville ex Gomont) Anagnostidis. Encontramos também sete populações pertencentes ao gênero *Anagnostidinema*. As linhagens GUA2, SFS9, SJR3, ZAC4, CAT3, MAP1 e SFS6 não foram identificadas em nível específico, sendo separadas em *Anagnostidinema* sp.1 (GUA2 e SFS9) e *Anagnostidinema* sp.2 (SJR3, ZAC4, CAT3, MAP1 e SFS6).

Geitlerinema splendidum é uma espécie de água doce, bentônica, encontrada no sedimento ou sob plantas aquáticas em ambientes lênticos, distribuída pelo mundo todo (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). As linhagens de *G. splendidum* apresentaram morfologia correspondente à descrição de *G. splendidum* (Fig. 14), bem como dimensões celulares correspondentes (tricomas 1,8-3,0 μm de diâm., células 3-9 μm de compr.).

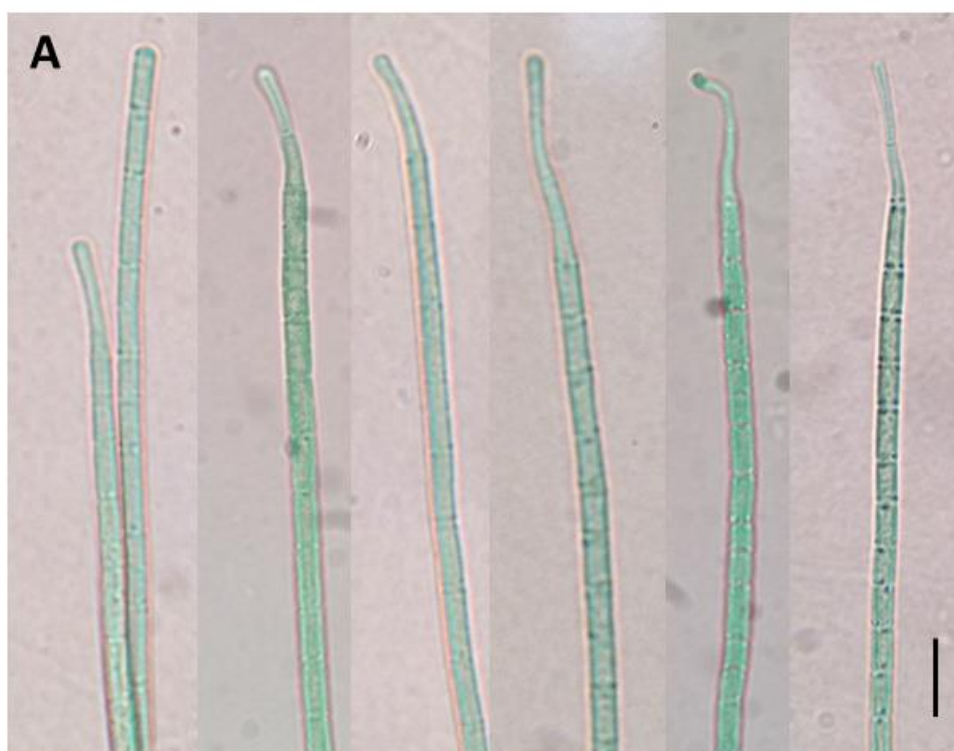


Fig. 14. Fotomicrografias de *Geitlerinema splendidum* apresentando o aspecto típico da célula apical alongada, capitada e curva. Barra: 5 μm .

O clado formado pela análise do RNAr 16S das linhagens estudadas e de duas linhagens de *G. splendidum* disponíveis no *GenBank*, apresentou alto suporte (ML-100%) (Fig. 13).

A análise do ITS 16S-23S produziu uma sequência de 483 e 479 pares de bases para as linhagens de *G. splendidum*, respectivamente. A única linhagem com a sequência de ITS disponível no *GenBank*, CCALA1004 apresentou uma sequência de 530 pares de bases. Todas as linhagens analisadas apresentaram os dois RNA transportadores, RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}, e as estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 foram bastante similares (Figura 15).

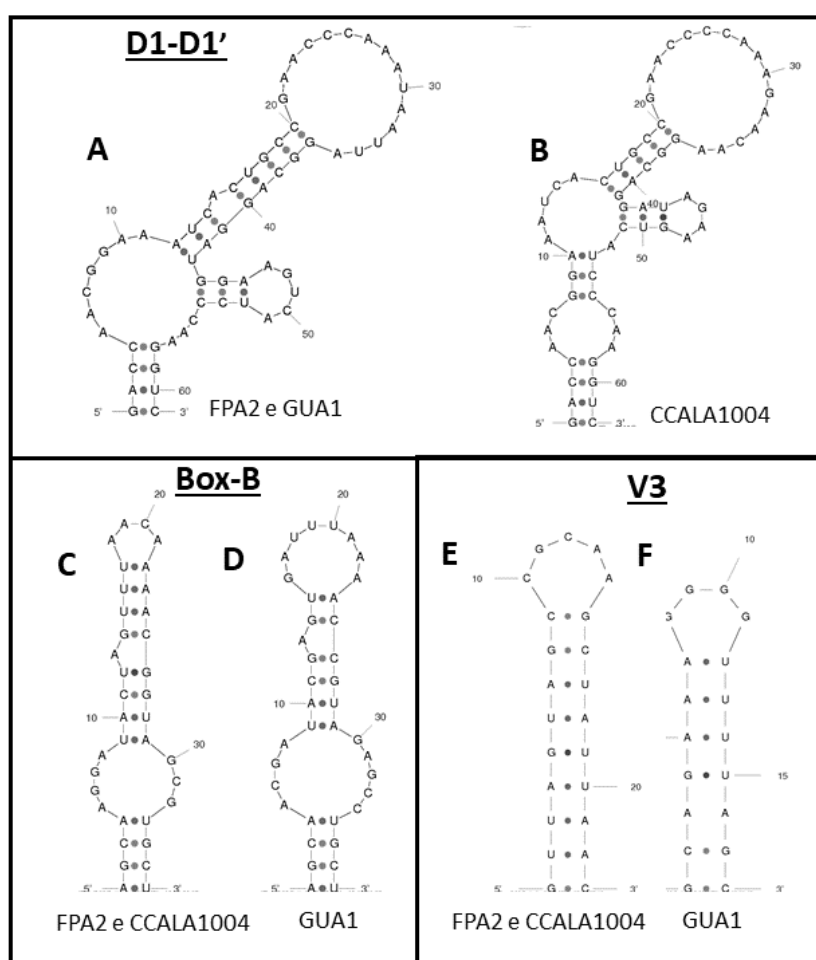


Fig. 15. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Geitlerinema splendidum*. A. Região D1-D1'; B. Região Box-B. C. Região V3.

Geitlerinema splendidum (Greville ex Gomont) Anagnostidis, *Plant Systematics and Evolution* 164: 33-46. 1989.

(Figura 14)

Tricomas finos e longos, dispostos em feixes, retos a curvos, 1,5-3,0 µm de diâm., sem bainha, não constrictos, levemente atenuados em direção ao ápice, presença de movimento de oscilação; células 3,0-8,0 µm de compr., mais longas que largas, célula apical alongada, atenuada, capitada e curva, presença de grânulos de cianoficina próximos ao septo, conteúdo celular verde-azulado.

Amostras: FPA2 e GUA1.

Anagnostidinema sp.1 e sp.2 ficaram agrupadas num clado com alto suporte (ML-99%) juntamente com outras duas linhagens do gênero *Anagnostidinema* (Fig. 13). Entretanto, *Anagnostidinema* sp.1 e sp.2 ficaram separadas (ML-99%) do clado composto pela espécie tipo do gênero *Anagnostidinema pseudacutissimum* CCALA 150.

As medidas celulares apresentadas para as linhagens estudadas estão dentro do intervalo de medidas descrito para *Anagnostidinema* (tricomas 1-6 µm de diâm., células isodiamétricas ou mais longas que largas).

Anagnostidinema é um gênero proposto por Strunecký et al. (2017) a partir do gênero *Geitlerinema*. Segundo Strunecký et al. (2017), *Geitlerinema* é um gênero composto unicamente pela espécie *G. splendidum*, uma vez que a análise filogenética do RNAr 16S e a estrutura secundária do ITS demonstraram que as espécies *G. pseudacutissimum* e *G. amphibium* possuíam baixa identidade com *G. splendidum*, além de ficarem num clado separado desta última. Deste modo, foi proposto o novo gênero *Anagnostidinema*. Ainda, de acordo com Strunecký et al. (2017), o gênero *Anagnostidinema* poderá ser fragmentado em novos gêneros crípticos no futuro.

Embora morfologicamente relacionadas, os valores de similaridade das sequências do RNAr 16S entre *Anagnostidinema* sp.1 e *Anagnostidinema* sp.2 foram menores do que 94,32% sugerindo que podem pertencer a gêneros distintos.

A análise do ITS 16S-23S mostrou uma sequência de 597 pares de bases para *Anagnostidinema* sp.1 e de 396 a 444 para *Anagnostidinema* sp.2. Das cinco linhagens de *Anagnostidinema* do clado composto pelas linhagens deste estudo nenhuma possui sequência do ITS disponível no *GenBank*, apenas quatro linhagens de *Anagnostidinema* que ficaram agrupadas em outro clado com o tipo possuem a sequência do ITS completa *A. pseudacutissimum* Ladakh e M2 e *A. carotinosum* JR21 e MK80.

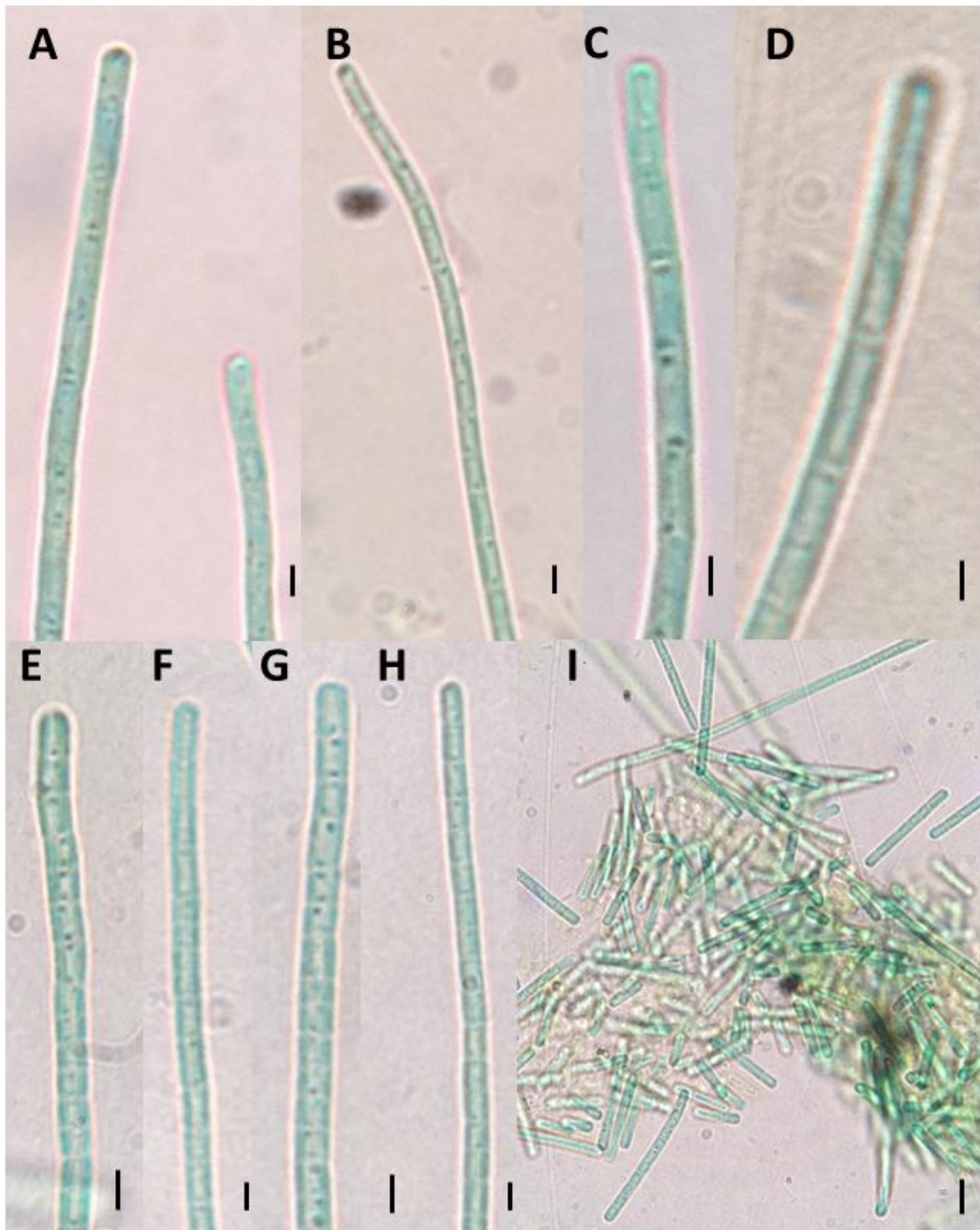


Fig. 14. Fotomicrografias de *Anagnostidinema* sp.1 (A-D) e *Anagnostidinema* sp.2 (E-I). Barra: 2 μ m (A-H) e 5 μ m (I).

As estruturas secundárias das regiões D1-D1' e V3 de *Anagnostidinema* sp.1 foram as mesmas entre si enquanto para a região Box-B houve diferenças entre as duas linhagens (Fig.

15). Para a linhagem *Anagnostidinema* sp.2 houve diferenças entre as linhagens para a região D1-D1' e Box-B, enquanto a região V3 foi a mesma para todas. Todas as linhagens de *Anagnostidinema* deste estudo apresentaram apenas um dos transportadores, o RNAt^{lle}.

Os resultados obtidos para as linhagens aqui identificadas com o gênero *Anagnostidinema* podem representar novos táxons para a ciência e os dados serão trabalhados para compor uma publicação com a descrição para o novo gênero.

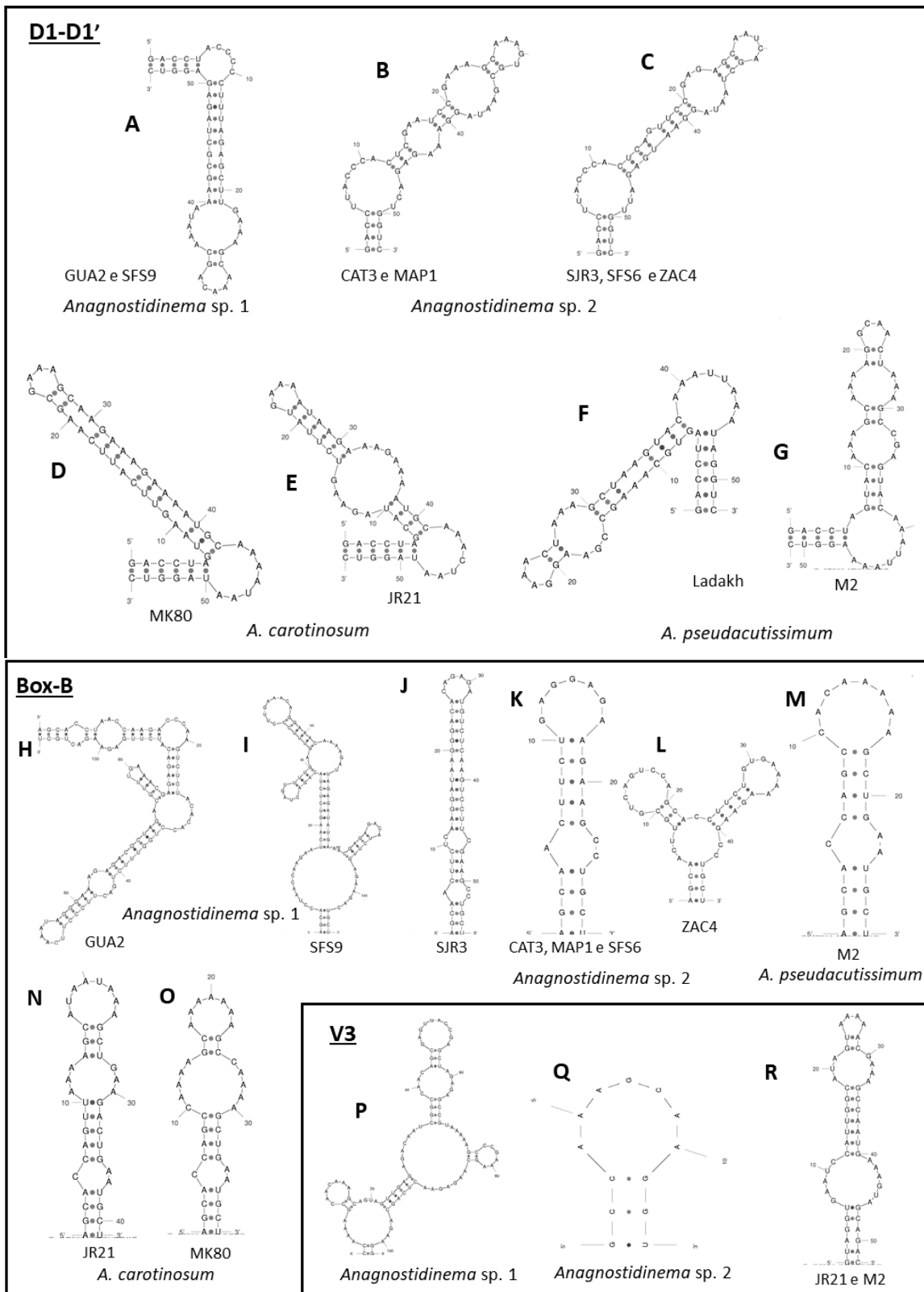


Fig. 15. Estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A-G), Box-B (H-O) e V3 (P-R) para *Anagnostidinema* sp.1 (A, H, I, P), *Anagnostidinema* sp.2 (B, C, J, K, L, Q), *A. carotinosum* JR21 e MK80 (D, E, N, O, R) e *A. pseudacutissimum* M2 e Ladakh (F, G, M, R).

Anagnostidinema sp.1

(Figura 14A-D)

Tricomas emaranhados, isopolares, retos a flexuosos, 1,5-2,0 µm de diâm., não constritos, não atenuados, sem bainha, sem motilidade; células cilíndricas mais longas que largas, 4,0-8,0 µm de compr., conteúdo celular verde-azulado, homogêneo, sem aerótopos, célula apical arredondada.

Amostras: GUA2 e SFS9.

Anagnostidinema sp.2

(Figura 14E-I)

Tricomas emaranhados, isopolares, retos a flexuosos, 1,0-2,0 µm de diâm., não constritos, não atenuados, presença de bainha, sem motilidade; células cilíndricas isodiamétricas a mais longas que largas, 1,5-5,0 µm de compr., conteúdo celular verde-azulado, homogêneo, sem aerótopos, célula apical arredondada.

Amostras: CAT3, MAP1, SJR3, SFS6 e ZAC4.

4.4.2. Família Microcoleaceae

Encontramos cinco populações de Microcoleaceae, sendo identificadas como pertencentes aos gêneros *Microcoleus* e *Planktothricoides*. A linhagem FER1 foi identificada como *Planktothricoides raciborskii* (Woloszynska) Suda & Watanabe e as linhagens GV11, NGR1, OLI1 e VOT6 não foram identificadas em nível específico, sendo separadas em *Microcoleus* sp.1, *Microcoleus* sp.2, *Microcoleus* sp.3 e *Microcoleus* sp.4, respectivamente.

Planktothricoides raciborskii é uma espécie de hábito planctônico encontrada em lagos na Ásia e na África (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). A linhagem *P. raciborskii* foi caracterizada como bentônica cuja presença de aerótopos nos tricomas foi observada apenas na

fase mais tardia de crescimento. Além disso, em cultivo, os tricomas são encontrados agrupados, dispostos em feixes e não solitários como na descrição original para a espécie. Essas diferenças podem estar relacionadas às condições de cultivo, onde alterações morfológicas são frequentes. As dimensões celulares encontradas para as linhagens também são compatíveis com aquelas descritas para a espécie (tricomas 8,0-9,5 µm de diâm.) (Fig. 16).

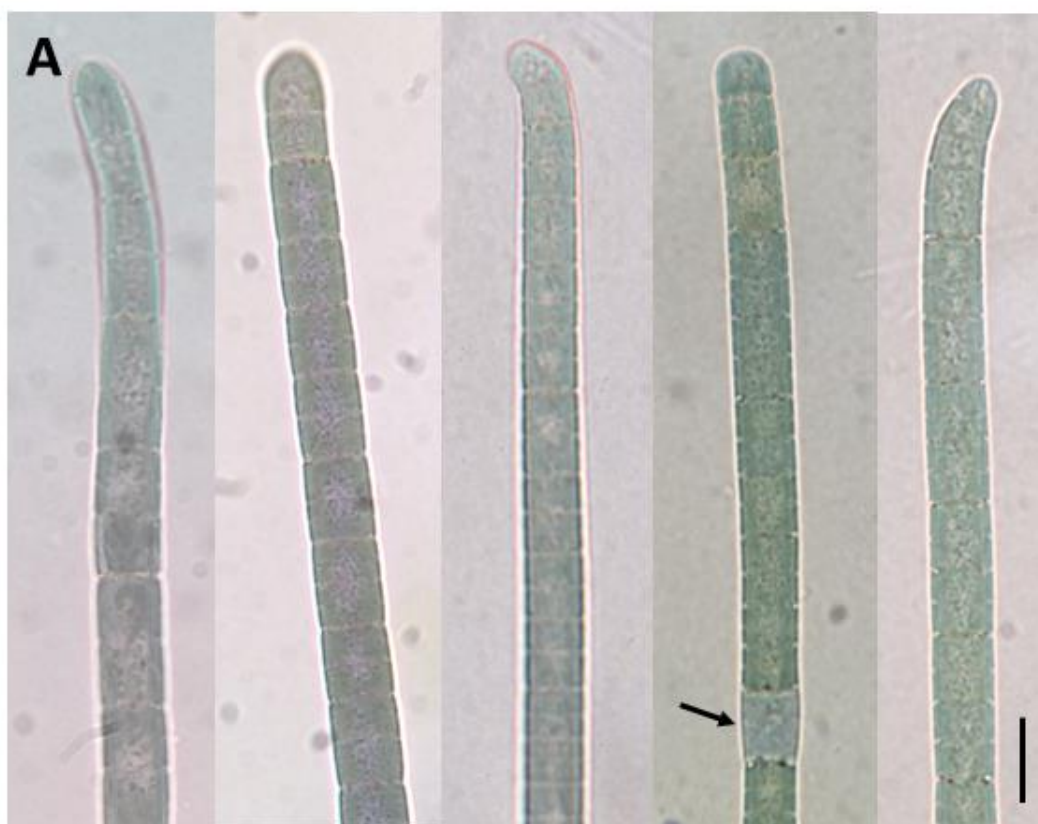


Fig. 16. Fotomicrografias de *Planktothricoides raciborskii* com detalhe para a formação de necrídio (seta). Barra: 5 µm.

A linhagem *P. raciborskii* ficou agrupada num clado com alto suporte (ML-100%) com a linhagem tipo do gênero, *P. raciborskii* NIES207, e com mais quatro linhagens da espécie (Fig. 13).

A sequência de ITS 16S-23S da linhagem *P. raciborskii* apresentou 464 pares de bases e os dois RNA transportadores, RNA^{Ile} e RNA^{Ala} . As demais linhagens analisadas não possuem sequências do ITS 16S-23S disponíveis no *GenBank*, de modo que não foi possível realizar comparações entre as linhagens. As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 encontram-se na Figura 17.

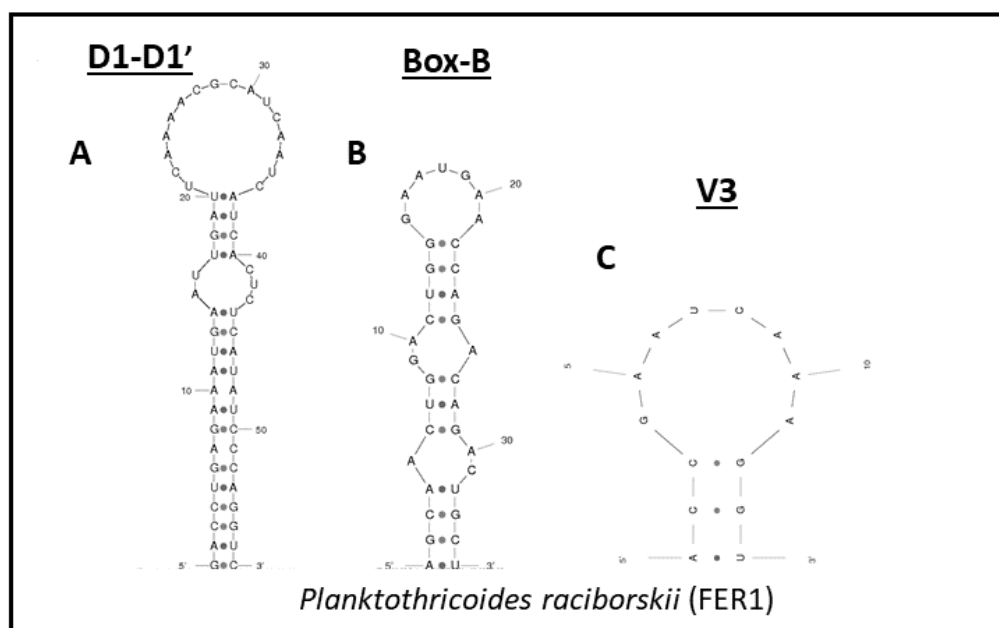


Figura 17. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S da linhagem *P. raciborskii* (FER1). A. Região D1-D1'; B. Região Box-B. C. Região V3.

Planktothricoides raciborskii (Woloszynska) Suda & Watanabe, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1577-1595. 2002.

(Figura 16)

Tricomas longos, dispostos em feixes, retos, levemente atenuados em direção ao ápice, ápice curvo, levemente constrictos, 5,0-8,0 μm de diâm., sem bainha, movimento de oscilação, presença de aerótopo na fase mais tardia de crescimento; células isodiamétricas a mais longas

que largas, 2,0-10,0 μm de compr., conteúdo homogêneo, verde oliva, célula apical arredondada.

Amostra: FER1

Microcoleus sp.1, *Microcoleus* sp.2, *Microcoleus* sp.3 e *Microcoleus* sp.4 apresentaram morfologia típica do gênero *Microcoleus*: filamentos contendo tricomas atenuados em direção ao ápice, células isodiamétricas e presença de caliptra. Entretanto, morfologicamente, a linhagem de *Microcoleus* sp.4 é mais similar ao gênero *Coleofasciculus*: filamentos com tricomas constrictos, sem caliptra, células mais longas que largas (Fig. 18). *Microcoleus* é um gênero polifilético a partir do qual novos gêneros têm sido descritos, sendo um deles o gênero *Coleofasciculus*, composto por espécies bentônicas marinhas (SIEGESMUND et al. 2008, STRUNECKY et al. 2014).

As linhagens *Microcoleus* sp.3 e *Microcoleus* sp.4 ficaram agrupados com uma linhagem de *Microcoleus fonticolus* CCALA149 num clado (Fig. 13) com alto suporte (ML-99%), e a topologia da árvore mostrou uma relação filogenética entre *Microcoleus* sp.1, *Microcoleus* sp.2 e outras linhagens de *Microcoleus* disponíveis no *GenBank*, incluindo linhagens de *Microcoleus vaginatus* CCALA152 e ISBALM31 (espécie tipo). Entretanto o clado formado entre todas essas linhagens apresentou baixo suporte (ML-76%).

Segundo Strunecky et al. (2014), a linhagem *M. fonticolus* CCALA149 pertence a um grupo com valores de similaridade para o RNAr 16S próximos de 100%, entretanto, as dimensões celulares variam consideravelmente, sendo a diversidade morfológica maior que a diversidade genética dentro do grupo. Esses mesmos resultados foram encontrados neste trabalho, onde também se observaram diferenças morfológicas entre as linhagens *Microcoleus* sp.3 e *Microcoleus* sp.4, com similaridades acima de 97,69% (Tabela 4).

O grupo formado pelas espécies relacionadas a *Microcoleus vaginatus* é polifilético e compõe-se de linhagens tanto de ambientes aquáticos quanto terrestres, de desertos e regiões polares, para os quais a diversidade de formas ultrapassa a diversidade genética, indicando que se trata de um complexo de espécies para o qual a delimitação apenas pelo RNAr 16S não é suficiente (STRUNECKY et al. 2014). Esses resultados contrariam o esperado para a maior parte dos táxons no grupo cianobactéria, onde o registro de espécies crípticas, com diversidade genética maior que a morfológica, é frequente.

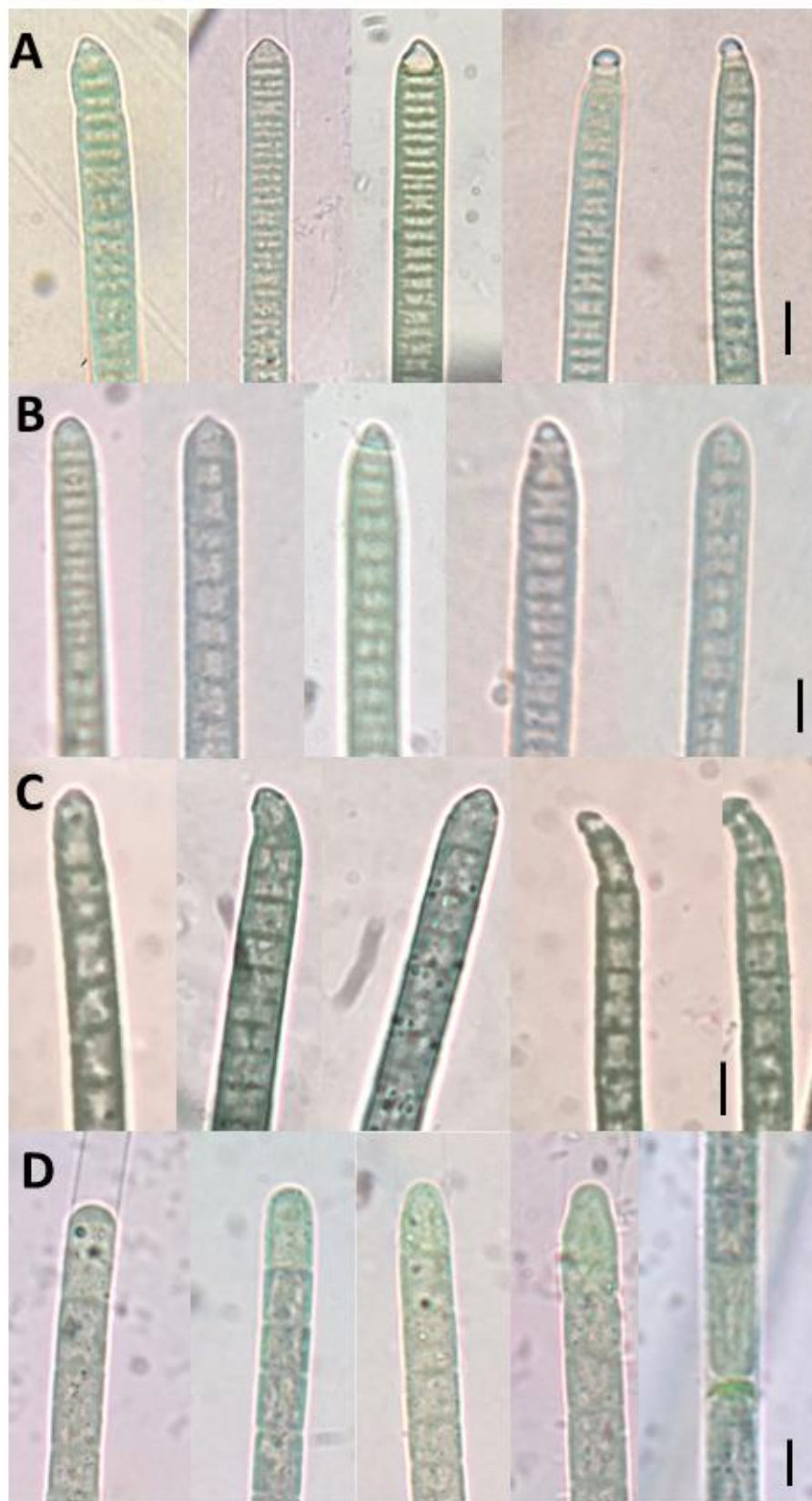


Fig. 18. Fotomicrografias de *Microcoleus* sp.1 (A), *Microcoleus* sp.2 (B), *Microcoleus* sp.3 (C) e *Microcoleus* sp.4 (D). Barra: 5 μ m.

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Microcoleus</i> sp. 1 (GVII1)		98,49	97,17	97,86	97,70	96,39	96,74	96,99	96,57	95,75	95,84	96,90	95,84	95,84
2. <i>Microcoleus</i> sp. 2 (NGR1)	17		98,40	97,69	97,86	95,84	96,28	96,44	96,43	95,48	95,48	96,53	95,48	95,59
3 <i>Microcoleus</i> sp. 3 (OLII1)	33	18		98,20	99,11	96,03	96,01	96,26	95,20	95,48	95,12	96,35	95,12	94,44
4. <i>Microcoleus</i> sp. 4 (VOT6)	25	26	21		98,58	95,66	95,65	95,89	95,71	95,12	94,76	95,80	94,76	95,03
5. <i>M. fonticolus</i> CCALA149	10	16	24	26		96,01	96,00	96,25	95,57	95,47	95,11	96,34	95,11	94,69
6. <i>M. vaginatus</i> CCALA152	44	48	46	40	44		99,10	97,74	97,82	99,37	99,00	97,83	98,82	99,23
7. <i>M. vaginatus</i> ISBALM31	44	48	41	36	44	10		98,09	98,18	98,64	98,91	98,18	98,73	99,00
8. <i>M. attenuatus</i> KG29	41	45	39	33	41	25	21		99,54	97,29	97,92	99,54	97,74	97,64
9. <i>M. autumnalis</i> SAG3590	56	50	40	40	50	24	20	5		97,37	98,01	100,00	97,82	97,79
10. <i>M. autumnalis</i> CCALA850	50	54	50	47	50	7	15	30	29		99,10	97,38	98,91	99,50
11. <i>M. autumnalis</i> Luznice	54	58	50	46	54	11	12	23	22	10		98,01	99,46	99,09
12. <i>M. setchellianus</i> CCALA144	40	46	38	34	40	24	20	5	0	29	22		97,83	97,74
13. <i>M. favosus</i> Oslo	54	58	50	46	54	13	14	25	24	12	6	24		99,28
14. <i>Phormidium</i> cf. <i>amoenum</i>	66	59	51	50	61	9	12	27	27	6	11	26	9	

Para a análise do ITS 16S-23S foram utilizadas 11 entre as linhagens que compuseram o clado, pois as demais sequências não estavam disponíveis no *GenBank*. Das 11 linhagens, apenas quatro possuíam a sequência completa, sendo que a estrutura secundária das regiões Box-B e V3 foi feita apenas para as linhagens *Microcoleus* sp.1 *Microcoleus* sp.2, CCALA144 e KG29 (Fig. 19).

O tamanho das sequências de ITS 16S-23S foi de 589, 621, 564 e 560 pares de bases para as linhagens *Microcoleus* sp.1, *Microcoleus* sp.2, KG29 e CCALA144 respectivamente. Foi observada a presença dos dois RNAs transportadores, RNAt^{Ile} e RNAt^{Ala}, nas quatro linhagens analisadas. A estrutura secundária da região D1-D1' mostrou-se bastante similar entre as 11 linhagens analisadas (Fig. 19), com sequências variando de 52 a 63 pares de bases. A região Box-B apresentou diferenças entre as linhagens deste estudo e aquelas do *GenBank*, sendo que entre estas últimas (CCALA144 e KG29) a estrutura foi semelhante. A região V3 e o espaçador, com sequências de 43 a 68 pares de bases foi mais semelhante entre as linhagens *Microcoleus* sp.1, CCALA144 e KG29, enquanto a *Microcoleus* sp.2 foi diferente das demais.

Os resultados observados para região D1-D1' do ITS 16S-23S corroboram os resultados do RNAr 16S de que o clado formado pelas linhagens de *Microcoleus* analisadas neste estudo e aquelas do *GenBank* representam um complexo de espécies. Estes resultados serão trabalhados em uma publicação futura para propor a descrição das quatro novas espécies para o gênero *Microcoleus*.

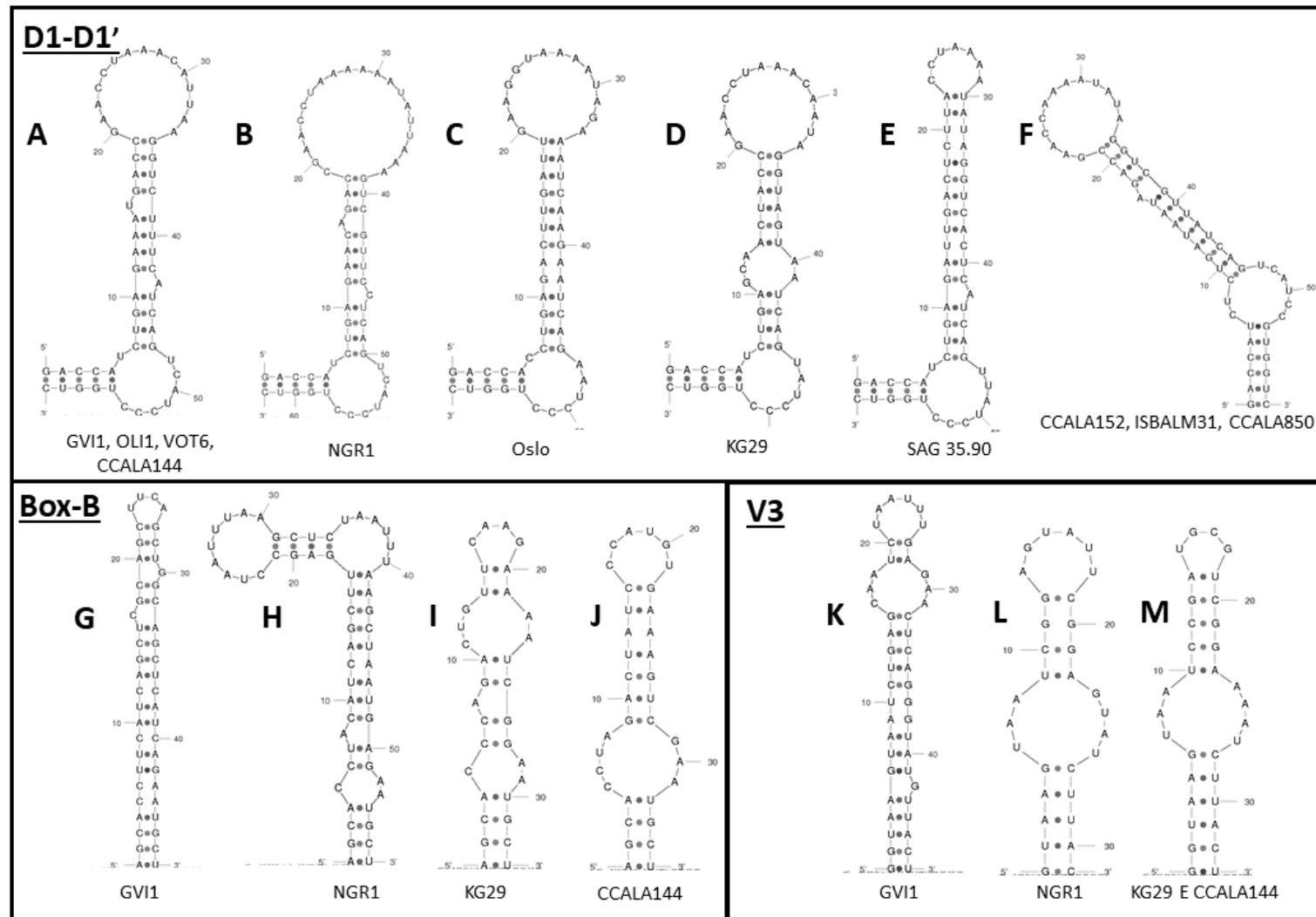


Fig. 19. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S de linhagens de *Microcoleus* estudadas neste trabalho e disponíveis no *GenBank*. Região D1-D1' (A-F), Box-B (G-J) e V3 (K-M).

Microcoleus sp.1

(Figura 18A)

Filamentos emaranhados, bainha fina e hialina contendo apenas um tricoma; tricomas dispostos em feixes, levemente constritos a não constritos, reto, atenuados em direção ao ápice, septo granuloso, 4,0-5,0 µm de diâm.; células isodiamétricas a mais curtas que largas, 1,0-2,0 µm de compr.; conteúdo celular granuloso; célula apical arredondada, cônico arredondada, com calíptro cônico-obtuso.

Amostra: GVII*Microcoleus* sp.2

(Figura 18B)

Filamentos emaranhados, bainha fina e hialina contendo apenas um tricoma; tricomas dispostos em feixes, levemente constritos a não constritos, reto, atenuados em direção ao ápice, septo granuloso, 4,0-5,0 µm de diâm.; células isodiamétricas a mais curtas que largas, 1,0-3,0 µm de compr.; conteúdo celular granuloso; célula apical arredondada, cônico arredondada, com calíptro cônico-obtuso.

Amostra: NGR1*Microcoleus* sp.3

(Figura 18C)

Filamentos emaranhados, bainha fina e hialina contendo apenas um tricoma; tricomas dispostos em feixes, levemente constritos a não constritos, reto, atenuados em direção ao ápice, septo granuloso, 4,0-5,0 µm de diâm.; células isodiamétricas a mais curtas que largas, 1,5-4,0 µm de compr.; conteúdo celular granuloso; célula apical arredondada, cônico arredondada, com calíptro cônico-obtuso.

Amostra: OLI1

Microcoleus sp.4

(Figura 18D)

Filamentos emaranhados, bainha fina e hialina contendo apenas um tricoma; tricomas dispostos em feixes, não constrictos, retos, não atenuados em direção ao ápice, 5,0-6,0 μm de diâm.; células isodiamétricas a mais longas que largas, 4,0-10,0 μm de compr.; conteúdo celular granuloso; célula apical arredondada a cônico-arredondada, sem calíptra.

Amostra: VOT6

4.4.3. Família Oscillatoriaceae

Encontramos cinco populações de Oscillatoriaceae, sendo que uma foi identificada como pertencente ao gênero *Oscillatoria* e as demais não puderam ser identificadas ao nível genérico. A linhagem UBA2 foi identificada como *Oscillatoria proboscidea* Gomont (Fig. 20) e as linhagens MAP3, CAT5, ZAC1 e OLI7 ficaram aqui identificadas como Oscillatoriaceae sp.1, Oscillatoriaceae sp.2, Oscillatoriaceae sp.3 e Oscillatoriaceae sp.4 respectivamente (Fig. 22).

O gênero *Oscillatoria* é encontrado em ambientes de água doce, com hábito bentônico e distribuição, provavelmente, cosmopolita (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). Segundo Komárek et al. (2014), é um gênero polifilético onde a maioria das espécies não possuem sequências do RNAr 16S disponíveis, sendo que as poucas existentes são de táxons marinhos incertos. No Brasil, a espécie *Oscillatoria proboscidea* tem ocorrência registrada no estado de São Paulo por Sant'Anna et al. (2011).

O clado formado pela linhagem *Oscillatoria proboscidea* e outras linhagens de *Oscillatoria* disponíveis no *GenBank*, incluindo uma linhagem da espécie tipo *Oscillatoria princeps* NIVA CYA150, apresentou alto suporte (ML-100%) (Fig. 13).



Fig. 20. Fotomicrografias de *Oscillatoria proboscidea* com ápice curvo e célula apical arredondada achatada e tricoma com formação de necrídio (seta). Barra: 10µm

A sequência de ITS 16S-23S da linhagem *Oscillatoria proboscidea* está incompleta e apresentou 416 pares de bases e apenas o RNA transportador para isoleucina, RNAt^{lle}. As únicas linhagens com sequência do ITS disponível no *GenBank* foram *Oscillatoria* sp. 06891A e 06891B. A linhagem estudada apresentou estrutura secundária da região D1-D1' diferente das demais (Fig. 21).

A confirmação da identificação da população estudada com a espécie *Oscillatoria proboscidea* fica restrita aos caracteres morfológicos uma vez que não há sequências do RNAr 16S disponíveis para essa espécie.

Oscillatoria proboscidea Gomont, *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7*, 16: 91-264, pls 1-7. 1892.

(Figura 20)

Talo membranáceo, verde escuro; tricomas verde azulados, 12-14 µm de diâm., retos, sem bainha, movimento de rotação, não constrictos, presença de grânulos no septo, atenuado em direção ao ápice, ápice curvo; células 2-5 µm de compr., mais curtas que largas, célula apical arredondada achatada com espessamento.

Amostra: UBA2

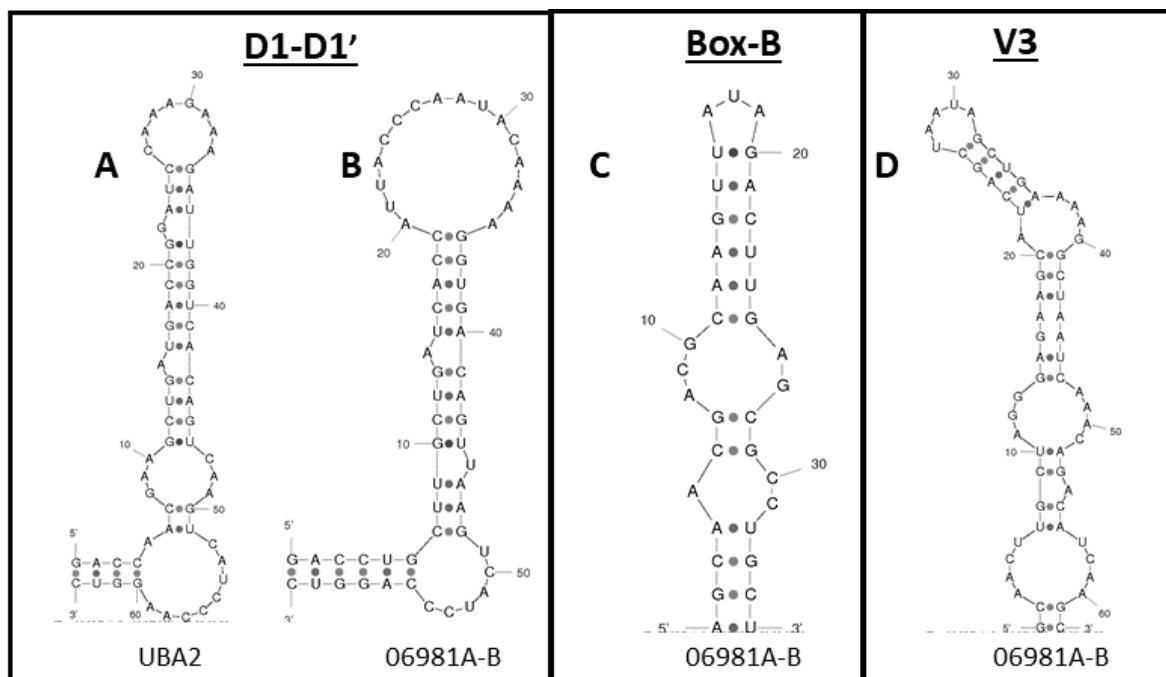


Fig. 21. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S das linhagens de *Oscillatoria*. Região D1-D1' (A-B), Região Box-B (C) e Região V3 (D).

As linhagens MAP3, ZAC1 e CAT5 (Fig. 22A, B e C, respectivamente) não puderam ser identificados em nível específico e apesar de possuírem morfologia correspondente a táxons da família Oscillatoriaceae, não ficaram agrupadas em nenhum clado na análise filogenética do rRNA 16S, indicando que podem se tratar de novos táxons ainda não descritos. A análise dessas

linhagens deverá ser aprofundada para melhor delimitação taxonômica. A linhagem OLI7 (Fig. 22D) ficou agrupada num clado com alto suporte (ML-100%) com outras duas linhagens de *Phormidium* sp. IkLNG19 e *Phormidium uncinatum* SAG81.79, entretanto, uma vez que *Phormidium* é um gênero reconhecidamente polifilético e o clado formado por essas linhagens está distante do clado de *Phormidium* verdadeiro, o estudo dessas linhagens indica que se trata de um novo gênero críptico a ser descrito.

As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 das linhagens MAP3, ZAC1, CAT5 e OLI7 encontram-se nas figuras 23 e 24. Todas as linhagens apresentaram os dois RNAs transportadores (RNA^{Ile} e RNA^{Ala}).

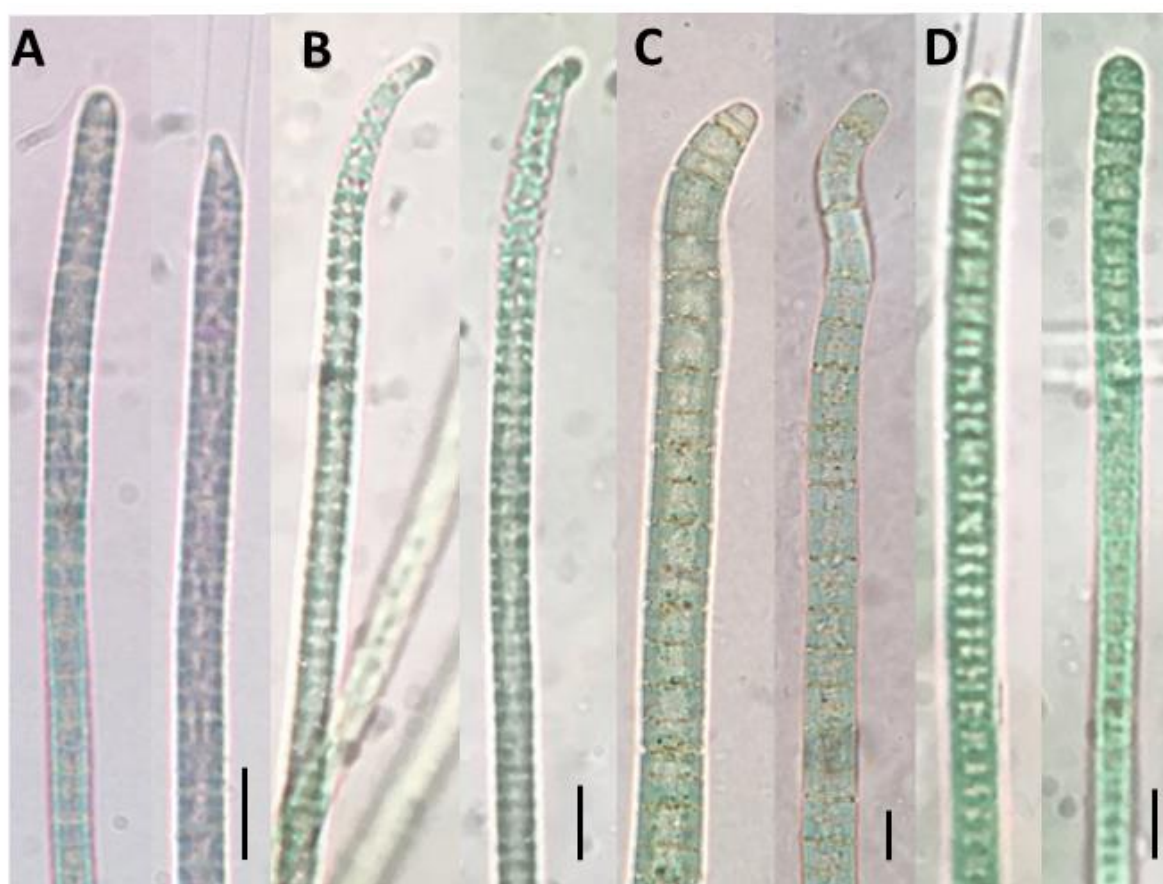


Fig. 22. Fotomicrografias das linhagens Oscillatoriaceae sp.1 MAP3, Oscillatoriaceae sp.2 CAT5, Oscillatoriaceae sp.3 ZAC1 e Oscillatoriaceae sp.4 OLI7. Barra: 5µm.

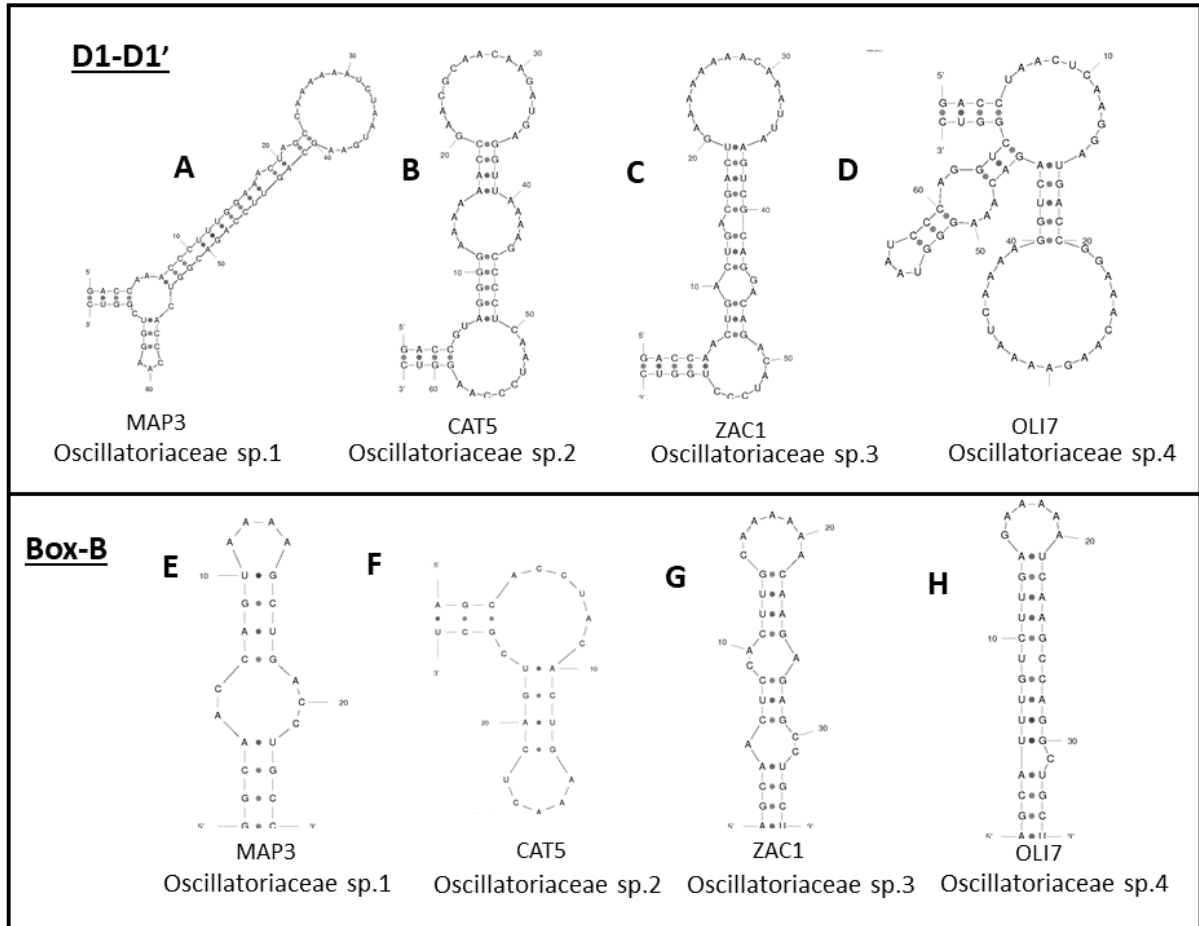


Fig. 23. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S para as regiões D1-D1'e Box-B das linhagens de Oscillatoriaceae sp.1, Oscillatoriaceae sp.2, Oscillatoriaceae sp.3 e Oscillatoriaceae sp.4.

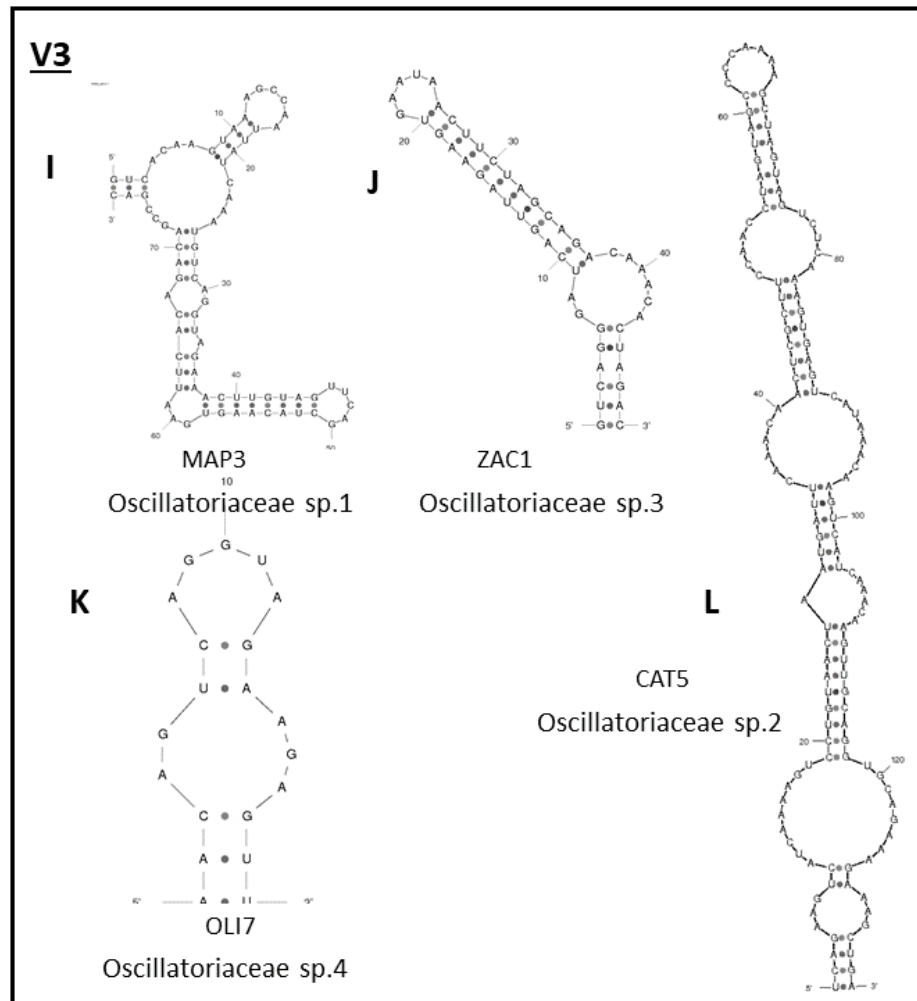


Fig. 24. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S para a região V3 das linhagens de Oscillatoriaceae sp.1, Oscillatoriaceae sp.2, Oscillatoriaceae sp.3 e Oscillatoriaceae sp.4..

Oscillatoriaceae sp.1

(Figura 22A)

Filamentos emaranhados, verde-escuro, bainha hialina contendo apenas um tricoma; tricomas 3-3,5 µm de diâm., não constritos, levemente atenuados, retos a flexíveis, sem motilidade; células isodiamétricas a mais curtas que largas, 1-2,5 µm de compr., conteúdo celular granuloso, verde escuro, célula apical cônico-acuminada.

Amostra: MAP3

Oscillatoriaceae sp.2

(Figura 22B)

Filamentos emaranhados, bainha fina e transparente contendo apenas um tricoma; tricomas 2,5-3,5 μm de diâm., levemente constritos, atenuados e curvos em direção ao ápice, movimento de rotação; células mais curtas que largas, 1-1,5 μm de compr., conteúdo celular granuloso, verde escuro, célula apical cônico arredondada.

Amostra: CAT5

Oscillatoriaceae sp.3

(Figura 22C)

Talo verde mucilaginoso, tricomas verde azulados, flexíveis, 6-7,5 μm de diâm., levemente constritos atenuados e curvos em direção ao ápice, células 2-4 μm de compr., isodiamétricas a mais curtas que largas, conteúdo celular finamente granuloso, célula apical arredondada.

Amostra: ZAC1

Oscillatoriaceae sp.4

(Figura 22D)

Talo verde escuro, bainha fina transparente, filamentos dispostos em feixes; tricomas verde-escuro, retos, flexíveis, 4-5 μm de diâm., levemente constritos, não atenuados, células 2-2,5 μm de compr., isodiamétricas a mais curtas que largas, conteúdo celular finamente granuloso, célula apical arredondada.

Amostra: OLI7

4.4.4. Família Gomontiellaceae

Encontramos uma população de Gomontiellaceae (ICE2), sendo identificada como *Komvophoron constrictum* (Szafer) Anagnostidis & Komárek (Fig. 25).

Esta espécie possui hábito bentônico e é encontrada em riachos e lagos no hemisfério norte além de haver registros na Argentina, África, Coreia e Japão, sendo possivelmente uma espécie de distribuição cosmopolita (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005).

A linhagem ICE2 ficou agrupada num clado com duas linhagens de *Komvophoron hindakii* registradas na República Checa. O clado apresentou alto suporte (ML-100%) indicando que as linhagens pertencem ao mesmo gênero (Fig. 13).

A linhagem ICE2 apresentou uma sequência de ITS 16S-23S de 407 pares de bases e a presença dos dois RNAs transportadores. Entretanto, as regiões D1-D1', Box-B e V3 não puderam ser construídas, pois os trechos iniciais conservados que definem essas regiões nas cianobactérias não foi encontrado e aparentemente sofreu alteração neste grupo. Além disso, não há sequências do ITS de outras linhagens do gênero no *GenBank* para alinhamento e comparação.

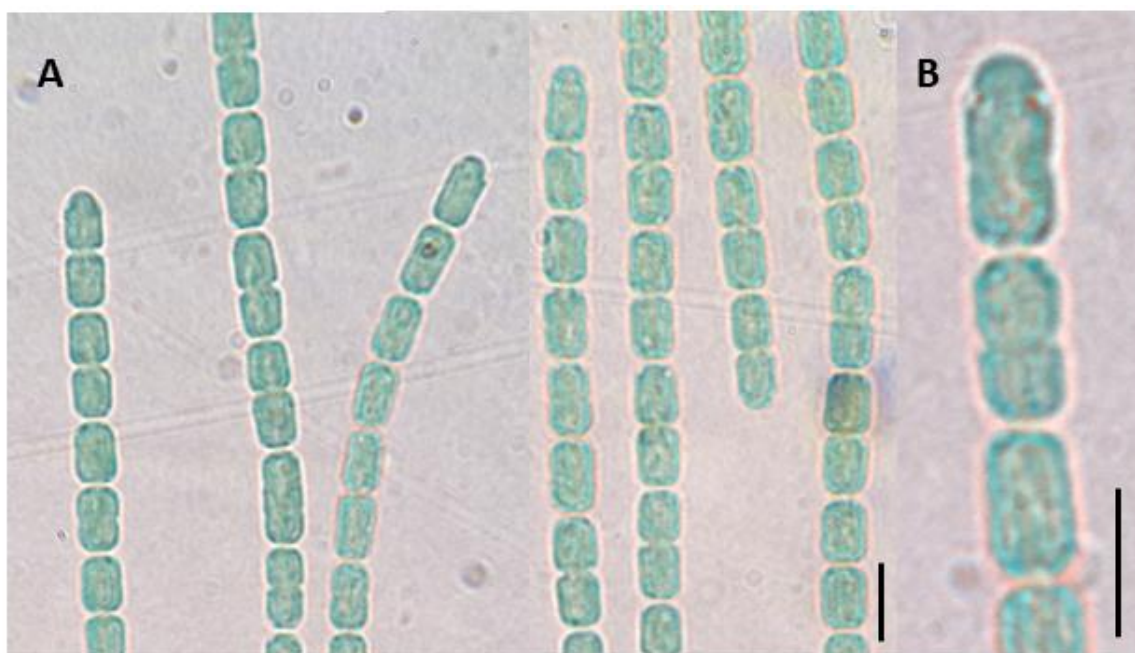


Fig. 25. Fotomicrografias de *Komvophoron constrictum*. Barra: 5 μm.

Komvophoron constrictum (Szafer) Anagnostidis & Komárek, *Archiv für Hydrobiologie, Supplementband* 80: 327-472. 1988.

(Figura 25)

Tricomas dispostos em feixes, retos, móveis, profundamente constrictos, 3-3,5 µm de diâm., sem bainha; células em forma de barril com ápice arredondado, 3-6 µm de compr., conteúdo homogêneo verde-azulado, grânulos situados em ambos os lados da célula apical, célula apical constricta na porção mediana com porção terminal cônica arredondada.

Amostra: ICE2

4.5. Ordem Nostocales

A ordem Nostocales representa um grupo monofilético com talo diversificado (não ramificado, com ramificações falsas ou verdadeiras) e presença de células diferenciadas (heterócitos e acinetos). É composta por 12 famílias representadas por mais de 100 gêneros (KOMÁREK et al. 2014).

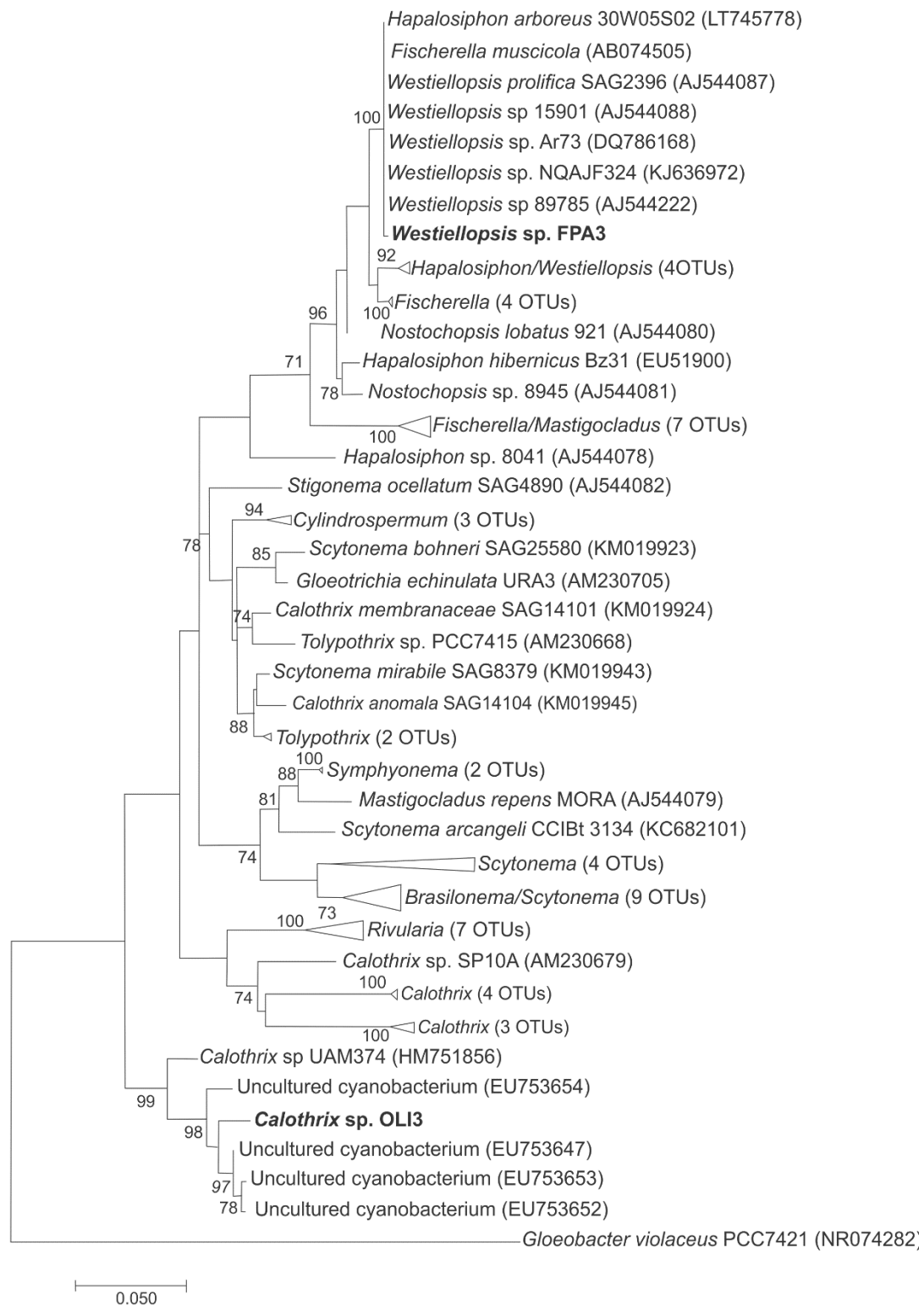


Fig. 26. Árvore consenso das Nostocales com base em sequências do gene RNAr 16S de duas linhagens pertencentes sequenciadas neste estudo (em negrito) e 75 linhagens disponíveis no *GenBank* e construída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Os valores de *bootstrap* acima de 70% para a ML estão representados junto aos ramos. Barra = 0,05 número de substituições de nucleotídeos por site.

4.5.1. Família Rivulariaceae

Neste estudo encontramos uma população de Rivulariaceae (ICE3), sendo identificada como pertencente ao gênero *Calothrix*, mas não identificada em nível específico. (Fig. 27).

O gênero *Calothrix* é composto por espécies perifíticas aderidas ao substrato ou sobre outras algas. Segundo Komárek et al. (2014), a família Rivulariaceae, à qual pertence este gênero, é bem caracterizada e forma um grupo monofilético. No entanto, não há informações moleculares para os espécimes tipo.

A linhagem OLI3 ficou agrupada, num clado com alto suporte (ML-99%), com a linhagem *Calothrix* sp. UAM374, proveniente da Espanha (Fig.25) e com outras linhagens de cianobactérias não cultivadas. Segundo Berrendero et al. (2011), a linhagem *Calothrix* sp. UAM374 ficou separada de outras linhagens de *Calothrix*, a partir da análise do RNAr 16S, e apresentou valores de similaridade abaixo de 94% indicando que pode pertencer a um novo gênero.

A análise do ITS 16S-23S apresentou uma sequência de 377 pares de bases e nenhum dos dois RNAs transportadores foi observado. As únicas linhagens com sequências do ITS disponíveis no *GenBank* para comparação foram *Calothrix* sp. UAM374 (incompleta) e *Calothrix* sp. PCC6303. A estrutura secundária das regiões D1-D1' foi igual entre as linhagens OLI3 e UAM374 e diferente da PCC6303, enquanto as das regiões Box-B e V3 foram diferentes entre OLI3 e PCC6303 (Fig. 28), confirmando os resultados encontrados para o RNAr 16S de que as linhagens OLI3 e UAM374 pertencem a um táxon separado das demais linhagens de *Calothrix*.

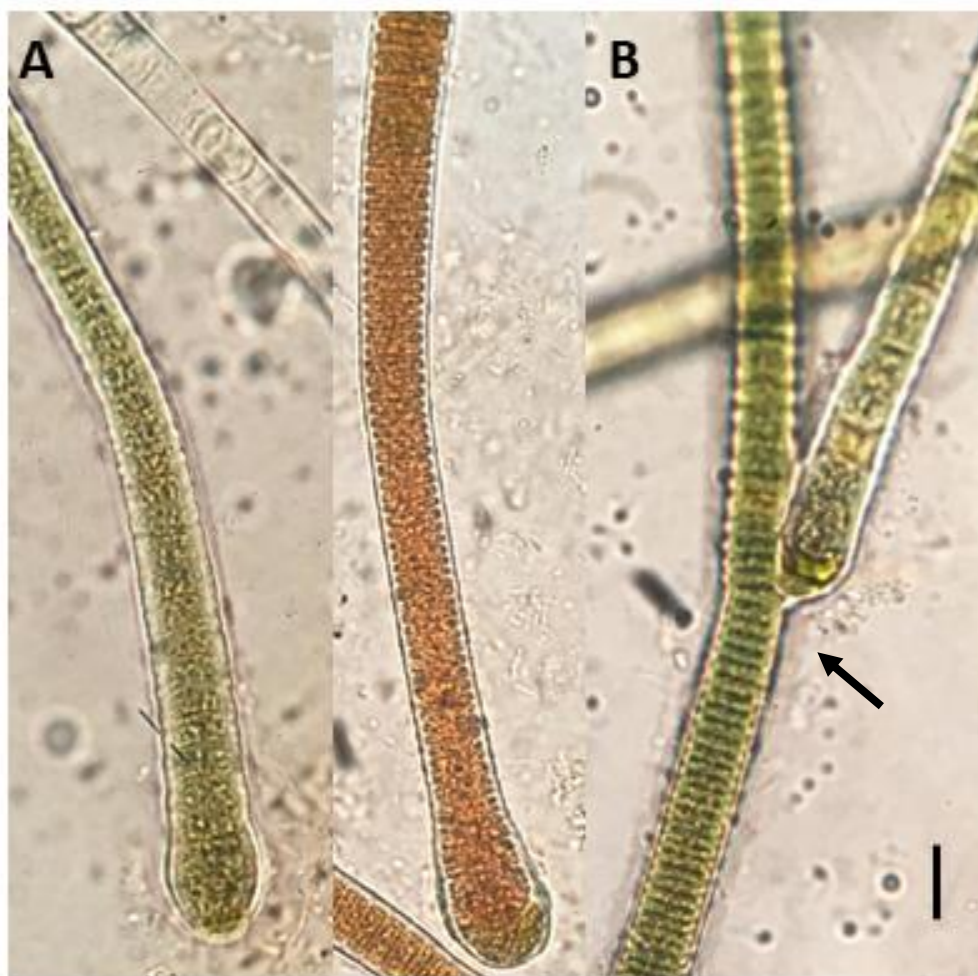


Fig. 27. Fotomicrografias de *Calothrix* sp. com ramificação falsa (seta).

Calothrix sp.

(Figura 27)

Filamentos heteropolares, divididos em uma porção basal e uma porção terminal, dispostos em grupos aderidos ao substrato, bainha hialina, presença de ramificações falsas; tricomas com heterócitos basais, tricomas constritos com a base larga atenuado em direção ao ápice composto por células longas e hialinas, 16-24 μm de diâm. na base e 11-15 μm de diâm. no meio do tricoma; células discoides. 2-4 μm de compr.

Amostra: OLI3

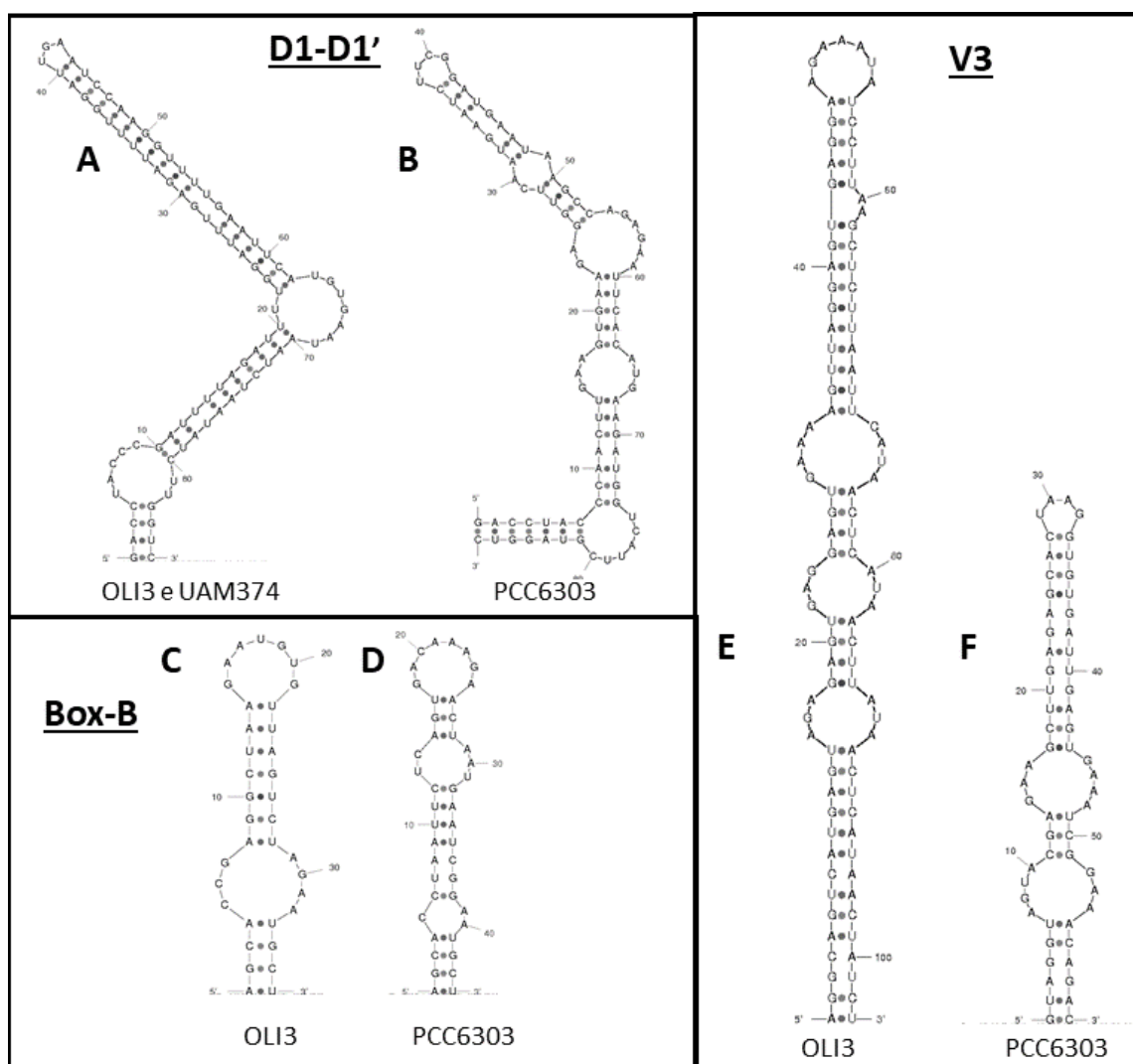


Fig. 28. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S para as regiões D1-D1', Box-B e V3 das linhagens de *Calothrix* sp. (A,C,E), *Calothrix* sp. UAM374 (A) e *Calothrix* sp. PCC6306 (B,D,F).

4.5.2. Família Hapalosiphonaceae

Neste estudo encontramos uma população de Hapalosiphonaceae (FPA3), sendo identificada como pertencente ao gênero *Westiellopsis*, mas cuja identificação específica não foi possível (Fig. 29).

Segundo Komárek et al. (2014), os gêneros *Fischerella*, *Nostochopsis*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Mastigocoleus* e *Westiellopsis* são confusos morfológicamente e muito

próximos geneticamente, tornando a taxonomia do grupo incerta e para a qual uma revisão é necessária.

A linhagem FPA3 ficou agrupada em um clado com alto suporte (ML-100%) com linhagens dos gêneros *Hapalosiphon*, *Nostochopsis*, *Fischerella* e *Westiellopsis* indicando que pertençam a um mesmo gênero (Figura 26).

A sequência do ITS 16S-23S apresentou 713 pares de bases e a presença de ambos os RNAs transportadores. As linhagens analisadas não possuem sequências do ITS disponíveis no *GenBank* para comparação. As estruturas secundárias das regiões D1-D1', Box-B e V3 encontram-se na Figura 30.



Fig. 29. Fotomicrografias de *Westiellopsis* sp. apresentando ramos mais grossos e mais finos (seta) e presença de heterócito (seta). Barra: 10 μ m.

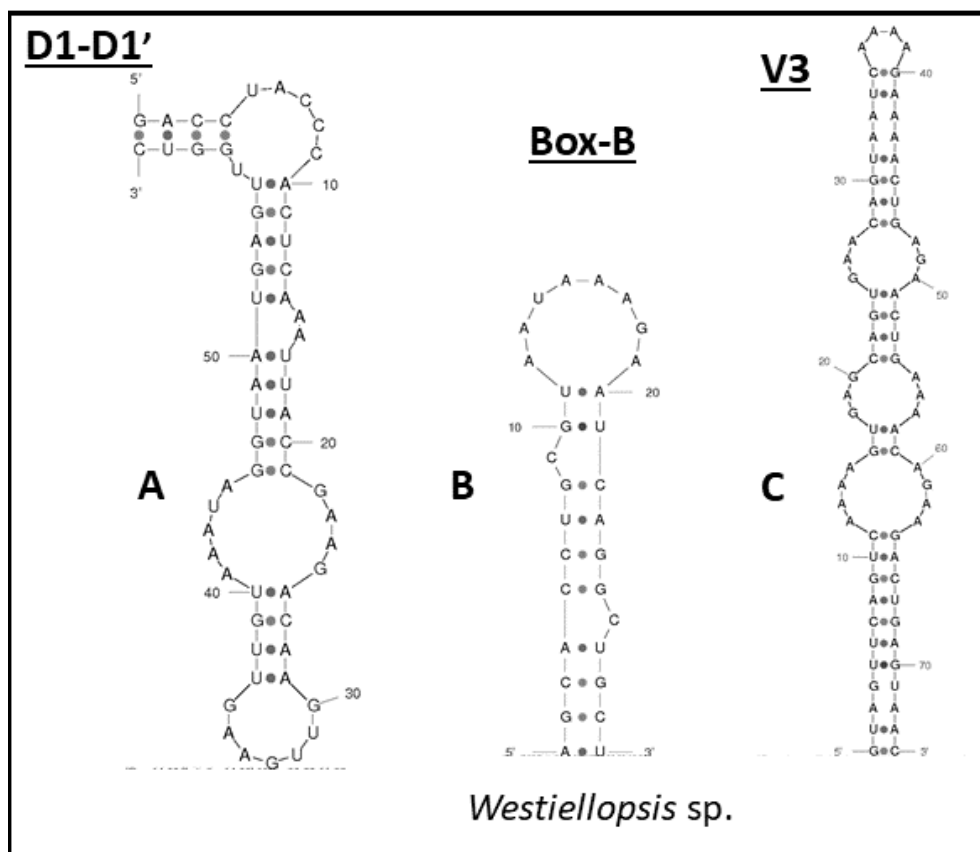


Fig. 30. Estruturas secundárias do ITS 16S-23S de *Westiellopsis* sp. Região D1-D1' (A) Box-B (B) e V3 (C).

Westiellopsis sp.

(Figura 29)

Filamentos com ramificações verdadeiras do tipo T, compostos por tricomas primários multisseriados mais grossos (4-7 μm de diâm.) e secundários mais finos (2,5-4 μm de diâm.), sem bainha, constritos, segmentos mais novos do tricoma apresentam-se não constritos e com células cilíndricas mais longas (4-8 μm de compr.) e células em forma de barril, isodiamétricas (4-10 μm de compr.), nos tricomas mais velhos, heterócitos intercalares cilíndricos, 6-9 μm de diâmetro x 6-13 μm de comprimento.

Amostra: FPA3

CAPÍTULO III – A widespread
cyanobacterium supported by polyphasic
approach: proposition of *Koinonema
pervagatum* gen. & sp. nov.
(Oscillatoriales)*

*Artigo publicado:

Buch, B.; Martins, M.D.; Branco, L.H.Z. 2017. A widespread cyanobacterium supported by polyphasic approach: proposition of *Koinonema pervagatum* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales). *Journal of Phycology*, 53(5): 1097-1105. doi: 10.1111/jpy.12568

ABSTRACT

Several new genera originally classified at the genus *Phormidium*, one of the taxonomically most complex and a polyphyletic genus of Oscillatoriales, were recently described as new taxa. The simple morphology of *Phormidium* does not reflect its genetic diversity and the delimitation of a natural group is not possible with traditional classification systems based on morphology alone. Therefore, this study used morphological, ecological and molecular approaches to evaluate four populations morphologically similar to *Ammassolinea*, *Kamptonema* and *Ancylothrix* (simple, curved and gradually attenuated at the ends trichome), found in subtropical and tropical Brazilian regions. The use of 16S rRNA gene sequences to infer the phylogenetic relationships grouped all the strains in a highly supported clade with other two European strains isolated from areas with thermal springs. The 16S-23S ITS secondary structure corroborated the phylogenetic analysis, since all the strains had similar structures. Consequently, a genetically well-defined and cryptic new genus, *Koinonema* gen. nov., is being proposed containing the aquatic, mesophilic and morphologically homogeneous new species, *K. pervagatum* sp. nov.

Key index words: 16S rRNA; 16S-23S ITS; Brazil; cryptic taxa; morphological evaluation; phylogenetic analysis; taxonomy.

INTRODUCTION

The first proposed classifications for Cyanobacteria were based mainly on morphological characters (Geitler 1932, Bourrelly 1970, Komárek & Anagnostidis 2005). However, many studies have shown that these classifications do not reflect the evolutionary history of the group (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005; KOMÁREK et al., 2014) revealing a great genetic diversity which implies in cryptic genera/species (STRUENECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2011; OSORIO-SANTOS et al., 2014; MARTINS et al., 2016). Therefore, the current cyanobacterial classification considers the polyphasic approach a more suitable methodology, since is based on a genetic evaluation from which other diagnostic criteria are combined, (Komárek, 2016).

Phormidium Kützing ex Gomont is characterized by forming cylindrical, uniseriated, isopolar, homocyted and unbranched trichomes and, due to its morphological simplicity and polyphyletic nature, it is one of the taxonomically most complex genus of Cyanobacteria (STRUENECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2010, 2011; CHATCHAWAN et al., 2012; HAŠLER et al., 2012; SCIUTO et al., 2012). From a practical perspective, Komárek and Anagnostidis (2005) divided the *Phormidium* species in eight groups, according to apical cell morphology, where species with trichomes attenuated and curved toward ends belong to groups II and III. Based on polyphasic studies of *Phormidium* populations pertaining to such groups, three new cryptic genera were described: *Ammassolinea* Hašler et al., *Kamptonema* Strunecký et al. and *Ancylothrix* Martins et Branco. Regarding this background, some new genera were recently described based on species originally classified in this genus, such as *Phormidesmis* (KOMÁREK et al., 2009), *Wilmottia* (STRUENECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2011), *Roseophilum* (CASAMATTA et al., 2012), *Ammassolinea* (HAŠLER et al., 2014), *Kamptonema* (STRUENECKÝ; KOMÁREK; ŠMARDÁ, 2014), *Cephalothrix* (MALONE et al., 2015), *Ancylothrix* (MARTINS et al., 2016) and *Potamolinea* (MARTINS; BRANCO, 2016).

According to Komárek et al.(2014), the evaluation of phylogenetic relationships based on gene sequencing is indispensable for the revision of the modern cyanobacterial taxonomic system. The 16S rRNA gene has been the primary phylogenetic marker used for defining genera (KOMÁREK, 2016), but its applicability to distinguish species is debatable (BRAVAKOS et al., 2016). To differentiate species, the Internal Transcribed Spacer (16S-23S ITS) marker is commonly used (Boyer et al. 2001, Johansen et al. 2011, Martins et al. 2016). However, some studies have shown that the 16S-23S ITS is not always conclusive for specific level identification (Sciuto et al. 2012, Bravakos et al. 2016, Machado-de-Lima et al. 2017). In addition to these molecular data, other taxonomic information sources (morphology, cytology and ecology) must be considered when proposing a new taxa (Komárek 2016). Therefore, from the taxonomic study of four populations with curved and gradually attenuated trichomes found in subtropical and tropical Brazilian regions, a genetically well-defined new genus is being proposed, *Koinonema* gen. nov., composed by one morphologically homogeneous species, *K. pervagatum* sp. nov., which can be found in aquatic ecosystems as a mesophilic organism.

MATERIAL AND METHODS

Origin of the strains and cultivation

Among the samples collected to study the benthic cyanobacteria from freshwater lentic environments of southeastern and southern Brazil (Table S1), four contained a special cyanobacterial type. Trichomes of each sample were repeatedly separated from others and successively transferred to clean drops of deionized water using a Pasteur pipette under an inverted light microscope (Leica DMIL LED). The sole trichomes were then inoculated in tubes with BG11 growth medium (Rippka et al. 1979) to establish unicyanobacterial cultures. Strains were cultured and maintained under $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of irradiance and a 14:10 hours light:dark cycle in the Culture Collection of IBILCE/UNESP (THIERS, 2018).

Morphological characterization

Morphological variability of populations was evaluated with both fresh field material and cultured samples using an Olympus BH2 microscope. Taxonomic features, such as cell width, cell length, attenuation of trichomes and apical cell shape and dimensions, were analyzed from a minimum of 30 trichomes for each sample. Representatives of each sample studied were deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil (Thiers 2017).

Molecular and phylogenetic analyses

The biomass for DNA extraction was obtained from non-axenic unicyanobacterial clonal cultures by repeated centrifugations. During the centrifugation process, the filaments were washed several times with sterile deionized water to remove or reduce mucilage and growth medium substances. DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol.

The 16S rRNA gene and 16S-23S ITS markers were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 16S27F and 23S30R (TATON et al., 2003) and performed in a Techgene TC-512 thermal cycler (Techne, Staffordshire, UK) using 25 µL reaction volumes containing 5 µL of 10X PCR buffer, 2 µL of 50 mM MgCl₂, 1 µL of 10 mM dNTP mix, 1.25 µL of each primer (5 pmol), 14.2 µL of Milli-Q water, 1.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Carlsbad, USA) and 10 ng of genomic DNA. Thermal cycling was 94°C for 5 min, followed by 10 cycles of 94°C, 45 s; 57°C, 45 s; 72°C, 2 min; 25 cycles of 92°C, 45 s; 54°C, 45 s; and one final step of 72°C, 7 min. The PCR products were analyzed on 1% agarose gels stained with GelRed 0.6X (Biotium, Fremont, USA) and viewed on a "Mini Bis Pro" transilluminator (Micro Photonics, Allentown, USA). The positive products were cloned using pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) according to the supplier's manual.

Competent *Escherichia coli* DH5- α cells were transformed by heat shock and recombinant plasmids were isolated using the “GeneJET™ Plasmid Miniprep” kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Sequencing was performed on an ABI 3130 sequencer, using “BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction” kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) as the manufacturer’s protocol. M13F and Sp6R primers correspond to the vector sites and the internal primers 357F, 704R, 1114F and 1494R (NEILAN et al., 1997) were used for sequencing. The DNA fragments were assembled into contigs using the Phred/Phrap/Consed software (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998), and only bases with quality higher than 20 were considered.

The sequences obtained were compared to sequences previously published in NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the closest related were selected to compose the database. The alignment was conducted using the software ClustalW v1.8 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) in MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013) and inspected and refined manually. The unicellular cyanobacteria *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (GenBank access number NC005125) was designed as evolutionary outgroup. The nucleotide sequences obtained in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers: MF362670, MF362671, MF362672, MF362673.

Phylogenetic analyses were performed based on partial 16S rRNA gene sequences. The appropriate nucleotide substitution models were selected in jModelTest 2.1.1 (DARRIBA et al., 2012). The Bayesian (BI) analysis was performed in MrBayes 3.1.2 software (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), run with GTR+G+I model (rate matrix with six different substitution types, number of rate categories = 4, and with the nucleotide frequencies, shape parameter and pINVAR estimated from the data). BI analysis comprised two runs of four Markov Chain Monte Carlo (MCMC), each with 12,000,000 generations and sampling every

100 generations. The initial 12,000 generations were discarded as burn-in. Maximum Likelihood (ML) inference was performed using Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013) and the GTR model was applied in the last method assuming heterogeneous substitution rate and gamma substitution of variable sites. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. Sequence identity matrix/nucleotide divergence was calculated from the alignment in BioEdit (HALL, 1999) from all positions including gaps.

The alignment of 16S-23S ITS region was made using a combination of ClustalW v1.8 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) in MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013) and manual alignment utilizing secondary structure of conserved domains (ITEMAN et al., 2000). The tRNA sequences were identified with tRNAscan-SE 1.21 (LOWE; EDDY, 1996). D1-D1', box-B and V3 16S-23S ITS regions were identified and their secondary structures were determined using Mfold 3.2 (ZUKER, 2003) and re-drawn in Fireworks 8.0 software (Macromedia, San Francisco, USA).

RESULTS

Morphological evaluation

The four populations studied showed a uniform morphology, having features corresponding to species included in *Phormidium*-group II, according to Komárek and Anagnostidis (2005), and differing from *Phormidium* type species (*P. lucidum* Agardh ex Gomont). They presented trichomes cylindrical, bent and gradually narrowed towards the ends, not constricted or slightly constricted at the ungranulated or slightly granulated cross-walls, 3.0-6.4 µm wide. Sheaths absent. Cells isodiametric or shorter or longer than wide, 3.0-9.0 µm long. Cell content blue-green, homogeneous to finely granulated. Apical cells rounded-conical, without calyptra, 2.5-4.4 µm wide, 3-8.5 µm long (Fig. 1, Table 1). Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia, with necridic cells.

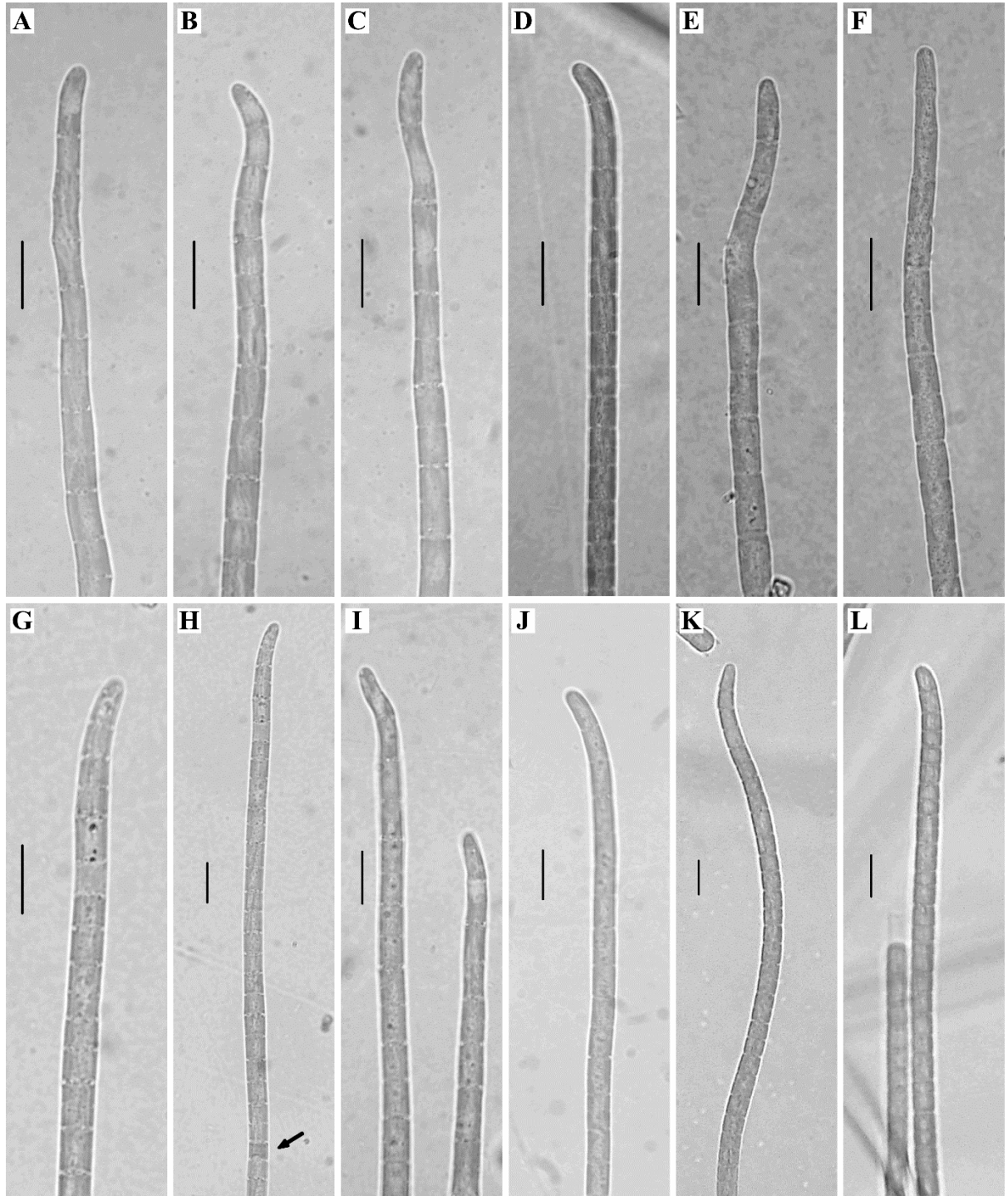


FIG. 1. Photomicrographs of Brazilian strains of *Koinonema pervagatum* gen. et sp. nov. (a-c) 37PC. (d-f) 61PC. (g-i) 62PC, the arrow indicates a necridic cell. (j-l) 63PC (Holotype). (scale bars = 10 μ m).

TABLE 1. Morphological comparison among *Koinonema pervagatum* gen. et sp. nov.

Dimensions representing full ranges observed. Mean and standard deviation in parentheses.

Strain	Granuled cross-walls	Trichome width ^a	Cell length ^b	Apical cell width ^a	Apical cell length ^a	L/W ^c
37PC	+/-	4-6.4 (4.9±0.8)	3.2-8 (4.6±0.9)	3.2-4.4 (3.5±0.7)	4.8-6.4 (5.2±0.8)	0.7-1.8
61PC	+/-	3-6 (4.8±0.6)	5-9 (5.8±1)	3-4 (3.3±0.5)	3-8.5 (6.3±1.5)	0.9-1.7
62PC	+/-	4-5 (4.8±0.4)	3-5 (4±0.7)	3-4 (3.3±0.5)	4-7 (5.6±0.9)	0.6-1.3
63PC	+/-	4-4.5 (4.1±0.2)	3-6 (4.3±0.9)	2-3 (2.3±0.4)	3-7 (4.6±1.1)	0.7-1.5

^a n=30; ^b n=150; ^c L/W = cell length/width ratio; - = absence; + = presence. All measurements in μm .

Ecology and distribution

In nature, the studied strains were growing forming masses on the bottom (37PC, 61PC and 63PC) or attached to artificial substrate (62PC) of four ponds from different localities of southeastern and southern Brazil. The 37PC was isolated from clay in an ornamental eutrophic lake in a Botanical Garden, in the subtropical region, where the temperature was 15.7°C. The strains 61PC, 62PC and 63PC were isolated from artificial water reservoirs, in the tropical region, where the temperatures were 24.5, 27.6 and 22°C, respectively, among which the 61PC and 63PC were growing on sandy clay while 62PC on a small concrete spillway.

The cultivation temperature typically ranged from 19 to 21°C for these strains, but the growth of the strains 61PC, 62PC and 63PC was tested in temperatures ranging from 39 to 41°C for a 15-days period. Although no growth, developmental or physiological parameter had been used to quantitatively access the responses of the strains, morphological evaluations showed no alterations in arrangement, shape or color of the cells and indicated normal development of individuals.

Molecular analyses and phylogeny

The comparison of 16S rRNA gene partial sequences of the four studied strains and sequences of GenBank showed similarities above 98.2% with two European strains: *Phormidium* sp. ETS-05 (BERRINI et al., 2004) and *Phormidium* sp. ElfPHct20 (BRAVAKOS et al., 2016) and below 93% to other strains.

Analyses of the 16S rRNA gene sequences showed a clear separation of the group composed by the studied populations and European *Phormidium* sp. strains (afterwards labelled *Koinonema* gen. nov. clade) from the remaining strains. It is especially separate from the true *Phormidium* clade that is, according to the proposition of Sciuto et al. (2012), represented by *Phormidium* cf. *irriguum* CICALA 759 and *P. irriguum* f. *minor* ETS-02 strains (Fig. 2).

Similarity scores based on the comparison of 16S rRNA gene sequences of the *Koinonema* gen. nov. clade strains with sequences of other genera, such as *Ammassolinea*, *Ancylothrix*, *Phormidium*, *Potamolinea*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Kamptonema*, *Microcoleus* and *Coleofasciculus*, were lower than 91.9%. The tree topology showed a close phylogenetic relationship among members of *Koinonema* gen. nov. clade with *Planktothricoides* strains, highly supported by bootstrap and posterior probabilities (84%-ML and 0.99-BI, respectively; Fig. 2), and the divergence of these two groups was greater than 7.5%.

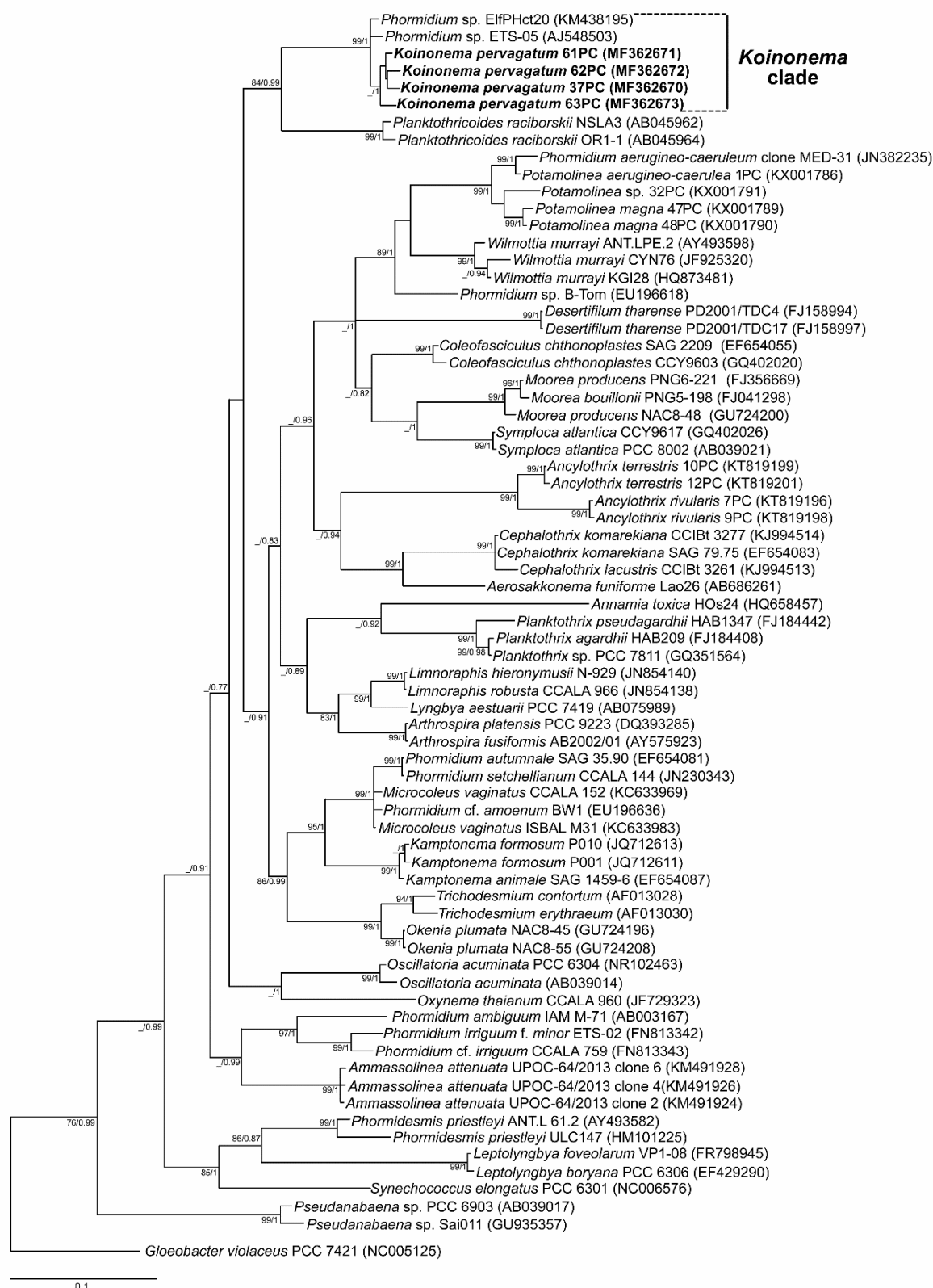


FIG. 2. Bayesian Inference tree based on the 16S rRNA gene sequences of oscillatoriallean taxa. The clade comprising *Koinonema* gen. nov., consisting of Brazilian (in bold) and European strains, is highlighted. Bootstrap values (>75%) and probabilities (>0.75) obtained from ML

/BI methods, respectively, are displayed at the relevant nodes. GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar = 0.1 substitutions per nucleotide position.

The *Koinonema* gen. nov. clade was highly supported in ML and BI analyses (99% and 1, respectively; Fig. 2) and the similarity scores based on 16S rRNA gene sequences within this group were from 98.2% to 99.1% (Table 2). The clade was formed by three internal branches, with unclear relationships among them. The subgroup composed of the four Brazilian strains was well supported only by posterior probabilities (1, Fig. 2), with similarity from 98.4 to 98.9% among the strains. The similarity score for 16S rRNA gene sequences between the two European strains was 99.1%. When compared to Brazilian strains, the similarity varied from 98.2 to 98.8%.

TABLE 2. The partial 16S rRNA gene percent sequence similarity of *Koinonema pervagatum* gen. et sp. nov. strains.

Strain	1	2	3	4	5	6
1- 61PC	-					
2- 62PC	98.9	-				
3- 63PC	98.7	98.5	-			
4- 37PC	98.9	98.8	98.4	-		
5- ElfPHct20	98.6	98.3	98.3	98.2	-	
6- ETS-05	98.6	98.4	98.8	98.3	99.1	-

The 16S-23S ITS regions of all four Brazilian strains studied and the *Phormidium* sp. ElfPHct20 showed small variation in number and similarity of nucleotide sequences (from 403 to 404 and from 93.3 and 98%, respectively). There are no data on sequence or secondary

FIG. 3. Secondary structure of conserved regions of 16S-23S ITS of *Koinonema* strains. (a-e) D1-D1' helices. (f-i) Box-B helices. (j-l) V3 helices.

TABLE 3. Lengths of 16S-23S ITS regions (number of nucleotides) in the analyzed strains of *Koinonema pervagatum* gen. et sp. nov..

Strain	Complete ITS	Leader	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	V2	RNA ^{Ala} gene	Pre-Box-B spacer	Box-B helix	Post-Box-B spacer	Box-A	D4	V3 with spacer	D5
37PC	404	6	60	30	19	74	13	73	12	25	17	12	7	53	3
61PC	403	6	60	30	19	74	13	73	12	24	17	12	7	53	3
62PC	403	6	60	30	19	74	13	73	12	24	17	12	7	53	3
63PC	404	6	60	30	19	74	14	73	12	24	17	12	7	53	3
ElfPHct20	404	6	60	30	19	74	14	73	12	24	17	12	7	53	3

DISCUSSION

The phylogenetic analyses have indicated that the group composed of Brazilian and European (*Phormidium* sp. ETS-05 and *Phormidium* sp. ElfPHCT20) strains corresponds to a genetically well-defined new genus, hereafter named *Koinonema* gen. nov., which had strong support and high similarity scores of 16S rRNA gene sequences among its strains. In addition, the low similarity of 16S rRNA gene sequences between *Koinonema* gen. nov. and GenBank strains (<93%) also confirm the genus as a distinct group.

The 16S-23S ITS marker has provided different interpretations in cyanobacterial taxonomy. While some studies have found that 16S-23S ITS is a low phylogenetic signal marker (Sciuto et al. 2012; Machado-de-Lima et al. 2017), which could not be appropriate for phylogenetic reconstruction, others propose ITS as a good marker for species identification (JOHANSEN et al., 2011; MARTINS; BRANCO, 2016; SCIUTO; MORO, 2016). In this study, the low variation of primary and secondary structures of 16S-23S ITS of *Koinonema* strains corroborated the 16S rRNA analysis, indicating that the Brazilian strains and the European *Phormidium* sp. ElfPHCT20 belong to the same species.

Considering that the strains of the *Koinonema* group were isolated from different geographic and climatic regions, it would be probable that Brazilian and European strains would be genetically divergent at some extent, mainly reflected in the 16S-23S ITS sequences, since it is a more variable genetic region. Komárek (2014) states that “similar morphotypes occurring in similar, but geographic distant ecosystems rarely belong to the same genotype”. However, no significant genetic divergences were observed in the molecular markers used among the strains studied, confirming that all of them belong to the same species, despite the geographic distance.

The introduction of other types of data to the taxonomic classification systems, firstly ecological, then cytological and, recently, molecular data (16S rRNA gene and 16S-23S ITS),

has evidenced that morphological traits alone did not reflect the evolutionary history of Cyanobacteria (KOMÁREK et al., 2014). Even so, according to Komárek (2016), morphology, as well as, ecology and cytology, are still very important.

Koinonema is morphologically indistinguishable from *Ammassolinea*, *Kamptonema* and *Ancylothrix*, therefore characterizing them as cryptic genera. This has been indicated in several taxonomic studies with Oscillatoriales in which the observed genetic diversity of these organisms is greater than their phenotypic diversity (Komárek et al. 2013, Hašler et al. 2014, Strunecký et al. 2014, Martins et al. 2016), reinforcing the fragility of morphological data as a phylogenetic criterion. The *Koinonema* group is considered to harbor just one species and, as expected, all strains studied are uniform in relation to trichomes apex and cell measurements (5-6 µm wide and 3-6 µm long, in Bravakos et al. 2016) and distinguishing between Brazilian and European strains is not possible with morphological traits.

Temperature is a crucial environmental factor affecting the growth and survival of microorganisms and the typical temperature range for an organism is 25-40°C (Madigan et al. 2012). Castenholz (1969) stated the concept of thermophilic cyanobacteria applies to organisms with optimal growth temperature range above 45°C. According to Bravakos et al. (2016), the *Phormidium* sp. ElfPHCT20 was collected in the thermal spring at Eleftheres (Greece), in 2011, where temperature was 41°C. However, it was maintained in laboratory conditions at 26°C. The *Phormidium* sp. ETS-05 (Berrini et al. 2004) was isolated from a thermal mud in the Abano Terme at Padua (Italy), which receives mud and water in a continuous flow from a nearby thermal spring. Although the temperature at the collection site was not specified by the authors, the strain was maintained at 31-33°C in laboratory conditions. According to Moro et al. (2010), cyanobacterial mats of Abano Terme are exposed to temperatures ranging from 30 to 50°C.

Considering that ElfPHCT20 and ETS-05 were cultivated at 26°C and 31-33°C, respectively, and that the Brazilian strains were experimentally maintained at about 40°C with

no qualitative and significant changes in development, probably all strains of *Koinonema* can be considered tolerant to a wider range of environmental temperature. However, it seems that they cannot be considered thermophilic based on the available data. It is more likely the species consists of several strains that can be characterized as mesophilic, even though the European strains were collected in thermal springs or surroundings.

In conclusion, *Koinonema* gen. nov. is a well-defined genus with the typical morphology of *Phormidium* group II (Komárek and Anagnostidis 2005), with a homogeneous morphology (attenuated towards the ends and bent trichomes) undistinguishable from the recently described genera *Ammassolinea*, *Kamptonema* and *Ancylothrix*. It demonstrates that these morphological features correspond to an adaptive convergence which appeared several times in phylogenetic distant lineages in Cyanobacteria. Moreover, the occurrence of *Koinonema pervagatum* sp. nov. suggests it is a mesophilic species, which can be found in aquatic ecosystems within a wide temperature range and along an extensive geographic range.

Description of the new genus and the new species

Koinonema B. Buch, M.D. Martins et L.H.Z. Branco **gen. nov.**

Thallus gelatinous, mucilaginous, microscopic, attached to the substrate. Trichomes loosely entangled, motility present: oscillation and rotation, isopolar, cylindrical, not constricted or slightly constricted at the cross walls, bent at the tip, gradually attenuated towards the apex. Cells isodiametric or shorter or longer than wide. Cell content homogeneous or finely granular. Apical cell conical rounded and narrowed calyptra absent. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: *koinós* (Gr. adj.) = common, ordinary (referring to the morphology of trichome); *nema* (Gr. n.) = thread; *Koinonema* = ordinary filament.

Type species: *Koinonema pervagatum* B. Buch, M.D. Martins et L.H.Z. Branco sp. nov.

Koinonema pervagatum B. Buch, M.D. Martins et L.H.Z. Branco **sp. nov.**

Thallus gelatinous, mucilaginous, microscopic, attached to the substrate. Trichomes loosely entangled, motility present: oscillation and rotation, isopolar, cylindrical, not constricted or slightly constricted at the cross walls, gradually attenuated and bent towards the apex, 3-6.4 μm wide. Cells 0.6-1.8 time longer than wide, 3-9 μm long. Cell content blue-green, homogeneous or finely granular. Apical cell conical rounded and narrowed, calyptra absent, 2-4.4 μm wide, 3-8.5 μm long.

Etymology: *pervagatum* (L. p. n.) = spread, referring to its wide geographical distribution.

Habitat: pond bottoms.

Type locality: São José do Rio Preto Municipal Reservoir Park, municipality of São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil, 20° 49' 36" S 49° 20' 42" W.

Holotype: formaldehyde-fixed sample of strain 63PC deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil, voucher number SJRP 32540.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2010/09686-4; 2012/19468-0; 2013/08207-3; 2014/08200-1) for the financial support to this study and CAPES - Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil for a granted scholarship to Bruna Buch.

REFERENCES

Berrini, C.C., De Appolonia, F., Valle, L.D., Komárek, J. & Andreoli, C. 2004. Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from the Euganean Thermal Springs (Padua, Italy). *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.*

113:73–85.

Bourrelly, P. 1970. Les algues d'eau douce III. Boubée & Cie, Paris.

Boyer, S.L., Flechtner, V.R. & Johansen, J.R. 2001. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 18:1057–69.

Boyer, S.L., Johansen, J.R., Flechtner, V.R. & Howard, G.L. 2002. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *J. Phycol.* 38:1222–35.

Bravakos, P., Kotoulas, G., Skaraki, K., Pantazidou, A. & Economou-Amilli, A. 2016. A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of Cyanobacteria from thermal springs of Greece. *Mol. Phylogenet. Evol.* 98:147–60.

Casamatta, D., Stanić, D., Gantar, M. & Richardson, L.L. 2012. Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease. *Phycologia*. 51:489–99.

Castenholz, R.W. 1969. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriol. Rev.* 33:476–504.

Chatchawan, T., Komárek, J., Strunecký, O., Šmarda, J. & Peerapornpisal, Y. 2012. *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). *Cryptogam. Algal.* 33:41–59.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 9:772–772.

Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 8:186–94.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res.* 8:175–85.

- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. In Rabenhorst, L. [Ed.] *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich Und Der Schweiz*. Vol. 14. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, p. 1196.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. & Al, G.E.T. 1998. Consed : A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res.* 8:195–202.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Hašler, P., Dvořák, P., Johansen, J.R., Kitner, M., Ondřej, V. & Pouličková, A. 2012. Morphological and molecular study of epipelagic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/ cyanobacteria). *Fottea*. 12:341–56.
- Hašler, P., Dvořák, P., Pouličková, A. & Casamatta, D.A. 2014. A novel genus *Ammassolinea* gen. nov. (Cyanobacteria) isolated from sub-tropical epipelagic habitats. *Fottea*. 14:241–8.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kaštovský, J. 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 117:95–115.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17:754–5.
- Iteman, I., Rippka, R., De Marsac, N.T. & Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*. 146:1275–86.
- Johansen, J.R., Kovacik, L., Casamatta, D.A., Fučíková, K. & Kaštovský, J. 2011. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (pseudanabaenaceae, cyanobacteria). *Nov. Hedwigia*. 92:283–302.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota -2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 759 pp.

- Komárek, J. 2014. Chapter 2 Modern classification of cyanobacteria. 21–39.
- Komárek, J. 2016. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *Eur. J. Phycol.* 51:346–53.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J. & Johansen, J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia.* 295–335.
- Komárek, J., Turicchia, S., Ventura, S. & Komárková, J. 2009. Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize: 2. Diversity of oscillatoriacean genera. *Nov. Hedwigia.* 89:165–200.
- Komarek, J., Zapomelova, E., Smarda, J., Kopecky, J., Rejmankova, E., Woodhouse, J., Neilan, B.A. et al. 2013. Polyphasic evaluation of *Limnoraphis robusta*, a water-bloom forming cyanobacterium from Lake Atitlan, Guatemala, with a description of *Limnoraphis* gen. nov. *Fottea.* 13:39–52.
- Lowe, T.M. & Eddy, S.R. 1996. TRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25:955–64.
- Machado-de-Lima, N.M., Martins, M.D., Branco, L.H.Z. 2017. Recognition of two new cryptic species of *Wilmottia* (Coleofasciculaceae, Oscillatoriales, Cyanobacteria) based on a polyphasic approach. *Phytotaxa.* 307:43–54.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2012. Brock - Biology of Microorganisms. 1043 pp.
- Malone, C.F. da S., Rigonato, J., Laughinghouse, H.D., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Wilmotte, A., Fiore, M.F. et al. 2015. *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): Towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:2993–3007.
- Martins, M.D. & Branco, L.H.Z. 2016. *Potamolinea* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria):

- a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:3632–41.
- Martins, M.D., Rigonato, J., Branco, L.H.Z. & Taboga, S.R. 2016. Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:2396–405.
- Moro, I., Rascio, N., La Rocca, N., Sciuto, K., Albertano, P., Bruno, L. & Andreoli, C. 2010. Polyphasic characterization of a thermo-tolerant filamentous cyanobacterium isolated from the Euganean thermal muds (Padua, Italy). *Eur. J. Phycol.* 45:143–54.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:693–7.
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L.H., Kováčik, L., Martin, M.P. & Johansen, J.R. 2014. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.* 49:450–70.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1–61.
- Sciuto, K., Andreoli, C., Rascio, N., La Rocca, N. & Moro, I. 2012. Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics*. 28:357–74.
- Sciuto, K. & Moro, I. 2016. Detection of the new cosmopolitan genus *Thermoleptolyngbya* (Cyanobacteria, Leptolyngbyaceae) using the 16S rRNA gene and 16S-23S ITS region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 105:15–35.
- Strunecký, O., Elster, J. & Komárek, J. 2010. Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: Is there a link between north and south polar regions? *Polar Biol.* 33:1419–28.

- Strunecký, O., Elster, J. & Komárek, J. 2011. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium “*Phormidium*” *murrayi*= *Wilmottia murrayi*. *Fottea*. 11:57–71.
- Strunecky, O., Komarek, J. & Šmarda, J. 2014. *Kamptonema* (Microcoleaceae, Cyanobacteria), a new genus derived from the polyphyletic *Phormidium* on the basis of combined molecular and cytomorphological markers. *Preslia*. 86:193–207.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–9.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, D., Wilmotte, A. & Wit, R. De 2003. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5157–69.
- Thiers, B. 2017. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. Available at: <http://sweetgum.nygb.org/ih/> (last accessed May 1, 2017).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–80.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406–15.

CAPÍTULO IV – *Blennothricopsis
periphytica* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales,
Cyanobacteria): a new cryptic
cyanobacterial genus *

*Artigo será submetido na Phytotaxa.

Buch, B.; Martins, M.D.; Branco, L.H.Z. *Blennothricopsis periphytica* gen. et sp. nov.
(Oscillatoriales, Cyanobacteria): a new cryptic cyanobacterial genus.

ABSTRACT

The evolution of cyanobacteria is characterized by frequent convergent events, which turns complex the recognition of monophyletic lineages. This particularity highlighted the fragility of using morphological characters to infer about the evolutionary history of the group and have been lost status in favor of molecular characters over the past years. Thus, several new cyanobacterial taxa have been recently described using the polyphasic approach and have been considered cryptotaxa, revealing the great homoplasy in the group. This is the case of a population found in a Brazilian artificial reservoir that morphologically corresponds to *Blennothrix* (filaments containing more than one trichome, false coleodesmioid branching, discoid cells, thickened and lamellated sheaths). However, comparative analyses of 16S rRNA gene sequences showed a divergence between the sequence of the studied and other strains available in GenBank, including the type species *Blennothrix vermicularis*. The phylogenetic analyses based on these sequences revealed that the Brazilian strain correspond to a distinctive cryptic genus of Cyanobacteria, *Blennothricopsis* *gen. nov.*, containing one species, *B. periphytica* *sp. nov.*

Keywords: 16S rRNA, 16S-23S ITS, Brazil, cryptogenera, Oscillatoriaceae, phylogenetic analysis.

INTRODUCTION

The development of molecular biological tools has led to a profound modification in the cyanobacterial classification and methods of identification (Hoffmann *et al.* 2005, Komárek *et al.* 2014). In the modern cyanobacterial classification system, the 16S rRNA gene is considered the primary phylogenetic marker to define taxa, mainly at the genus level (Komárek 2016, Wilmotte *et al.* 2017). Other markers, such as ecological and morphological features, are evaluated and combined to better describe taxa at the specific level. This synthetic approach comprises the polyphasic characterization, which has been extensively used to study cyanobacterial populations and, if adequate, propose new taxa (Komárek 2016).

The morphology of a microbial cell is a genetically directed feature and has evolved to maximize fitness in a particular habitat (Singh & Montgomery 2011, Caccamo & Brun 2018). In cyanobacteria, the occupation of different habitats worldwide is certainly related to its acknowledged morphological diversity. Nevertheless, the morphological evolution in cyanobacteria did not happen progressively from simple forms to complex ones. Instead, morphological complexity has been lost and regained several times during the course of evolution (Schirmer *et al.* 2011), making difficulty to use this character to define monophyletic lineages. The morphological convergence of distinct lineages under similar environmental conditions results in the occurrence of the so called cryptotaxa, which documentation is necessary for further advances in cyanobacterial research (Komárek 2016, Rott *et al.* 2018).

The polyphasic approach has brought to attention the knowledge of the existence of several cases of cryptotaxa revealing the great genetic diversity of cyanobacteria not always related to morphological variation (McGregor & Sendall 2015, Komárek 2016, Martins *et al.* 2016). One of these cases involves the genus *Lyngbya* Agardh ex Gomont, a member of Oscillatoriaceae characterized by forming single cylindrical uniseriated, isopolar, homocyted

trichomes with discoid cells covered by thick and lamellated sheaths (Komárek & Anagnostidis 2005, Komárek 2017). Several studies have shown the heterogeneity and the polyphyletic nature of *Lyngbya* (Engene *et al.* 2010, Palińska *et al.* 2015) from which some new cryptic genera were recently described: *Moorea* (Engene *et al.* 2012), *Okeania* (Engene *et al.* 2013), *Limnoraphis* (Komárek *et al.* 2013), *Microseira* (McGregor & Sendall 2015) and *Dapis* (Engene *et al.* 2018). *Lyngbya* is also morphologically related to the genera *Blennothrix* Kützinger ex Anagnostidis et Komárek and *Hydrocoleum* Kützinger ex Gomont, genera supported by the molecular phylogeny of the 16S rRNA gene (Komárek *et al.* 2014, Palińska *et al.* 2015), however, the main diacritic feature separating these two taxa is the presence of false coleodesmioid branching in *Blennothrix*.

The genera which comprises the family Oscillatoriaceae are important components of the benthic communities in both freshwater and marine ecosystems, whether by their role as primary producers or by their potential ability to produce bioactive secondary metabolites and cyanotoxins (Engene *et al.* 2012, McGregor & Sendall 2015, Hudon *et al.* 2016).

Historically, studies on cyanobacterial diversity were mostly concentrated in the temperate zones and the new records on tropical cyanobacteria were not recognized in new taxa, classifying them into existing systems according to their morphology (Dvořák *et al.* 2015, 2018). This practice have underestimated the diversity of the group, which might be relevant at the tropics since several new taxa of Oscillatoriales have been recently described for tropical ecosystems in Brazil (Malone *et al.* 2015, Martins & Branco 2016, Martins *et al.* 2016, Buch *et al.* 2017, Machado-de-Lima *et al.* 2017, Caires *et al.* 2018) and other countries (Nguyen *et al.* 2013, Komárek *et al.* 2013, Hašler *et al.* 2014, Engene *et al.* 2013, Hašler *et al.* 2017, Jahodářová *et al.* 2018).

During a survey on Brazilian tropical benthic cyanobacteria in freshwater environments, using the polyphasic characterization, a population morphologically corresponding to *Blennothrix*

and *Lyngbya* was found. More detailed studies revealed that, despite the morphological similarity, the population was genetically distinct from the two genera and corresponds to a new genus and species named *Blennothricopsis periphytica*. Thus, the results and comparisons that support this proposal are further presented.

MATERIAL AND METHODS

Origin of the strain and cultivation

The population was found in an artificial water reservoir, in the tropical region, municipality of Santa Fé do Sul, São Paulo State, southeastern Brazil (20°10'34"S, 50°56'59"W). The abiotic parameters temperature, pH, conductance and dissolved oxygen were taken using a multiparameter probe (Yellow Springs 556).

In the laboratory, trichomes of this population were separated from others and successively transferred to clean drops of deionized water using a Pasteur pipette under an inverted light microscope (Leica DMIL LED). The sole and cleaned trichomes were then inoculated in tubes with BG11 growth medium (Rippka *et al.* 1979) to establish unicyanobacterial cultures. Strains were cultured and maintained under 20°C±1°C, 50 µmol photons.m⁻².s⁻¹ of irradiance and a 14:10 hours light:dark cycle.

Morphological characterization

Morphological variability of this population was evaluated with both fresh field material and cultured samples using Olympus BH2 microscope. Taxonomic features, such as filament width, cell width, cell length, cell length/width ratio, attenuation of trichomes and apical cell shape and dimensions, were analyzed from a minimum of 30 full developed trichomes. Representative specimens were deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil (Thiers 2018), for testimony.

Molecular and phylogenetic analyses

The biomass for DNA extraction was obtained from non-axenic unicyanobacterial clonal cultures by repeated centrifugations. During the centrifugation process, the filaments were washed several times with sterile deionized water to remove or reduce mucilage and growth medium substances. DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories) according to the manufacture's protocol.

The 16S rRNA gene and 16S-23S ITS were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 16S27F and 23S30R (Taton *et al.* 2003) and performed in a Techgene TC-512 thermal cycler (Techne) using 25 μ L reaction volumes containing 5 μ L of 10X PCR buffer, 2 μ L of 50 mM MgCl₂, 1 μ L of 10 mM dNTP mix, 1.25 μ L of each primer (5 μ mol), 14.2 μ L of Milli-Q water, 1.5 U Platinum Taq DNA polymerase and 10 ng of genomic DNA. Thermal cycling was 94°C for 5 min, followed by 10 cycles of 94°C, 45 s; 57°C, 45 s; 72°C, 2 min; 25 cycles of 92°C, 45 s; 54°C, 45 s; and one final step of 72°C, 7 min. The PCR products were analyzed on 1% agarose gels stained with GelRed 0.6X (Biotium) and viewed on a "Mini Bis Pro" transilluminator (Micro Photonics). The positive products were cloned using pGEM-T Easy Vector System I (Promega) according to the supplier's manual. Competent *Escherichia coli* DH5- α cells were transformed by heat shock and recombinant plasmids were isolated using the GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific). Sequencing was performed on an ABI 3130 sequencer, using BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) as the manufacturer's protocol. M13F and Sp6R primers correspond to the vector sites and the internal primers 357F, 704R, 1114F and 1494R (Neilan *et al.* 1997) were used for sequencing. The DNA fragments were assembled into contigs using the Phred/Phrap/Consed software (Ewing & Green 1998, Ewing *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1998), and only bases with quality higher than 20 were considered.

The sequences obtained were compared to sequences previously published in NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the closest related were selected to compose the database. The alignment was conducted using the software ClustalW v1.8 (Thompson *et al.* 1994) in MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013) and inspected and refined manually. The unicellular cyanobacteria *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (GenBank access number NC005125) was designed as evolutionary outgroup.

Phylogenetic analyses were performed based on partial 16S rRNA gene sequences. The appropriate nucleotide substitution models were selected in jModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.* 2012). The Bayesian (BI) analysis was performed in MrBayes 3.1.2 software (Huelsenbeck & Ronquist 2001), run with GTR+G+I model (rate matrix with six different substitution types, number of rate categories = 4, and with the nucleotide frequencies, shape parameter and pINVAR estimated from the data). BI analysis comprised two runs of four Markov Chain Monte Carlo (MCMC), each with 12,000,000 generations and sampling every 100 generations. The initial 12,000 generations were discarded as burn-in. Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) methods were performed using Mega 6.06 (Tamura *et al.* 2013) and the GTR model was applied in the last method assuming heterogeneous substitution rate and gamma substitution of variable sites. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. Sequence identity matrix/nucleotide divergence was calculated from the alignment in BioEdit (Hall 2011) from all positions including gaps.

The 16S-23S ITS regions D1-D1', Box-B and V3 (Iteman *et al.* 2000) were identified and their secondary structures were determined using Mfold 3.2 (Zuker 2003) and re-drawn in Fireworks 8.0 (Macromedia). The tRNA sequences were identified with tRNAscan-SE 1.21 (Lowe & Chan 2016).

RESULTS

Morphology

The population studied morphologically corresponds to the genus *Blennothrix*, according to Komárek & Anagnostidis (2005), specially with the type species *Blennothrix vermicularis* (Table 2). The filaments contain from 1 to 3 trichomes, measuring 14.0-25.0 µm wide and present coleodesmioid false branching. The sheaths are firm, thick, colorless and lamellated. The trichomes are cylindrical, not attenuated, not constricted to slightly constricted at the granulated cross-walls, with 10.0-15.0 µm wide. The cells are distinctively short, discoid, measuring from 2.0 to 4.0 µm long, cell length/cell width ratio of 0.13-0.4; the cell content is usually brown, granulated. The apical cells are rounded, without calyptra, and sometimes they develop a thickened outer cell wall (Fig. 1, Table 1).

Ecology

The filaments were found forming masses, growing entangled with other algae and cyanobacteria on a concrete spillway in an artificial water reservoir surrounded by pastures. Values of selected abiotic parameters at the time of collection were: water temperature 26.6°C, pH 6.5, conductance 10 µS.cm⁻¹, dissolved oxygen 3.92 mg.L⁻¹ (49% saturation).

Molecular analyses and phylogeny

The comparison of the 16S rRNA gene partial sequence of the studied strains (1165 bp) and sequences of GenBank showed similarities below 94.2%. The BLAST best match for studied strain resulted in 94.2% identity with *Microseira wollei* AW2009 clone B37 (KM077452), *M. wollei* YC1109 clone A45 (KM077454), *Blennothrix* sp. AQS clone D (EU586735), *Blennothrix* sp. AQS clone A (EU586734) and *Blennothrix ganeshii* Mex8 (KM276546) (Table 2).

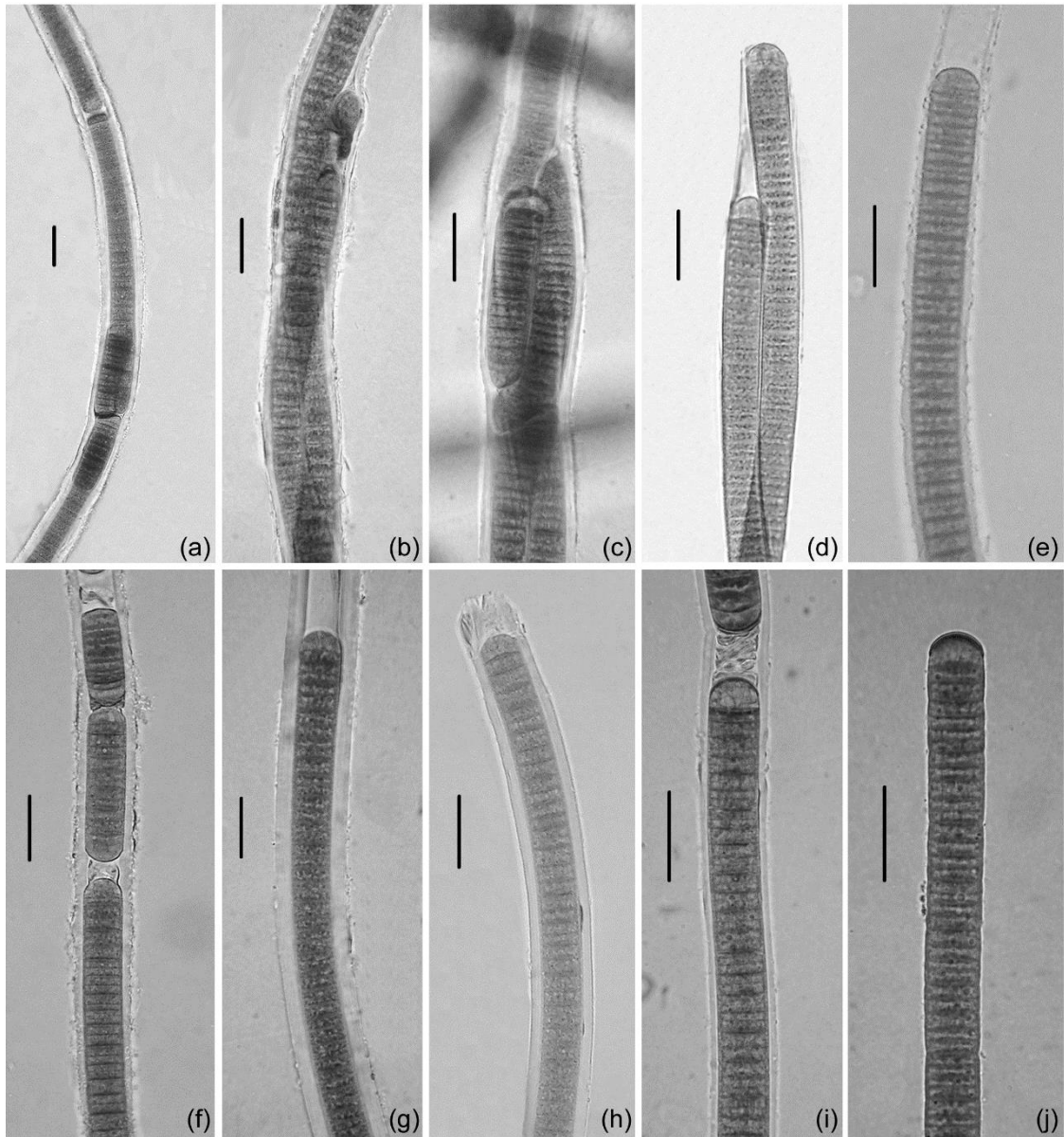


FIGURE 1. Photomicrographs of *Blennothricopsis periphytica*. Bars, 20 µm. (a), (b), (c) and (d) coleodesmioid false branching; (f) and (i) necridic cell; (j) thickened outer cell wall.

TABLE 1. Morphological and ecological comparison among *Blennothricopsis periphytica* and morphological related oscillatoriacean strains. (-) without information.

	<i>Blennothricopsis periphytica</i>	<i>Blennothrix vermicularis</i> ^{1,4}	<i>Blennothrix ganeshii</i> ²	<i>Microseira wollei</i> ³	<i>Lyngbya confervoides</i> ⁴
Filament diameter (µm)	14-25	-	45.2-75	≤70	12-30
Trichome diameter (µm)	10-15	14-20	33.9-50	28-47	10-16
Trichome per sheath	1-3	1-several	1-3	1	1
False branching	coleodesmioid	-	coleodesmioid	infrequently	-
Cell size (µm)	2-4	2.5	2.2-6.7	4-9	2-4
Cells broader than wide	5-7.5x	5.6-8x	7.5-15x	5-15x	1-8x
Ecology	Freshwater, epilithic, epiphytic	Marine, epilithic, epiphytic	Freshwater, periphytic	Freshwater, epilithic, epiphytic	Marine, epilithic, epiphytic

¹ Palińska *et al.* (2015); ² Jimenez *et al.* (2005); ³ McGregor & Sendall (2015); ⁴ Komárek & Anagnostidis (2005).

TABLE 2. Similarity of 16S rRNA gene of *Blennothricopsis periphytica* with similar strains of other related genera.

Strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1- <i>Blennothricopsis periphytica</i>	-										
2- <i>Blennothrix vermicularis</i> HL (KM276543)	92.3	-									
3- <i>Microseira wollei</i> AW2009cloneB37 (KM077452)	94.2	95.0	-								
4- <i>Cephalothrix komarekiana</i> CCIBt 3277 (KJ994514)	92.2	90.5	91.7	-							
5- <i>Aerosakkonema funiforme</i> Lao26 (AB86261)	93.9	90.9	93.8	93.6	-						
6- <i>Limnoraphis robusta</i> CCALA 966 (JN854138)	91.5	89.8	89.7	89.5	89.9	-					
7- <i>Moorea producens</i> NAC8-48 (GU724199)	89.9	89.5	89.6	89.3	89.1	89.2	-				
8- <i>Okeania plumata</i> NAC8-45 (GU724196)	91.9	87.9	90.0	89.3	90.7	97.6	91.9	-			
9- <i>Lyngbya</i> cf. <i>confervoides</i> VP0401 (AY599507)	89.9	89.3	88.8	88.2	89.0	88.6	92.5	89.3	-		
10- <i>Oscillatoria princeps</i> NIVA-CYA 150 (AB045961)	90.3	90.4	88.0	90.0	91.2	90.2	90.5	89.5	89.0	-	
11- <i>Phormidium</i> cf. <i>irriguum</i> CCALA 759 (FN813343)	93.1	91.1	89.6	92.3	92.5	90.8	91.0	89.4	90.5	89.0	-

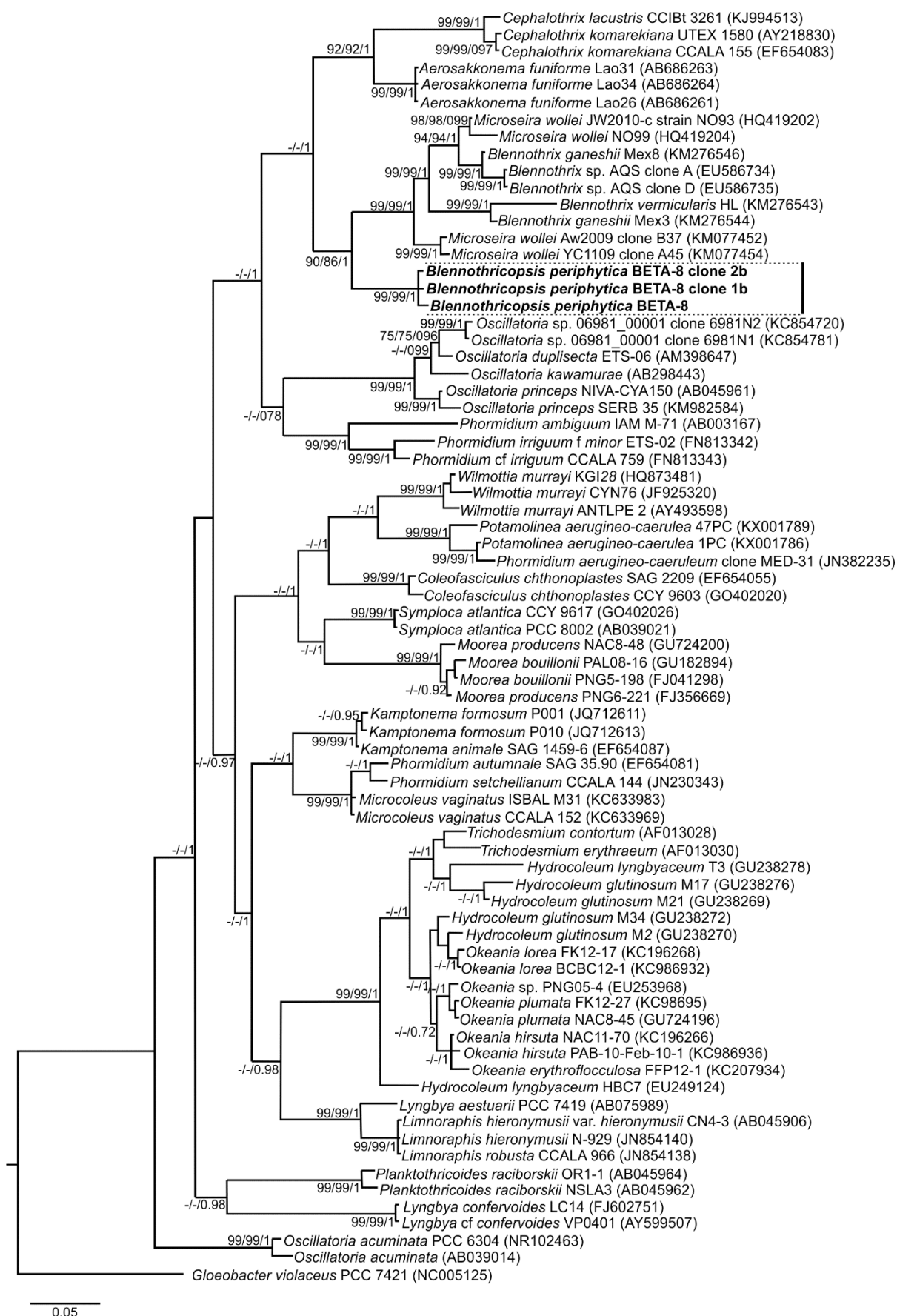


FIGURE 2. BI tree based on the 16S rRNA gene sequences (1283bp) of oscillatoriallean taxa. The branch comprising *Blennothricopsis periphytica* is in bold. Bootstrap values (>70%) and probabilities (>0.70) obtained from ML/NJ/BI methods, respectively, are displayed at the relevant nodes. GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar = 0.1 substitutions per nucleotide position.

The tree obtained with BI analysis contained more well-supported nodes than those obtained with ML and NJ analyses and it is consequently the tree reported herein. Analyses of 16S rRNA gene sequences showed a clear separation of the studied strain (*Blennothricopsis periphytica*, Fig. 2) from the remaining strains.

Blennothricopsis periphytica was placed alone as a sister group of the clade composed by *Microseira* and *Blennothrix* strains (Fig. 2) and this close relationship was well supported by bootstrap and posterior probabilities (90%-ML, 86%-NJ, 1-BI). The similarities scores of 16S rRNA gene sequences among them ranged from 92.3 to 94.2% (Table 2) and below 94% with other genera.

The 16S-23S ITS sequence of *Blennothricopsis periphytica* presented 483 nucleotides and both isoleucine and alanine tRNA genes were present. The basal sequences of the helices (D1-D1', Box-B and V3) were conserved and the secondary structures of 16S-23S ITS have been determined for *B. periphytica* and compared to those of *Blennothrix* sp. AQS clone D (EU586735) from the sister clade. The 16S-23S ITS sequence of *Blennothrix* sp. AQS clone D presented 460 nucleotides and both isoleucine and alanine tRNA genes were present. The basal sequences of the helices (D1-D1', Box-B and V3) were conserved and the determined secondary structures of 16S-23S ITS differs from that of *Blennothricopsis periphytica* (Fig. 3). The D1-D1' sequence of *Blennothrix* sp. AQS clone D has five more nucleotides than in *Blennothricopsis periphytica*, as well as the V3 sequence, which has nine more nucleotides in

Blennothrix sp. No sequences of 16S-23S ITS of *Microseira wollei* were found in genetic databanks.

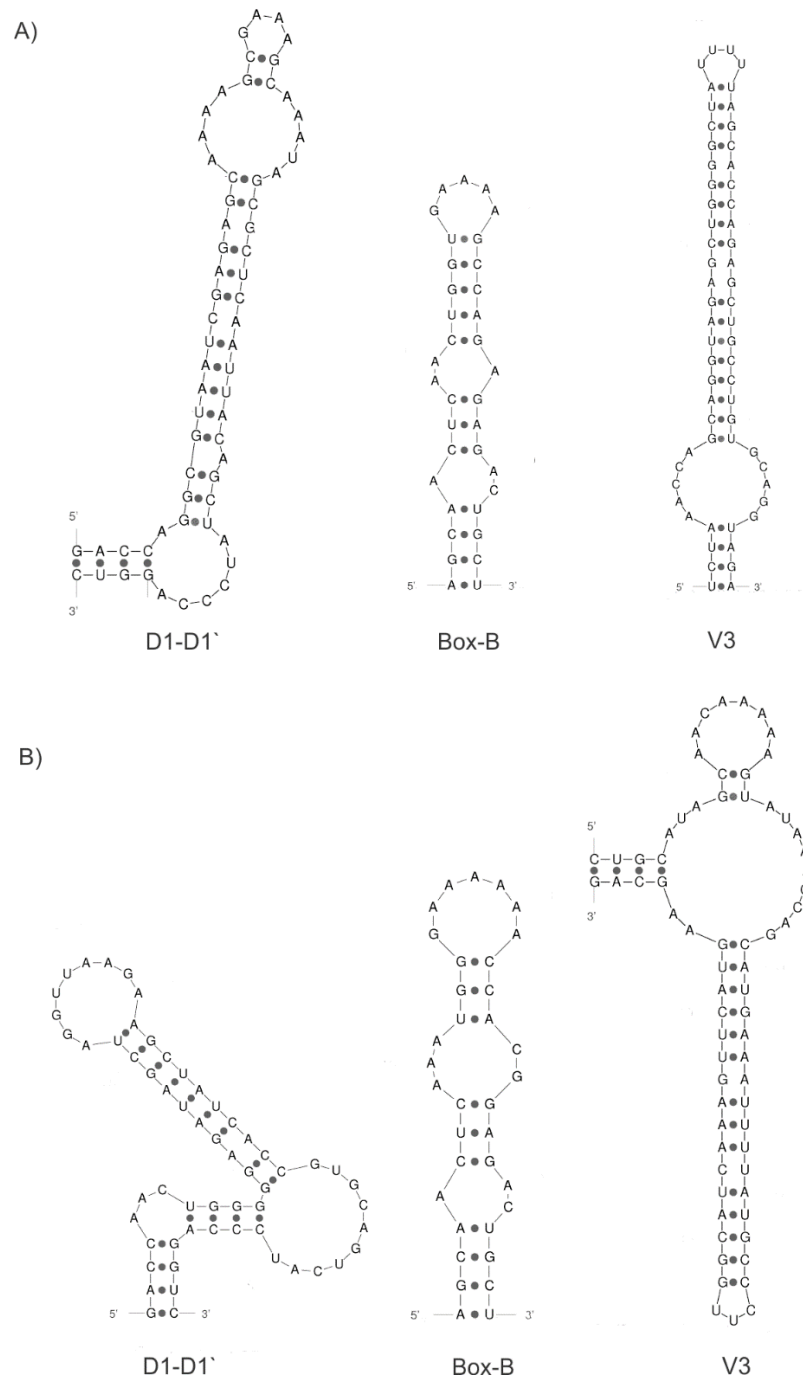


FIGURE 3. Secondary structure of conserved regions of 16S-23S ITS of *Blennothricopsis periphytica* (A) e *Blennothrix* sp. AQS clone D (B).

DISCUSSION

The phylogenetic analyses clearly distinguished the *Blennothricopsis periphytica* strain from the sister clade composed by *Microseira* and *Blennothrix* strains and from the true *Lyngbya* clade, composed by *L. confervoides* LC14 (FJ602751) and *Lyngbya* cf. *confervoides* VP0401 (AY599507), indicating it as a genetically well-defined new genus (Fig. 2). The low genetic identity between *Blennothricopsis* and other genera (< 94.2%) corroborates that it is a distinct generic entity, since a similarity of 94.5-95% of 16S rRNA gene is proposed as a threshold for strains of the same genus (Stackebrandt & Ebers 2006, Yarza *et al.* 2014).

The secondary structures of the 16S-23S ITS of *Blennothricopsis periphytica* and *Blennothrix* sp. AQS clone D (EU586735) differ from each other regarding the three basal sequences (D1-D1', Box-B and V3). Although it is not recommended to compare sequences of other genera, since it is a quite variable region and should be used among strains of the same genus (Boyer *et al.* 2002, Johansen *et al.* 2011, Martins & Branco 2016), the results found confirm the expected variation.

Blennothricopsis shares the same basic morphology of other members in the family Oscillatoriaceae: relatively thick, $\pm$ 5-60 μ m wide, isopolar trichomes without heterocytes and akinetes, and cells shorter than wide (Komárek 2017). The presence of sheaths is one of the main diacritical features between genera inside the family, which is absent in *Oscillatoria*, facultative in *Phormidium* and obligatory in *Lyngbya*. According to Komárek (2017), this character must be used with some reservations, considering other distinct cytomorphological characters, e.g. gas vesicles in cells (*Limnoraphis* Komárek *et al.*) and false branching in ensheathed types (*Blennothrix*), for taxonomic delimitation.

Blennothrix is morphologically related to *Lyngbya* and they can be differentiated by the number of trichomes per sheath: one in *Lyngbya* and one to several in *Blennothrix* (Komárek 2017). Moreover, the separation of *Blennothrix* from *Lyngbya* and other oscillatoriacean genera is also supported by the 16S rRNA phylogenetic analysis (Palińska *et al.* 2015).

Blennothricopsis is morphologically indistinguishable from *Blennothrix*: discoid cells, filaments containing more than one trichome and false coleodesmioid branching (Table 2) characterizing it as cryptic genera. Several taxonomic studies with members of the Oscillatoriales order have observed that the genetic diversity of these organisms is greater than their phenotypic diversity (Engene *et al.* 2012, Strunecký *et al.* 2013, McGregor & Sendall 2015).

Blennothricopsis is a sister clade of the group composed by *Microseira* and *Blennothrix* (ML- 99%, NJ- 99%, BI- 1). The similarity scores observed in the phylogenetic analysis among the strains inside the *Blennothrix*/*Microseira* clade varied from 94.2 to 99.5% (Table S1), suggesting a close relationship between them. The taxonomic status of the genus *Blennothrix* was confirmed by Palińska *et al.* (2015), while studying the genus *Hydrocoleum* position. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA conducted by Palińska *et al.* (2015) used several sequences of *Hydrocoleum* and *Blennothrix* strains, including the type strain *Blennothrix vermicularis* Kützing ex Anagnostidis & Komárek, for which only the herbarium exsiccatum was hitherto available. The *Blennothrix* clade (ML- 98%) was composed by the type strains *Blennothrix vermicularis* (KM276543), *Blennothrix ganeshii* (KM276546, KM276544, KM276545) and *Lyngbya wollei* (EU439567, JQ282906, HQ419204) and was separated from the *Hydrocoleum* strains.

The genus *Microseira* was described in 2015, by McGregor & Sendall, that is the same year of the publication of the study by Palińska *et al.* (2015). The *Microseira* clade (ML- 100%, NJ- 97%) was composed by Australian strains (KM077450-51, KM077453-55) and strains from the United States (HQ419202-04, EU439567, EU603708, JQ282906) previously classified as *Lyngbya wollei*. In that study, the phylogenetic analysis of the 16S rRNA separated the *Microseira* clade from the *Hydrocoleum*/*Blennothrix* clade, however, the type strain *Blennothrix vermicularis* was not used in that evaluation and the only *Blennothrix* strain

(EU253968) used was previously positioned in the genus *Okeania* (Engene *et al.* 2013). Morphologically, the genus *Microseira* is very similar to *Blennothrix*, specially with the species *B. ganeshii*, regarding the cell measurements. Moreover, the authors considered the observed false branching in *Microseira* as a facultative feature, which can be altered under different environmental conditions, since it was not observed in cultured materials and also not in all studied field samples. However, the present results suggest that future studies are necessary to confirm the *Microseira* position regarded the *Blennothrix*, as they present very close morphological, ecological and molecular features.

Blennothricopsis is a cryptogenera, that can be defined as “those with a certain molecular difference, but without a distinct morphological separation”, following Komárek *et al.* (2014). Several cases of cryptotaxa have been documented and, despite suggesting a morphological stasis of the taxa, it indeed reflects the frequent convergent evolutionary events in Cyanobacteria. According to Schirmer *et al.* (2011), similar morphologies may correspond to adaptive convergences which have appeared several times in distant cyanobacterial lineages, which also explains the numerous polyphyletic taxa.

Despite being the most morphological complex prokaryotes, the cryptic diversity in Cyanobacteria demonstrates that morphological features are not informative at the genus and species level and are insufficient to reconstruct phylogenies in order to reveal the evolutionary history of the group (Dvořák *et al.* 2015). The polyphasic approach, using the 16S rRNA, as well as other molecular markers, as the basis of the taxonomical delimitation have demonstrated the great genetic diversity and morphological plasticity achieved by cyanobacteria in billions of years of evolution, showing an underexplored biochemical, ecological and genetic background.

Description of the new genus and the new species

Blennothricopsis Buch, Martins et Branco *gen. nov.*

Filaments containing 1-3 trichomes, sometimes branched (coleodesmioid false branching). Sheaths firm, thick, colorless, lamellated. Trichomes isopolar, cylindrical along their whole length. Cells distinctively shorter than wide, discoid. Apical cell rounded, without calyptra, sometimes with thickened outer cell wall. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: The genus name is derived from the genus name *Blennothrix* with the suffix *opsis*=resembling in appearance.

Type species: *Blennothricopsis periphytica* B. Buch, M.D. Martins et L.H.Z. Branco *sp. nov.*

Blennothricopsis periphytica Buch, Martins et Branco *sp. nov.*

Filaments entangled among other cyanobacteria, forming a periphytic plant mass. Filaments with 1-3 trichomes, 14.0-25.0 µm wide. Sheaths firm, thick, colorless, lamellated. Trichomes isopolar, cylindrical along their whole length, not constricted or slightly constricted at the granulated cross walls, 10.0-15.0 µm wide. Cells distinctively shorter than wide, discoid, 2.0-4.0 µm long. Cell content violet-brownish, granulated. Apical cell rounded, without calyptra, sometimes with thickened outer cell wall. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: The species epithet refers to its habitat, *periphytica*= from periphyton.

Type locality: Santa Fé do Sul municipal reservoir, municipality of Santa Fé do Sul, São Paulo State, Brazil; 20°10'34"S, 50°56'59"W.

Holotype: formaldehyde-fixed sample of strain BETA-8 deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil, voucher number SJRP 32557.

Molecular characterization: the 16S rRNA gene and 16S-23S ITS sequences which can be used to identify *Blennothricopsis periphytica* were deposited in GenBank, accession numbers MK072736, MK072737 and MK072738.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the São Paulo Research Foundation (2012/19468-0, 2014/08200-1) and the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001” for financial support.

REFERENCES

- Alvarenga, D.O., Rigonato, J., Branco, L.H.Z., Melo, I.S. & Fiore, M.F. (2016) *Phyllonema aviceniicola* gen. nov., sp. nov. and *Foliisarcina bertiogensis* gen. nov., sp. nov., epiphyllic cyanobacteria associated with *Avicennia schaueriana* leaves. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2): 689–700.
<http://doi.org/10.1099/ijsem.0.000774>
- Andreote, A., Vaz, M. & Genuário, D. (2014) Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *J. Phycol.* 50 (4): 675–84.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12192>
- Boyer, S.L., Johansen, J.R., Flechtner, V.R. & Howard, G.L. (2002) Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S its region. *J. Phycol.* 38 (6): 1222–35.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01168.x>
- Buch, B., Martins, M.D. & Branco, L.H.Z. (2017) A widespread cyanobacterium supported by polyphasic approach: proposition of *Koinonema pervagatum* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales). *J. Phycol.* 53 (5): 1097–105.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12568>
- Caccamo, P.D. & Bruna, Y.V. (2018) The molecular basis of noncanonical bacterial morphology. *Trends in Microbiology* 26 (3): 191-208.
<http://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.012>
- Caires, T.A., Lyra, G. de M., Hentschke, G.S., Pedrini, A. de G., Sant’Anna, C.L. & Nunes,

- J.M. de C. (2018) *Neolyngbya gen. nov.* (Cyanobacteria, Oscillatoriaceae): a new filamentous benthic marine taxon widely distributed along the Brazilian coast. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120:196–211.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.009>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9 (8): 772–772.
<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dvořák, P., Jahodářová, E., Casamatta, D.A., Hašler, P. & Pouličková, A. (2018) Difference without distinction? Gaps in cyanobacterial systematics; when more is just too much. *Fottea.* 18 (1):130–6.
<http://fottea.czechphycology.cz/doi/10.5507/fot.2017.023.html>
- Dvořák, P., Jahodářová, E., Hašler, P., Gusev, E. & Pouličková, A. (2015) A new tropical cyanobacterium *Pinocchia polymorpha gen. et sp. nov.* derived from the genus *Pseudanabaena*. *Fottea.* 15:113–20.
<http://fottea.czechphycology.cz/doi/10.5507/fot.2015.010.html>
- Dvořák, P., Casamatta, D.A., Pouličková, L., Hašler, P., Ondřej, V., Sanges, R. *Synechococcus*: 3 billions years of global dominance. *Molecular Ecology*, 23:5538–5551.
<https://doi:10.1111/mec.12948>
- Engene, N., Coates, R.C. & Gerwick, W.H. (2010) 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. *J. Phycol.* 46 (43): 591–601.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00840.x>
- Engene, N., Paul, V.J., Byrum, T., Gerwick, W.H., Thor, A. & Ellisman, M.H. (2013) Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania gen. nov.* (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). *J. Phycol.* 49(6): 1095–106.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12115>
- Engene, N., Rottacker, E.C., Kaštovský, J., Byrum, T., Choi, H., Ellisman, M.H., Komárek, J. et al. (2012) *Moorea producents gen. nov., sp. nov.* and *Moorea bouillonii comb. nov.*, tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (5): 1171–8.
<http://doi.org/10.1099/ijs.0.033761-0>
- Engene, N., Tronholm, A., Paul, V.J. (2018) Uncovering cryptic diversity of *Lyngbya* : the new tropical marine cyanobacterial genus *Dapis* (Oscillatoriales). *Journal of Phycology*, 54(4): 435–446.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12752>

- Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8 (3): 186–94.
<http://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8 (3): 175–85.
<http://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Genuário, D.B., Souza, W.R., Monteiro, R.T.R., Sant'Anna, C.L. & Melo, I.S. (2018) *Amazoninema* gen. nov. (Synechococcales, Pseudanabaenaceae), a novel Cyanobacteria genus from Brazilian Amazonian rivers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68 (7): 2249–57.
<http://doi.org/10.1099/ijsem.0.002821>
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. & Al, G.E.T. (1998) Consed : a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8:195–202.
<http://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>
- Hall, T. (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2:60–1.
- Hašler, P., Dvořák, P., Pouličková, A., Casamatta, D.A. (2014) A novel genus *Ammassolinea* gen. nov. (Cyanobacteria) isolated from sub-tropical epipelagic habitats. *Fottea*, 14(2): 241–248.
<https://doi.org/10.5507/fot.2014.018>
- Hašler, P., Casamatta, D., Dvořák, P., Pouličková, A. (2017) *Jacksonvillea apiculata* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. & sp. nov.: a new genus of filamentous, epipsammic cyanobacteria from North Florida. *Phycologia*, 56(3): 284–295.
<https://doi.org/10.2216/16.62.1>
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kaštovský, J. (2005) System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 117 (1): 95–115.
<http://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0095>
- Hudon, C., Gagnon, P., Poirier Larabie, S., Gagnon, C., Lajeunesse, A., Lachapelle, M. & Quilliam, M.A. (2016) Spatial and temporal variations of a saxitoxin analogue (LWTX-1) in *Lyngbya wollei* (Cyanobacteria) mats in the St. Lawrence River (Québec, Canada). *Harmful Algae*. 57:69–77.
<http://doi.org/10.1016/j.hal.2016.06.001>
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17 (8): 754–5.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>

- Iteman, I., Rippka, R., De Marsac, N.T. & Herdman, M. (2000) Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*. 146 (6): 1275–86.
<http://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1275>
- Jahodářová, E., Dvořák, P., Hašler, P., Holušová, K., Pouličková, A. (2018) *Elainella* gen. nov.: a new tropical cyanobacterium characterized using a complex genomic approach. *European Journal of Phycology*, 53(1): 39-51.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1362591>
- Jimenez, J.C., Magos, Y.B., Collado-Vides, L. (2005) Taxonomy and distribution of freshwater *Blennothrix ganeshii* Watanabe et Komárek (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) from central Mexico. *Nova Hedwigia* 80: 323-333.
<http://doi.org/10.1127/0029-5035/2005/0080-0323>
- Johansen, J.R., Kovačik, L., Casamatta, D.A., Fučíková, K. & Kaštovský, J. (2011) Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (pseudanabaenaceae, cyanobacteria). *Nov. Hedwigia*. 92:283–302.
<http://doi.org/10.1127/0029-5035/2011/0092-0283>
- Komárek, J. (2016) A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *Eur. J. Phycol.* 51 (3): 346–53.
<http://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Komárek, J. (2017). Delimitation of the family Oscillatoriaceae (Cyanobacteria) according to the modern polyphasic approach (introductory review). *Brazilian J. Bot.* 41 (2).
<http://doi.org/10.1007/s40415-017-0415-y>
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005) Cyanoprokaryota II. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & Schagerl, M. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2. Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, München, 759 pp.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J.R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- Komárek, J., Zapomělová, E., Šmarda, J., Kopecký, J., Rejmánková, E., Woodhouse, J., Neilan, B.A. et al. (2013) Polyphasic evaluation of *Limnoraphis robusta*, a water-bloom forming cyanobacterium from Lake Atitlan, Guatemala, with a description of *Limnoraphis* gen. nov. *Fottea*. 13 (1): 39–52.
<http://doi.org/10.5507/fot.2013.004>

- Lowe, T.M. & Chan, P.P. (2016) TRNAscan-SE On line: integrating search and context for analysis of transferRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 44 (1): 54-57.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>
- Machado-de-Lima, N.M., Martins, M.D. & Branco, L.H.Z. (2017) Description of a tropical new species of *Wilmottia* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) and considerations about the monophyly of *W. murrayi*. *Phytotaxa*. 307 (1): 43-54.
<http://doi.org/10.11646/phytotaxa.307.1.4>
- Malone, C.F. da S., Rigonato, J., Laughinghouse, H.D., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Wilmotte, A., Fiore, M.F. *et al.* (2015) *Cephalothrix gen. nov.* (Cyanobacteria): Towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (9): 2993-3007.
<http://doi.org/10.1099/ijms.0.000369>
- Martins, M.D. & Branco, L.H.Z. (2016) *Potamolinea gen. nov.* (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 3632-41.
<http://doi.org/10.1099/ijsem.0.001243>
- Martins, M.D., Rigonato, J., Branco, L.H.Z. & Taboga, S.R. (2016) Proposal of *Ancylothrix gen. nov.*, a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2396-405.
<http://doi.org/10.1099/ijsem.0.001044>
- McGregor, G.B. & Sendall, B.C. (2015) Phylogeny and toxicology of *Lyngbya wollei* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) from north-eastern Australia, with a description of *Microseira gen. nov.* *J. Phycol.* 51 (1): 109-19.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12256>
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. (1997) rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (3): 693-7.
<http://doi.org/10.1099/00207713-47-3-693>
- Nguyen, L.T.T, Cronberg, G., Moestrup, O., Daugbjerg, N. (2013) *Annamia toxica gen. et sp. nov.* (Cyanobacteria), a freshwater cyanobacterium from Vietnam that produces microcystins: ultrastructure, toxicity and molecular phylogenetics. *Phycologia*, 52(1):25-36.
<https://doi.org/10.2216/10-097.1>
- Palińska, K.A., Abed, R.M.M., Charpy, L., Langlade, M.J., Beltrán-Magos, Y. & Golubic, S.

- (2015) Morphological, genetic and physiological characterization of *Hydrocoleum*, the most common benthic cyanobacterium in tropical oceans. *Eur. J. Phycol.* 50 (2): 139–54.
<http://doi.org/10.1080/09670262.2015.1010239>
- Rigonato, J., Alvarenga, D.O. & Fiore, M.F. (2017) Tropical Cyanobacteria and their Biotechnological Applications. In: Azevedo, J.L. & Quecine, M.C. (Eds.) *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer International Publishing, Cham, pp. 139–67.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1–61.
<https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Rott, E., Pentecost, A. & Mareš, J. (2018) Introduction: Recent developments in cyanobacterial research with special reference to aquatic habitats, molecular ecology and phylogenetic taxonomy. *Hydrobiologia*. 811 (1): 1–6.
<https://doi.org/10.1007/s10750-017-3468-9>
- Schirmeister, B.E., Anisimova, M., Antonelli, A. & Bagheri, H.C. (2011) Evolution of cyanobacterial morphotypes: Taxa required for improved phylogenomic approaches. *Commun. Integr. Biol.* 4 (4): 424–7.
<https://doi.org/10.4161/cib.4.4.16183>
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A. *et al.* (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (3): 1053–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1217107110>
- Singh, S.P. & Montgomery, B.L. (2011) Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* 19 (6): 78–285.
<http://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.001>
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33: 152–155.
- Strunecký, O., Komárek, J., Johansen, J., Lukešová, A. & Elster, J. (2013) Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *J. Phycol.* 49 (6): 1167–80.
<http://doi.org/10.1111/jpy.12128>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular

- evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12): 2725–9.
<http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R. De & Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Society*. 69 (9): 5157–69.
<http://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5157>
- Thiers, B. (2018) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. Available from: <http://sweetgum.nygb.org/ih/> (accessed: 1 october 2018).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673–80.
<http://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Vaz, M.G.M.V., Genuário, D.B., Andreote, A.P.D., Malone, C.F.S., Sant’Anna, C.L., Barbiero, L. & Fiore, M.F. (2015) *Pantanalinema gen. nov.* and *Alkalinema gen. nov.*: Novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (1): 298–308.
<http://doi.org/10.1099/ijso.0.070110-0>
- Wilmotte, A., Laughinghouse IV, H.D., Capelli, C., Rippka, R. & Salmaso, N. (2017) Taxonomic identification of cyanobacteria by a polyphasic approach. In: Kurmayer, R., Sivonen, K., Wilmotte, A. & Salmaso, N. (Eds.) *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 79–134.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9): 635–645.
<http://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13): 3406–15.
<http://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

CAPÍTULO V – New *Phormidium*
(Oscillatoriales, Cyanobacteria) species
from Brazil: documentation of a
microcystin producer strain*

*Artigo será submetido na Algal Research

Buch, B., Martins, M.D., Branco, L.H.Z. New *Phormidium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) species from Brazil: documentation of a microcystin producer strain.

ABSTRACT

Phormidium is a widespread genus and considered to be polyphyletic, since its simple morphology congregates a great number of morphologically related individuals for which the phylogenetic relationships are unclear. Moreover, some strains of *Phormidium* are associated with toxin production and causes of intoxication and death in different countries. In this study, we evaluate four populations isolated from water reservoirs in the Northeast of São Paulo state, Brazil, using the 16S rRNA and *rpoC1* genes in a multiple alignment to infer its phylogenetic status and the 16S-23S ITS secondary to confirm the infrageneric position of species. Moreover, in order to evaluate the toxins production, the strains were screened for genes involved in the biosynthesis of microcystins and saxitoxins, a positive result was confirmed for *Phormidium* sp.2 and toxin quantified using HPLC. Consequently, three new species of *Phormidium* were described: *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2 and *Phormidium* sp.3, which formed a well-supported clade with the type species *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA759.

Key-words: 16S rRNA, 16S-23S ITS, *rpoC1*, microcystin, benthic.

INTRODUCTION

Phormidium Kützing ex Gomont is a genus distributed globally occurring in a wide range of habitats as important components of benthic mats [1–4] and several strains were found to be toxin producers causing, in some cases, animal deaths in different countries. The toxins associated to these occurrences were anatoxins [5–9], saxitoxins [10] and microcystins [11–13]. Phylogenetic analyses of the microcystin gene cluster have revealed that the ability to produce this toxin has been lost repeatedly in the cyanobacterial evolutionary history [14], therefore, all cyanobacteria are potential microcystin producers [15].

Taxonomically, *Phormidium* is known as a complex genus due to its morphological simplicity and great number of described species. Since the taxonomic starting point for the genus [16], the number of described species based on morphological criteria (29) increased to 163 in work of Komárek and Anagnostidis 2005 [17]. Due its large number of species, the genus has been divided in eight morphological groups of species according to the characteristics of the trichome ends [17]. Subsequent studies using biochemical and molecular markers found *Phormidium* is a polyphyletic genus and that the species in each group encompass a number of different genera [18]. Therefore, several new genera have been described recently as separated from *Phormidium* using the polyphasic approach, e.g. *Phormidesmis* [19], *Wilmottia* [20], *Oxynema* [21], *Roseofilum* [22], *Kamptonema* [23], *Ammassolinea* [24], *Cephalothrix* [25], *Ancylothrix* [26], *Potamolinea* [27], *Koinonema* [28] and *Pycnacronema* [29].

The actual polyphasic approach uses the genetic evaluation as the basis of the method, combining other diagnostic criteria, e.g. morphology, ecophysiology and ecology, to propose new taxa for the Cyanobacteria [30]. Currently, the identification of cyanobacterial taxa is obtained by comparing its molecular characteristics (16S rRNA gene) with those of type strains of previously described taxa. However, the descriptions of most taxa were based only on

morphological traits, without molecular characterization and, unfortunately, the type species for many genera are mostly not suitable for genetic comparative purposes [31,32].

Phormidium, with more than 200 species described [17] and considered to be polyphyletic [18], was divided in eight non-taxonomic intern groups by Komárek and Anagnostidis [17], mainly based on the trichome apex morphology and length/diameter ratio of cells, for easier identification. *Phormidium lucidum* Kützinger ex Gomont has been considered the type species (lectotype), for which only the original description and illustration are available. Komárek and Anagnostidis [17] placed *P. lucidum* in group VIII, which includes species with trichomes shortly attenuated toward the ends and apical cells with calyptra or with thickened outer cell walls.

Considering that there are no type specimens available and no precise indication of type locality of *P. lucidum*, Sciuto et al. [31] proposed to use sequences of 16S rRNA gene of *P. cf. irriguum* (Kützinger ex Gomont) Anagnostidis & Komárek (strain CCALA 759) as a molecular reference to the genus *Phormidium*, because it pertains to the same morphological group (VIII) of the lectotype of the genus. The use of *P. irriguum* has been a strategy to allow studies about the genus and it has been accepted by different authors [22,24,31], however further revisions regarding the *Phormidium* type species are necessary [29].

The conservative character of the 16S rRNA gene makes this molecular marker insufficient to resolve species. In this way, the secondary structures of the conserved domains D1-D1', Box-B and V3 of the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) have been proposed to access infrageneric diversity [34,35]. Other protein-coding genes, e.g. *rpoC1* (coding for the γ subunit of the cyanobacterial RNA polymerase core) and *rbcL*, are also indicated to evaluate infraspecific diversity [31,36]. Some authors have been using single and also multilocus sequence analysis with the genes 16S rRNA and *rpoC1* to better resolve evolutionary relationships among heterogeneous taxa in the Oscillatoriaceae [25,29,31]. In conclusion, the

use of different molecular markers as the basis of the cyanobacterial taxonomy has provided an increasing knowledge on the cyanobacterial genetic diversity and a classification system that better reflects the evolutionary history of the group [30].

The polyphasic approach was used here to propose three new species, *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2 and *Phormidium* sp.3, through the study of four populations morphologically associated with *Phormidium* group VIII, using single and multilocus analysis of the 16S rRNA and *rpoC1* markers and the 16S-23S ITS secondary structures. These new species are components of the benthic communities in lakes and reservoirs of the northeast region of state of São Paulo, Brazil. Moreover, the registration of a new microcystin producer warns the importance of studies accessing the cyanobacterial diversity, both morphological, genetic and biochemical (toxic potential) in benthic communities worldwide.

MATERIAL AND METHODS

Sampling sites, cultivation and morphological evaluation

The four populations evaluated in this study were collected in aquatic habitats of northwestern São Paulo State, Brazil (Table 1), as components of the benthic community in water reservoirs and ponds surrounded by pastures.

Trichomes of each sample were repeatedly separated from others and successively transferred to clean drops of deionized water using a Pasteur pipette under an inverted light microscope (Leica DMIL LED). The isolated trichomes were then inoculated in tubes with BG11 growth medium [35] to establish unicyanobacterial cultures. Strains were cultured and maintained under $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of irradiance and a 14:10 h light:dark cycle in the Culture Collection of IBILCE/UNESP.

Table 1. Origin and selected environmental parameters of the cyanobacterial strains examined in this study.

Species	Code	GPS Coordinates	Habitat/Location	Substrate	T.	Abiotic parameters			
						pH	C.	D.O.C	D.O.S
								.	.
<i>Phormidium</i> sp. 1	BETA-1	20°45'38"S/50°20'38"W	Small pond, Nova Castilho (SP)	Sandy sediment	27.4	8.09	10	-	-
<i>Phormidium</i> sp. 2	BETA-2	20°10'34"S/50°56'59"W	Reservoir, Santa Fé do Sul (SP)	Concrete spillway	26.6	6.50	10	3.92	48
<i>Phormidium</i> sp. 3	BETA-3	20°06'05"S/50°27'38"W	Reservoir, Fátima Paulista (SP)	Sandy sediment	24.4	5.84	7	3.96	48
	BETA-4	21°06'01"S/49°47'42"W	Small pond, Ubarana (SP)	Sandy sediment	28.0	7.14	8	7.81	100

(SP) State of São Paulo; (T.) water temperature - °C; (C.) conductance - $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; (D.O.C.) dissolved oxygen concentration – $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; (D.O.S) dissolved oxygen saturation - %

Morphological variability of populations was evaluated with both fresh field material and cultured samples using an Olympus BH2 microscope. Taxonomic features, such as cell width, cell length, attenuation of trichomes and apical cell shape were analyzed from a minimum of 30 trichomes for each sample. Representatives of each population studied were deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil [36].

Molecular methods

The biomass for DNA extraction was obtained from non-axenic unicyanobacterial cultures by repeated centrifugations. During the centrifugation process, the filaments were washed several times with sterile deionized water to remove or reduce mucilage and growth medium substances. DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories) according to the manufacturer's protocol.

The 16S rRNA gene and 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) markers were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 16S27F and 23S30R [37] and performed in a Techgene TC-512 thermal cycler (Techne) using 25 μ L reaction volume containing 5 μ L 10X PCR buffer, 2 μ L 50 mM $MgCl_2$, 1 μ L 10 mM dNTP mix, 1.25 μ L of each primer (5 μ mol), 14.2 μ L 'Milli-Q' water, 1.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies) and 10 ng genomic DNA. Thermal cycling was 94°C for 5 min, followed by ten cycles of 94°C for 45 s; 57°C for 45 s and 72°C for 2 min; 25 cycles of 92°C for 45 s and 54°C for 45 s; and one final step of 72°C for 7 min.

The *rpoC1* gene was amplified as described by Glowacka et al [24]. The PCR products were analyzed on 1% agarose gels stained with GelRed 0.6X (Biotium) and viewed on Mini Bis Pro transilluminator (Micro Photonics).

The positive products of *rpoC1* gene was purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Machery-Nagel) and sequenced directly. The positive products of 16S rRNA gene and 16S-23S ITS were cloned using the pGEM-T Easy Vector System I (Promega) according to the supplier's manual. Competent *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed by heat shock and recombinant plasmids were isolated using the GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific). Sequencing was performed on an ABI 3130 sequencer, using Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) as the manufacturer's protocol. Primers M13F and Sp6R correspond to the vector sites and the internal primers 357F, 704R, 1114F and 1494R [38] were used for sequencing of 16S rRNA gene and 16S-23S ITS. The primers *rpoC3* and *rpoC4* [39] were used for sequencing of *rpoC1* gene. The DNA fragments were assembled into contigs using the 'Phred/Phrap/Consed' software [39-41] and only bases with quality higher than 20 were considered.

Phylogenetic analyses

The sequences obtained were compared to sequences previously published in NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the closest related were selected to compose the dataset. The alignment was conducted using the software ClustalW 1.8 [42] in MEGA 6.06 [43] and inspected and refined manually.

Phylogenetic trees for separate *loci* (16S rRNA and *rpoC1*) and concatenated sequences were reconstructed using neighbor-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods. The appropriate nucleotide substitution models were selected in jModelTest 2.1.1 (Darriba et al. 2012). *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (GenBank accession number NC005125) was used as the out-group. NJ and ML methods were performed using MEGA 6.06 [43] and GTR model was applied in ML method assuming heterogeneous

substitution rate and gamma substitution of variable sites. Bootstrap resampling was performed on 1000 replicates. The BI analysis was performed in MrBayes 3.1.2 software [44] and GTR+G+I model was applied (rate matrix with six different substitution types, number of rate categories = 4, and with the nucleotide frequencies, shape parameter and pINVAR estimated from the data). BI analysis comprised two runs of four Markov Monte Carlo chains (MCMC), each with 10,000,000 generations and sampling every 100 generations. The initial 10,000 generations were discarded as burn-in. Sequence similarity matrix/nucleotide divergence was calculated from the alignment in BioEdit [45] for all positions, including gaps.

Concatenated analyses were conducted using 16S rRNA and *rpoC1* genes, run with GTR+G+I model. ML, NJ and BI were performed using Mega 6.06 and MrBayes 3.1.2 as described above.

The alignment of 16S-23S ITS region was made using a combination of ClustalW v1.8 [42] in MEGA 6.06 [43] and manual alignment utilizing secondary structure of conserved domains [32]. The tRNA sequences were identified with tRNAscan-SE 1.21 [47]. D1-D1', box-B and V3 16S-23S ITS regions were identified and their secondary structures were determined using Mfold 3.2 [47] and re-drawn in Fireworks 8.0 software.

Detection of the mcyE and sxtA genes

The strains were tested regarding their potential to produce microcystins and saxitoxins, through the amplification of the aminotransferase (AMT) domain, located on the modules *mcyE* and *ndaF* of the microcystin and nodularin synthetase enzyme complexes, respectively, using the methods described in Jungblut and Neilan [48]; and the *sxtA* gene, using the methods described in Ballot et al. [49]. The strains CENA 302 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) and NPLJ-4 (*Microcystis aeruginosa*), known as saxitoxins and microcystin producers, respectively, were included as positive controls.

Analysis of toxins by high performance liquid chromatography

The high performance liquid chromatograph (HPLC) used for analysis of microcystins consisted of three pumps (LC-20AT, LC-20AD, LC-20AD), degasser (20A5-DGU), system for post-column derivatization, oven (CTO-20A), fluorescence detector (RF-10AXL), UV-vis detector with diode array (SPD-M20A), autosampler (SIL-20AHT) controller system for connecting with computer modules (CBM-20A) and LC Solution software for data acquisition and processing (Shimadzu Proeminance).

Approximately 50 mg of each lyophilized sample were added to 75% methanol (10 mL). The solutions were stirred (1 h), and then centrifuged (12,000 x g, 10 min; Thermic Scientific, ST16R). The supernatant was transferred to a beaker and the procedure repeated twice, reducing the extraction time to 30 min (Fastner et al., 1998). The two extractions were combined and dried under warm air and resuspended in 0.5 mL of 20% methanol and frozen (-18°C) until HPLC analysis. For analysis, a C18 column (250 x 4 mm), oven at 40°C and a gradient of water: acetonitrile containing 0.05% each of trifluoroacetic acid were used [50]. The microcystin identification was taken by its absorption spectrum and comparison with a microcystin-LR standard (Abraxis).

RESULTS

Morphological evaluation

All the populations studied showed varied morphology, regarding the cell and trichomes measurements, but they correspond to *Phormidium* group VIII (Komárek and Anagnostidis 2005): trichomes cylindrical with cells always distinctly shorter than wide, shortly attenuated toward ends, and apical cells with thickened outer cell wall.

One morphotype, BETA-1 strain, presented trichomes with subquadratic cells and sheaths facultative, thin, colorless and homogeneous. The trichome width ranged from 5.0 to 6.0 μm wide (Fig. 1A-D, Table 1).

Two morphotypes presented trichomes with discoid cells and sheath firm, thick, colorless, and are also morphologically similar to *Lyngbya*. They can be distinguished based on the trichomes width (Fig. 1, Table 1). The BETA-2 presented trichome width of 10.0-16.6 μm (Fig. 1E-H). The other morphotype, representing two populations for the species (BETA-3 and BETA-4) with discoid cells, can also be distinguished based on the trichomes width, that is wider in BETA-4 (22.0-25.0 μm) than in BETA-3 (16.0-20.0 μm) (Fig. 1I-L, Table 1).

Table 1. Morphological comparison among studied strains. Dimensions (μm) represent full ranges observed. L/W, cell length/cell width ratio.

Species	Strain	Filament width*	Trichome width*	Cell length**	L/W
<i>Phormidium</i> sp.1	BETA-1	6.0-6.5	5.0-6.0	1.5-3.0	0.3-0.6
<i>Phormidium</i> sp.2	BETA-2	13.0-23.0	10.0-16.6	1.0-3.6	0.2-0.3
<i>Phormidium</i> sp.3	BETA-3	22.0-45.0	16.0-20.0	2.0-4.0	0.1-0.2
	BETA-4	28.0-34.0	22.0-25.0	2.0-3.0	0.1-0.2
<i>P. irriguum</i> f. <i>minor</i> ¹	ETS-02	-	3.0-5.0	1.0-2.0	-
<i>P. cf. irriguum</i> ¹	CCALA759	-	9.0-12.0	2.0-3.0	-

* n=30, ** n=150. ¹Sciuto et al. (2012).

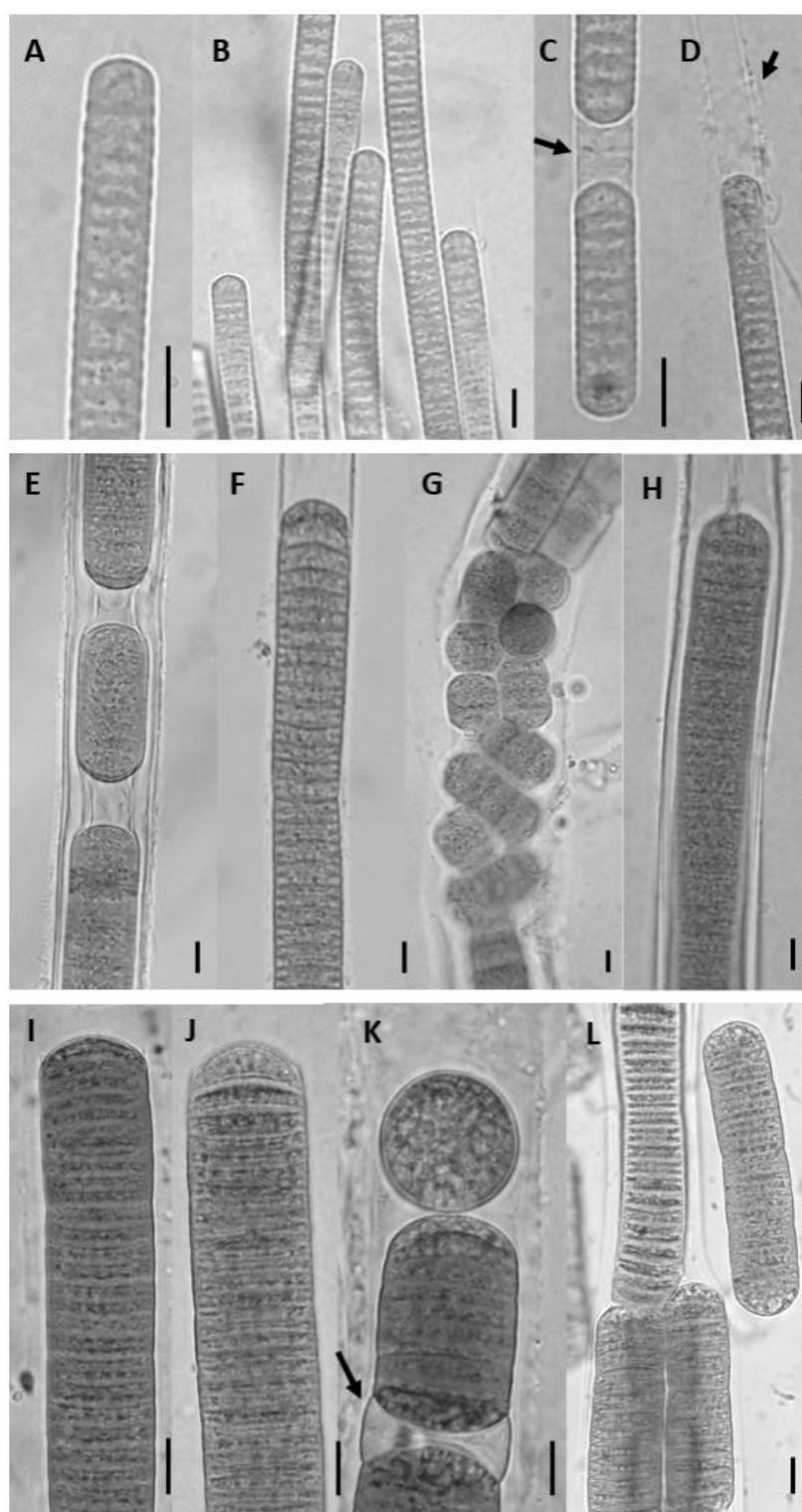


Fig. 1. *Phormidium* sp.1 trichomes (A-D) with formation of necridia (C) (black arrow) and the aspect of the sheath (D). *Phormidium* sp. 2 trichomes (E-H) with hormogonia (E and G). *Phormidium* sp. 3 trichomes (I-L) with formation of necridia and hormogonia (K) (black arrow) and hormogonia growing alongside trichome inside the same sheath (L). Bar: 5μm (A-H), 10 μm (I-L).

Ecological evaluation

The studied strains were found growing attached to natural (BETA-1 BETA-3 and BETA-4) or artificial substrates (BETA-2) in four aquatic habitats from different localities of southeastern Brazil. The BETA-1, BETA-3 and BETA-4 were isolated from small masses on sandy substrate at the margins of artificial water reservoirs, all of them surrounded by pastures. The BETA-2 was found forming masses with filaments entangled with other cyanobacteria and algae on a concrete spillway in an artificial water reservoir also surrounded by pastures.

Molecular analyses and phylogeny

The comparison of 16S rRNA partial sequences of the four studied strains and sequences of GenBank showed similarity above 96% with eight strains (*Lyngbya martensiana* H3b/7, *L. martensiana* H3b/33, *Lyngbya* sp. JW-2010b, *Lyngbya* sp. SAG 36.91, *Phormidium* sp. CENA270, *Phormidium* sp. DVL1003c, *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 and *Phormidium irriguum* f. *minor* ETS-02) and below 94% with *Phormidium ambiguum* IAM M-71, among others cyanobacteria (Table 3).

Analyses of the 16S rRNA sequences showed a clear separation of the group composed by the studied populations and the above mentioned eight strains from GenBank (*Phormidium* clade, Fig. 2). Similarity scores based on the comparison of 16S rRNA gene sequences of the *Phormidium* clade strains with sequences of other genera, such as *Limnoraphis*, *Lyngbya*, *Microseira*, *Moorea*, *Okeania*, *Oscillatoria* and *Lyngbya*, were lower than 93%.

Table 3. The partial 16S rRNA gene sequence similarity of *Phormidium* clade strains.

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Phormidium</i> sp.1 (BETA-1)	-												
2. <i>Phormidium</i> sp.2 (BETA-2)	96.4	-											
3. <i>Phormidium</i> sp.3 (BETA-3)	96.1	97.4	-										
4. <i>Phormidium</i> sp.3 (BETA-4)	96.1	97.7	99.6	-									
5. <i>L. martensiana</i> H3b/7 (JN854142)	96.1	98.3	97.6	97.7	-								
6. <i>L. martensiana</i> H3b/33 (JN854141)	96.3	98.2	97.3	97.5	99.4	-							
7. <i>Lyngbya</i> sp. JW2010b (HQ419206)	96.5	98.7	97.8	97.8	98.4	98.0	-						
8. <i>Lyngbya</i> sp. SAG 36.91 (KP178669)	96.5	98.7	98.0	98.0	98.8	98.3	99.9	-					
9. <i>P. irriguum</i> f. <i>minor</i> ETS-02 (FN813342)	96.3	98.3	97.7	97.5	98.2	98.1	97.8	98.0	-				
10. <i>Phormidium</i> sp. CENA-270 (JQ771627)	95.9	97.3	97.7	97.8	97.6	97.8	97.3	97.5	97.1	-			
11. <i>P. cf. irriguum</i> CCALE 759 (FN813343)	97.1	97.5	97.9	97.8	97.8	97.9	97.2	97.5	97.6	97.7	-		
12. <i>Phormidium</i> sp. DVL1003c (JQ771628)	97.2	97.7	97.0	97.5	97.9	98.1	96.9	97.1	97.2	98.0	99.5	-	
13. <i>P. ambiguum</i> IAM M-71 (AB003167)	93.0	93.2	93.4	93.5	93.2	93.2	93.8	94.0	93.3	93.6	93.6	94.1	-

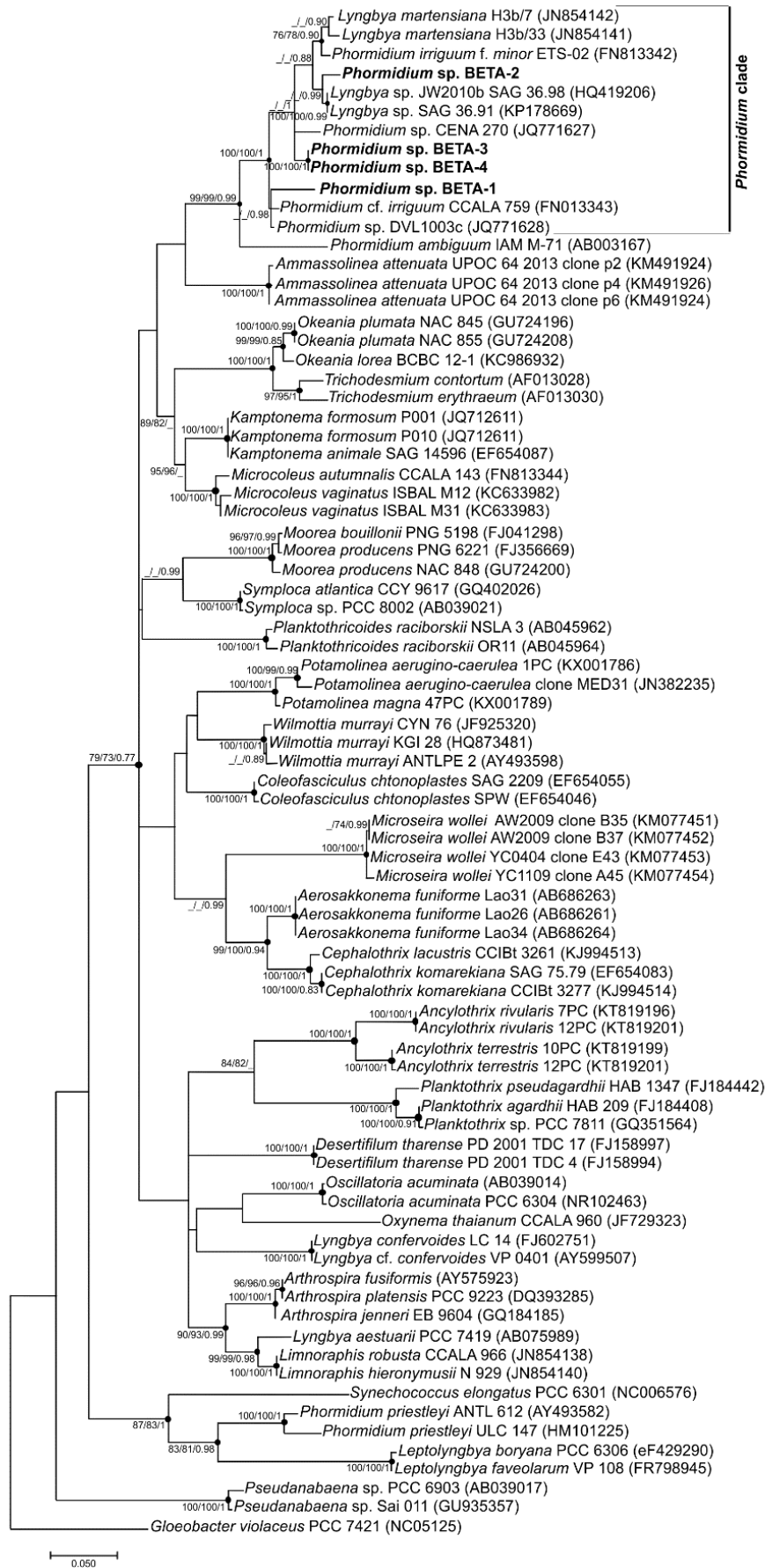


Fig.2. Bayesian inference tree based on the 16S rRNA gene sequences of oscillatoriacean taxa. The clade comprising *Phormidium* consisting of Brazilian strains (in bold) and strains from GenBank is highlighted. Bootstrap values (>70%) and probabilities (> 0.75) obtained from NJ, ML and BI, respectively, are displayed at the relevant nodes (black dots). GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar= 0.050 substitutions per nucleotide position.

Phylogenetic analyses showed a close phylogenetic relationship among members of *Phormidium* clade with *Phormidium ambiguum* IAM-M 71 (AB003167), highly supported by bootstrap and posterior probabilities (99-ML, 99-NJ and 1-BI, respectively; Fig. 2), and the divergences between strains of these two groups were greater than 5%.

The *Phormidium* clade was highly supported by bootstrap and posterior probabilities (100-ML, 100-NJ and 1-BI, Fig. 2) and the similarity scores based on 16S rRNA gene sequences within this group were from 95.9% to 99.9% (Table 3). The BETA-3 and BETA-4 strains formed an internal clade highly supported by the three methods performed and the similarity scores of 16S rRNA gene sequences between them were 99.6% (Table 3).

The *rpoC1* gene of the studied strains were also partially sequenced (BETA-1: 615 bp, BETA-2: 678 bp, BETA-3: 718 bp, BETA-4: 634 bp) and the comparison among these sequences with two strains of *Phormidium* clade (*Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 and *Phormidium irriguum* f. *minor* ETS-02) and with *Phormidium ambiguum* IAM M-71 ranged from 88.2 to 95.5% (Table S1).

The phylogenetic analyses based on *rpoC1* gene were performed with few strains, because there are very few sequences of these gene available in GenBank. The phylogenetic analyses showed the close relationship among studied strains and the three other *Phormidium* strains, which formed a clade with high support for the three methods evaluated (100%-ML, 100%-NJ and 1-BI, Fig. 3).

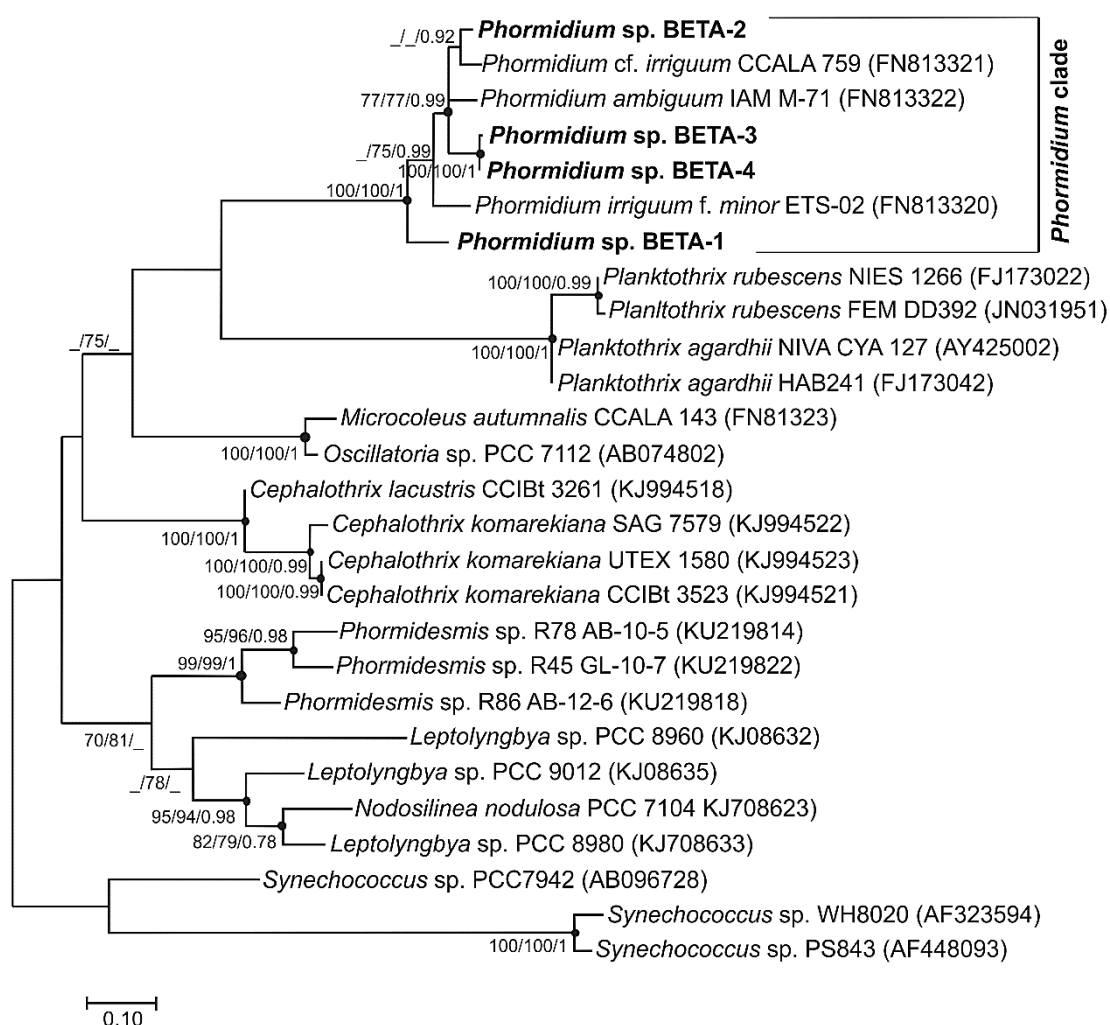


Fig. 3. ML tree based on the *rpoC1* gene sequences of oscillatoriacean and synechococcalean taxa. The clade comprising *Phormidium* consisting of Brazilian strains (in bold) and strains from GenBank is highlighted. Bootstrap values (>70%) and probabilities (> 0.75) obtained from NJ, ML and BI, respectively, are displayed at the relevant nodes (black dots). GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar= 0.1 substitutions per nucleotide position.

The phylogenetic analyses based on concatenated analyses (16S rRNA and *rpoC1* genes) showed the BETA-1 strain firstly diverged in *Phormidium* clade, as observed in analyses using molecular markers independently. Moreover, the strain *Phormidium ambiguum* IAM M-71 was placed inside the *Phormidium* clade, with high support (100%-ML, 100%-NJ and 1-BI, Fig. 4).

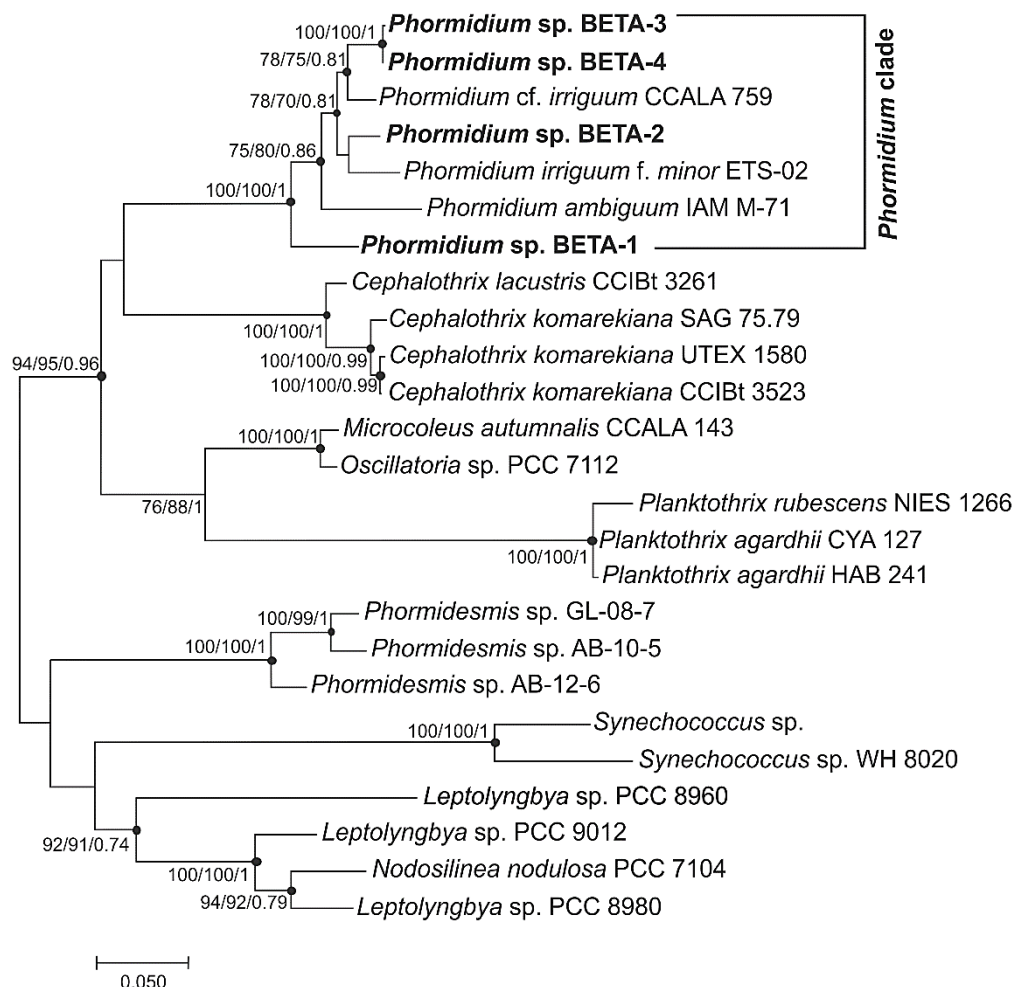


Fig. 4. ML tree based on a multiple alignment of 16S rRNA+*rpoC1* gene sequences of oscillatoriacean and synechococcalean taxa. The clade comprising *Phormidium* consisting of Brazilian strains (in bold) and strains from GenBank is highlighted. Bootstrap values (>70%) and probabilities (> 0.75) obtained from NJ, ML and BI, respectively, are displayed at the relevant nodes (black dots). GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar= 0.050 substitutions per nucleotide position.

The 16S-23S ITS of all studied strains were sequenced, but, unfortunately, only four of the eight closest strains from GenBank (*Lyngbya martensiana* H3b/7, *L. martensiana* H3b/33, *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 and *P. irriguum* f. *minor* ETS-02) had this molecular

marker partially sequenced and could be compared to the studied strains. The nucleotide number of the 16S-23S ITS of the studied strains showed great variation (from 501 to 512). All strains with the 16S-23S ITS complete sequence presented the isoleucine and alanine tRNA genes, the incomplete sequence of the strain H3b/7 also contains the isoleucine tRNA gene (Table 4).

Table 4. Lengths of 16S-23S ITS regions (number of nucleotides) in the analysed *Phormidium* clade strains. *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 (FN813340); *Phormidium irriguum* f. *minor* ETS-02 (FN813339).

Strain	Complete ITS	Leader	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	V2	tRNA ^{Ala} gene	Pre-Box-B spacer	Box-B helix	Post-Box-B spacer	Box-A	D4	V3, spacer and D5
BETA-1	501	5	51	38	21	74	18	76	86	38	18	12	7	57
BETA-2	510	5	56	39	20	74	20	76	87	35	18	12	7	61
BETA-3	512	7	63	26	19	74	17	76	96	35	18	12	7	62
BETA-4	511	6	63	26	19	74	17	76	96	35	18	12	7	62
CCALA 759*	489	6	64	29	41	74	16	76	93	35	18	12	7	46*
ETS-02*	479	5	63	26	19	74	24	76	74	36	18	12	7	45*
H3b/7*	194	6	64	31	20	73*	-	-	-	-	-	-	-	-
H3b/33*	82	5	64	13*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* incomplete sequence

The basal sequences of the D1-D1' and Box-B regions were conserved and the secondary structure has been determined (Figs. 5-7). Among all the strains, only BETA-3 and BETA-4 presented the same secondary structure for the three regions. The D1-D1' structures were similar among strains BETA-2, ETS-02, CCALA 759 and H3b/33. The Box-B structures of CCALA 759 and BETA-2 were the same, while the V3 structure showed greater variation among all the strains (Fig. 7).

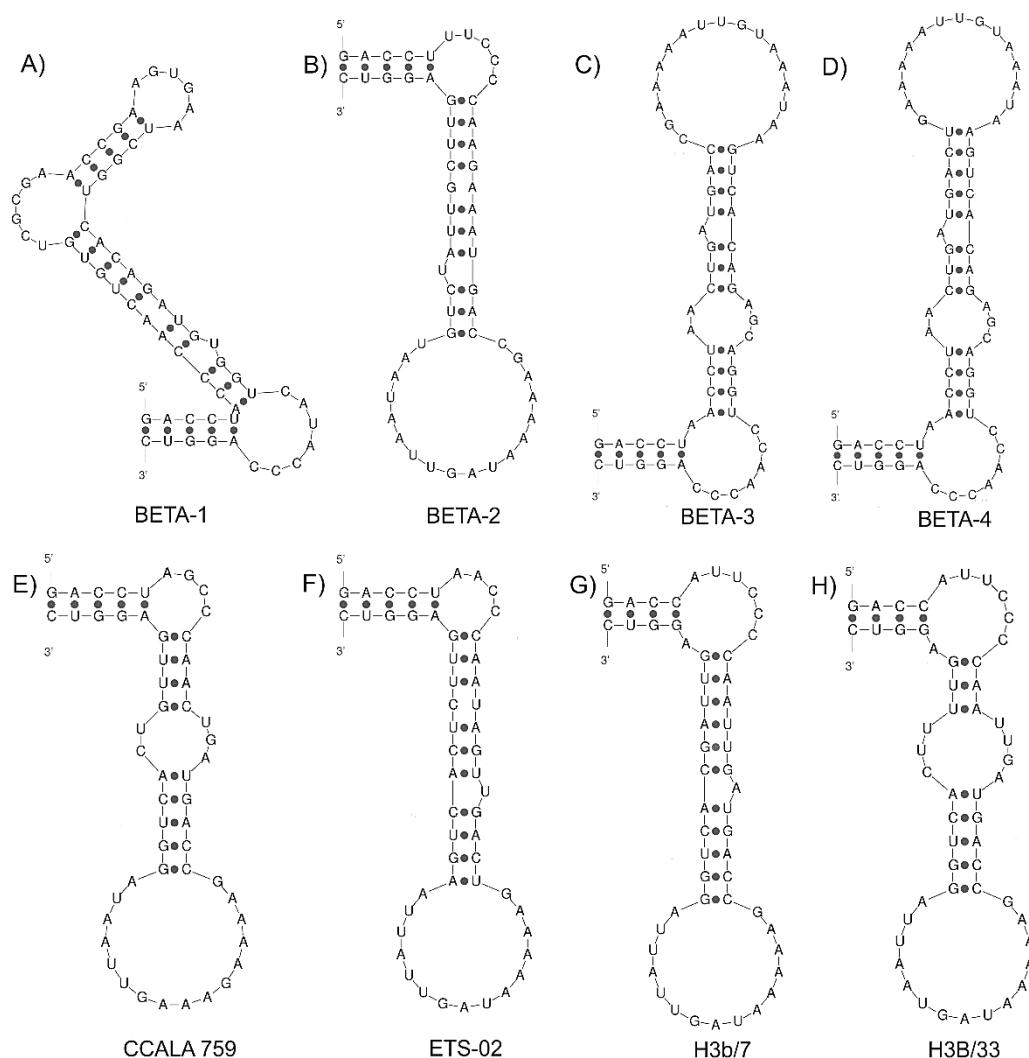


Fig. 5A-H. Secondary structure of conserved region D1-D1' helix of 16S-23S ITS of *Phormidium* strains.

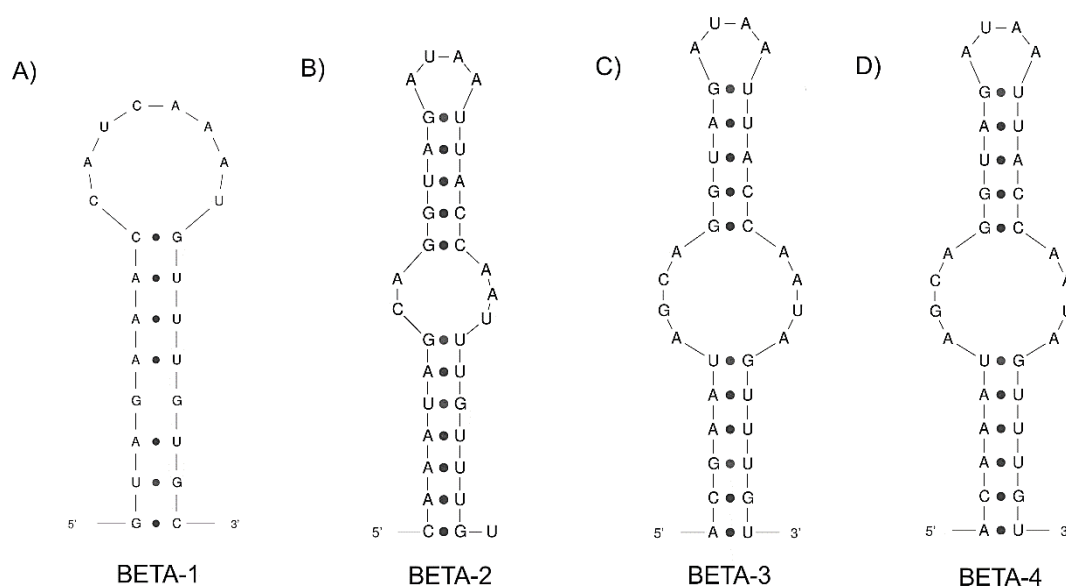


Fig. 7A-D. Secondary structure of conserved region V3 helice of 16S-23S ITS of *Phormidium* strains.

The presence of the *mcyE/ndaF* was confirmed by the amplification of a 464 pb region of this gene in the strain BETA-2, only. The amplicon sequence showed high identity (96%) with *Phormidium* sp. DVL1103c (AY817168), *Phormidium* sp. DVL 1003c (AY817167) and *Phormidium* sp. LS803 (AY817166) (Table S2). The presence of the *sxtA* gene was not detected in any of the strains.

The phylogenetic analyses based on the AMT domain (*mcyE* gene) gene were performed with few sequences of strains available in GenBank. The phylogenetic analyses showed the close relationship among BETA-2 and the three other *Phormidium* strains, which formed a clade with high support for the three methods evaluated (99%-ML, 100%-NJ and 0.99-BI, Fig. 8).

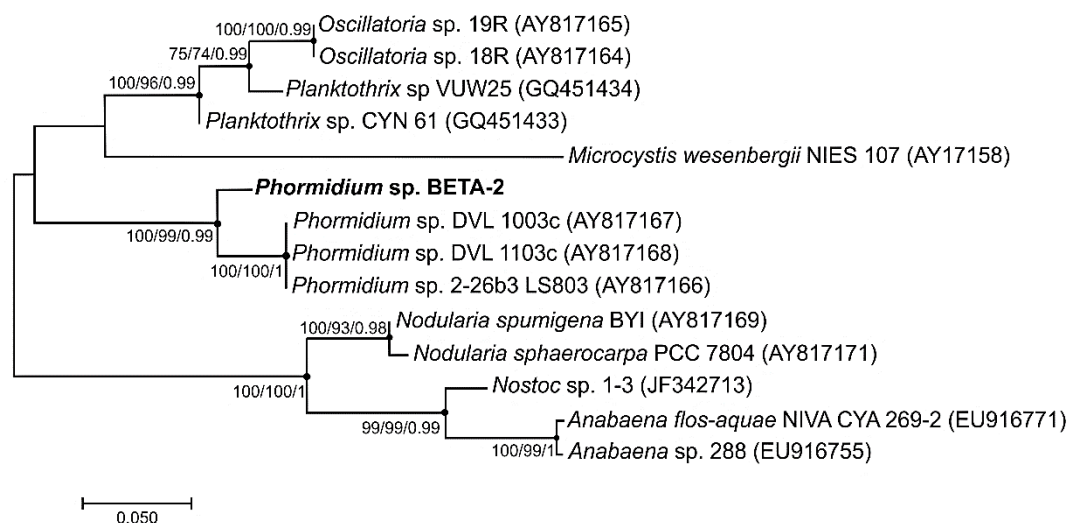


Fig. 8. ML tree based on AMT genes of the microcystin and nodularin synthetases of cyanobacterial taxa. The *Phormidium* sp.2 is highlighted in bold. Bootstrap values (>70%) and probabilities (> 0.75) obtained from NJ, ML and BI, respectively, are displayed at the relevant nodes (black dots). GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar= 0.050 substitutions per nucleotide position.

Toxin detection

Analysis of high-performance liquid chromatography (HPLC) detected the presence of microcystin in strain BETA-2, with concentrations of $19.82 \mu\text{g.L}^{-1}$ dry weight. No microcystins were detected for the strains BETA-1, BETA-3 and BETA-4. The retention time of the peak occurred at 28 minutes and 44 seconds (Fig. 9).

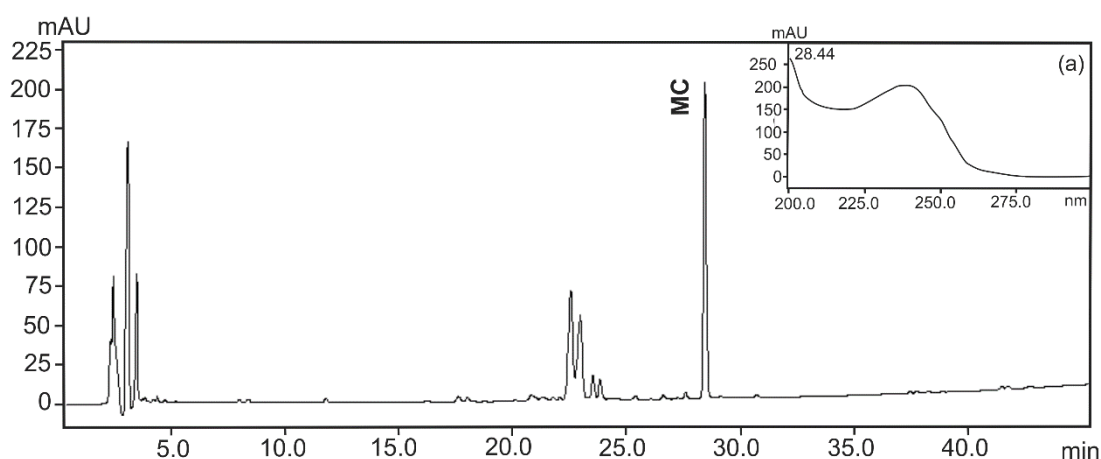


Fig. 9. Microcystin analysis chromatogram of *Phormidium* sp.2 through high-performance liquid chromatography (HPLC) showing a peak related to the presence of the toxin (MC) at 28.44 minutes of retention time. Microcystin characteristic absorption spectra at 200-300 nm (a).

DISCUSSION

The species separation of the studied strains was supported by the 16S rRNA identities and also by the secondary structures of the three domains of the 16S-23S ITS. According to Kim et al. [55], a percentage >98.65% of the 16S rRNA sequence similarity between two species can be used to differentiate them, consequently, three new different species could be recognized and described: *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2 and *Phormidium* sp.3. The phylogenetic analyses grouped the three studied *Phormidium* species along with the reference strain *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759, as proposed by Sciuto et al. [31], and the strains *Phormidium irriguum* f. *minor* ETS-02, *Phormidium* sp. DVL1003c and *Phormidium* sp. CENA270 in a clade with high support (100% - ML, 100% - NJ, 1 - BI), confirming the placement of the studied strains as new components of the widespread genus *Phormidium*. Moreover, the genetic identity among *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2, *Phormidium* sp.3 and the type species CCALA 759 ranged from 97.1 to 97.9%.

Besides the *Phormidium* strains CCALA759, ETS-02, CENA270 and DVL1003c, the clade formed through the phylogenetic analysis of the 16S rRNA grouped four strains classified as *Lyngbya*. According to Komárek et al. [53], the strains of *Lyngbya martensiana* H3b/7 and H3b/33 correspond morphologically to the traditional *Lyngbya* species, however they are not in the same clade of the marine type species for the genus. *L. confervoides*, suggesting them as a separate entity from *Lyngbya* and, probably, a member of the “Eulyngbya” group composed by freshwater strains [55]. On the other hand, the strain *Lyngbya* sp. JW-2010b was analyzed by Komárek [54] and included as a component of the *Phormidium* clade, according to the 16S rRNA phylogenetic analysis.

The *Phormidium ambiguum* IAM M-71 strain is sister to the *Phormidium* clade (99% - ML, 99% - NJ, 0.99 - BI), and its identity with the strains of the clade was low (< 94.1), indicating it as a genus apart from *Phormidium*. Sciuto et al. [31] also analyzed the strain IAM M-71 along with the CCALA 759 and found similar results, suggesting future studies would clarify the taxonomic position of this strain regarding the *Phormidium* group.

The *rpoC1* phylogenetic analysis corroborate the 16S rRNA findings, since the studied strains were grouped with CCALA 759 reference strain forming a clade with high support (100% - ML, 100% - NJ, 1 - BI). However, in this analysis, the *Phormidium ambiguum* IAM M-71 was placed inside the *Phormidium* clade. The genetic identity among the strains ranged from 88.3 to 99.8%, with the lowest values (88.3-89.7%) corresponding to the *Phormidium* sp.1. The concatenated analysis reiterated the *rpoC1* results grouping the studied strains along with the type strain CCALA 759 and other *Phormidium* strains, including the IAM M-71, suggesting it might be a member of *Phormidium*.

The *Phormidium* sp.1 strain presented thinner trichomes (5.0-6.0 μm) and higher cell length/width ratios (0.3-0.6) than the two other studied species. The phylogenetic analysis showed that it diverged first and presented the lowest identities for both 16S rRNA and *rpoC1*

markers, when compared to the other strains in *Phormidium* clade. The 16S-23S ITS secondary structures, D1-D1', Box-B and V3, were also different comparing with *Phormidium* sp.2. and sp.3 and strains in *Phormidium* clade.

The 16S rRNA and *rpoC1* phylogenetic analysis showed that *Phormidium* sp.2 strain diverged more recently in *Phormidium* clade. The 16S rRNA identities of *Phormidium* sp.2 and the strains *Lyngbya* sp. JW2010b and *Lyngbya* sp. SAG 36.91 were both 98.7% suggesting that they might pertain to the same species, although the internal clade with these strains was not supported by the three methods of the phylogenetic analysis (<70% for ML and NJ and 0.99 for BI). The presence of *Lyngbya* strains in this clade is questionable, since several sequences available on GenBank need revision regarding its morphological identification and neither of the studies using these strains provided morphological data. The secondary structures of D1-D1' and Box-B of the *Phormidium* sp.2 were more closely related to those of the CCALA 759 and ETS-02 than to the *Phormidium* sp.1 and sp.3; also, the V3 structure was distinct among the three studied species, confirming *Phormidium* sp.2 as a new species in *Phormidium* clade.

The *Phormidium* sp.3 strains formed an internal clade with high support (100% – ML, 100% – NJ, 1 – BI) and its 16S rRNA identity was 99.6%, which places them as different populations of the same species, despite the differences in trichomes measurements. The same result was found for the *rpoC1* marker (100% – ML, 100% – NJ, 1 – BI; 99.8% identity). Moreover, the secondary structures of the D1-D1', Box-B and V3 domains were the same for the two populations confirming the results for 16S rRNA and *rpoC1* markers. When comparing to *Phormidium* sp.1 and sp.2, *Phormidium* sp.3 presented larger filaments (22.0-45.0 µm) and trichomes (16.0-25.0 µm), and lower cell length/width ratios (0.1-0.2). In addition, the strain BETA-4 had slightly wider trichomes (16.0-20.0 µm) than strain BETA-3 (22.0-25.0 µm), but this difference was not reflected on its phylogenetic status. *Phormidium* sp.3 are larger than any

other taxa in *Phormidium* group VIII [16] and the presence of a thick sheath resembles those members of *Lyngbya* and *Blennothrix* genera.

The increase in the use of molecular markers (16S rRNA, *rpoC1*, *rbcL*, ITS 16S-23S) in the last years has revealed the fragility of using morphological features to taxonomic delimitation and to reconstruct the evolutionary history of Cyanobacteria. Conversely, the use of conserved and adequate gene sequences is providing a better understanding on the origin of morphological characteristics and its persistence and development along the evolution of the group [56,57]. The simple morphology of *Phormidium* congregates a great number of strains, although the use of the 16S rRNA gene has been demonstrating it is not an appropriate marker to reconstruct phylogenetic relationships, since several cryptic taxa have been described recently.

The *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2 and *Phormidium* sp.3 strains were tested for the presence of genes related to toxins production, *mcyE* and *sxtA*, and only *Phormidium* sp.2 strain was positive for *mcyE* gene. The phylogenetic analysis based on the AMT domain (*mcyE*) formed three supported clades: *Oscillatoria/Planktothrix* clade (100% - ML, 100% - NJ, 1 – BI), *Phormidium* clade (100% - ML, 96% - NJ, 0.99 – BI) and Nostocales clade (100% - ML, 99% - NJ, 0.99 – BI). The *Phormidium* sp.2 was grouped with other *Phormidium* strains, which produce microcystin-LR as benthic components in water reservoirs in Southern California [13]. According to Jungblut and Neilan [48], the genera clustering observed through the phylogenetic analysis of the AMT domain indicates its gene is an ancestral relict that may have been lost in non-toxic strains. Therefore, the grouping of the strain *Phormidium* sp.2 with other toxic *Phormidium* strains from a different geographic region reinforces this hypothesis [14]. The AMT domains are conserved regions widespread in primary and secondary metabolisms in microorganisms, meaning they are adequate markers to infer phylogenetic relationships [48].

The *Phormidium* sp.1, *Phormidium* sp.2 and *Phormidium* sp.3 strains were also tested for the effective production of toxins and, confirming the previous results for the presence/absence of the genes, only *Phormidium* sp.2 was confirmed as a toxin producer. The HPLC analysis showed a peak at the retention time of 28.44 minutes and an absorption spectrum between 200-300 nm, which characterizes the presence of a microcystin analogue. According to Pearson et al. [54], more than 80 microcystin analogues were already registered in the literature. The microcystin observed in this study do not correspond to the microcystin-LR used as standard in the analysis, raising the possibility to be an undocumented analogue, which will be analyzed in further investigations.

The description of new species for the genus *Phormidium* enhances the knowledge on this polyphyletic and complex genus, towards a more robust classification system that reflects the evolutionary history of the group. Since it is a genus occurring in several countries around the globe, for whose toxin production was already registered, it is extremely urgent to know and to monitor this capacity in ecosystems where *Phormidium* species occur. The record of new toxic strains and the description of its taxonomical and ecological characteristics also provide the application of safety precautions on water recreational uses and consumption.

DESCRIPTION OF NEW SPECIES

***Phormidium* sp.1** Buch, Martins et Branco *sp. nov.*

Thallus mucilaginous, microscopic, attached to the substrate. Filaments entangled, 6.0-6.5 µm wide. Sheaths thin, colorless. Trichomes isopolar, cylindrical along their whole length, not constricted or slightly constricted at the granulated cross walls, 5.0-6.0 µm wide. Cells subquadratic, 1.5-3.0 µm long, width/length cell ratio 0.25-0.6. Cell content blue-green. Apical cell rounded, without calyptra, sometimes with thickened outer cell wall. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: (in preparation)

Type locality: small lagoon, municipality of Nova Castilho, São Paulo State, Brazil; 20°45'38"S/50°20'38"W.

Holotype: formaldehyde-fixed sample of strain BETA-1 deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil, voucher number SJRP (in preparation).

16S rRNA gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

rpoC1 gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

***Phormidium* sp.2** Buch, Martins et Branco *sp. nov.*

Thallus gelatinous, mucilaginous, microscopic, attached to the substrate. Filaments entangled among other cyanobacteria, sometimes containing 1-2 trichomes, 13.0-23.0 µm wide. Sheaths firm, thick, colorless, not lamellated. Trichomes isopolar, cylindrical along their whole length, not constricted or slightly constricted at the granulated cross walls, 10.0-16.6 µm wide. Cells distinctively shorter than wide, discoid, 1.0-3.6 µm long, width/length cell ratio 0.08-0.3. Cell content blue-green, granulated. Apical cell rounded, without calyptra, sometimes with thickened outer cell wall. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: (in preparation)

Type locality: Santa Fé do Sul municipal reservoir, municipality of Santa Fé do Sul, São Paulo State, Brazil; 20°10'34"S, 50°56'59"W.

Holotype: formaldehyde-fixed sample of strain BETA-2 deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil, voucher number SJRP (in preparation).

16S rRNA gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

rpoC1 gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

***Phormidium* sp.3** Buch, Martins et Branco *sp. nov.*

Thallus gelatinous, mucilaginous, microscopic, attached to the substrate. Filaments entangled, containing 1-2 trichomes, 22.0-45.0 µm wide. Sheaths firm, thick, colorless, not lamellated. Trichomes isopolar, cylindrical along their whole length, not constricted or slightly constricted at the granulated cross walls, 16.0-25.0 µm wide. Cells distinctively shorter than wide, discoid, 2.0-4.0 µm long, width/length cell ratio 0.1-0.2. Cell content blue-green, granulated. Apical cell rounded, without calyptra, sometimes with thickened outer cell wall. Reproduction by disintegration of trichomes into hormogonia by necridic cells.

Etymology: (in preparation)

Type locality: water reservoir, municipality of Fátima Paulista, São Paulo State, Brazil; 20°06'05"S, 50°27'38"W.

Holotype: formaldehyde-fixed sample of strain BETA-3 deposited in Herbarium SJRP (IBILCE/UNESP), Brazil, voucher number SJRP (in preparation).

16S rRNA gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

rpoC1 gene sequence: GenBank access number: (in preparation)

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2010/09686-4; 2012/19468-0; 2013/08207-3; 2014/08200-1) for the financial support to this study and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001” for financial support.

REFERENCES

- [1] K. Comte, M. Šabacká, A. Carré-Mlouka, J. Elster, J. Komárek, Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach, FEMS Microbiol. Ecol. 59 (2007) 366–376. doi:10.1111/j.1574-

6941.2006.00257.x.

- [2] V. Loza, E. Perona, J. Carmona, P. Mateo, Phenotypic and genotypic characteristics of *Phormidium*-like cyanobacteria inhabiting microbial mats are correlated with the trophic status of running waters, *Eur. J. Phycol.* 48 (2013) 235–252. doi:10.1080/09670262.2013.799715.
- [3] K.A. Brasell, M.W. Heath, K.G. Ryan, S.A. Wood, Successional Change in Microbial Communities of Benthic *Phormidium*-Dominated Biofilms, *Microb. Ecol.* 69 (2014) 254–266. doi:10.1007/s00248-014-0538-7.
- [4] P. Bravakos, G. Kotoulas, K. Skaraki, A. Pantazidou, A. Economou-Amilli, A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of Cyanobacteria from thermal springs of Greece, *Mol. Phylogenet. Evol.* 98 (2016) 147–160. doi:10.1016/j.ympev.2016.02.009.
- [5] M. Gugger, S. Lenoir, C. Berger, A. Ledreux, J.C. Druart, J.F. Humbert, C. Guette, C. Bernard, First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis, *Toxicon.* 45 (2005) 919–928. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.031.
- [6] S. Cadel-Six, I. Iteman, C. Peyraud-Thomas, S. Mann, O. Ploux, A. Méjean, Identification of a polyketide synthase coding sequence specific for anatoxin-a-producing *Oscillatoria* cyanobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 4909–4912. doi:10.1128/AEM.02478-08.
- [7] S.A. Wood, A.I. Selwood, A. Rueckert, P.T. Holland, J.R. Milne, K.F. Smith, B. Smits, L.F. Watts, C.S. Cary, First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand, *Toxicon.* 50 (2007) 292–301. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.025.
- [8] E.J. Faassen, L. Harkema, L. Begeman, M. Lurling, First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands, *Toxicon.* 60 (2012) 378–384. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.335.
- [9] T.G. McAllister, S.A. Wood, I. Hawes, The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity, *Harmful Algae.* 55 (2016) 282–294. doi:10.1016/j.hal.2016.04.002.

- [10] H.L.F. Borges, L.H.Z. Branco, M.D. Martins, C.S. Lima, P.T. Barbosa, G. a. S.T. Lira, M.C. Bittencourt-Oliveira, R.J.R. Molica, Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil, *Harmful Algae*. 43 (2015) 46–57. doi:10.1016/j.hal.2015.01.003.
- [11] Z. A. Mohamed, H.M. El-Sharouny, W.S.M. Ali, Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt, *Toxicon*. 47 (2006) 584–590. doi:10.1016/j.toxicon.2006.01.029.
- [12] A.D. Jungblut, S.J. Hoeger, D. Mountfort, B.C. Hitzfeld, D.R. Dietrich, B. a. Neilan, Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community, *Toxicon*. 47 (2006) 271–278. doi:10.1016/j.toxicon.2005.11.002.
- [13] G. Izaguirre, A.D. Jungblut, B.A. Neilan, Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California, *Water Res.* 41 (2007) 492–498. doi:10.1016/j.watres.2006.10.012.
- [14] A. Rantala, D.P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, T. Börner, K. Sivonen, Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 568–73. doi:10.1073/pnas.0304489101.
- [15] R. Kurmayer, K. Sivonen, A. Wilmotte, N. Salmaso, Molecular tools for the detection and quantification of toxigenic cyanobacteria. John Wiley & Sons, USA, 2017.
- [16] J. Komárek, K. Anagnostidis, *Cyanoprokaryota -2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales*, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 2005.
- [17] K. Palinska, D. Bernd, H. Kamal, L. Maria, A taxonomic study on *Phormidium* – group (cyanobacteria) based on morphology , pigments , RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment, *Fottea*. 11 (2011) 41–55.
- [18] J. Komárek, S. Turicchia, S. Ventura, J. Komárková, Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize: 2. Diversity of oscillatorialean genera, *Nov. Hedwigia*. 89 (2009) 165–200. doi:10.1127/0029-5035/2009/0089-0165.
- [19] O. Strunecký, J. Elster, J. Komárek, Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium “*Phormidium*” *murrayi*= *Wilmottia murrayi*, *Fottea*. 11 (2011) 57–71.
- [20] T. Chatchawan, J. Komárek, O. Strunecký, J. Šmarda, Y. Peerapornpisal, *Oxynema*, a

- new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta), Cryptogam. Algal. 33 (2012) 41–59. doi:10.7872/crya.v33.iss1.2011.041.
- [21] D. Casamatta, D. Stanić, M. Gantar, L.L. Richardson, Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease, Phycologia. 51 (2012) 489–499. doi:10.2216/11-10.1.
- [22] O. Strunecky, J. Komárek, J. Šmarda, *Kamptonema* (Microcoleaceae, Cyanobacteria), a new genus derived from the polyphyletic *Phormidium* on the basis of combined molecular and cytomorphological markers, Preslia. 86 (2014) 193–207.
- [23] P. Hašler, P. Dvořák, A. Pouličková, D.A. Casamatta, A novel genus *Ammassolinea* gen. nov. (Cyanobacteria) isolated from sub-tropical epipelagic habitats, Fottea. 14 (2014) 241–248. doi:10.5507/fot.2014.018.
- [24] J. Glowacka, M. Szeffel-Markowska, M. Waleron, E. Lojkowska, K. Waleron, Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies, Acta Biochim. Pol. 58 (2011) 321–333.
- [25] M.D. Martins, J. Rigonato, L.H.Z. Branco, S.R. Taboga, Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66 (2016) 2396–2405. doi:10.1099/ijsem.0.001044.
- [26] M.D. Martins, L.H.Z. Branco, *Potamolinea* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66 (2016) 3632–3641. doi:10.1099/ijsem.0.001243.
- [27] B. Buch, M.D. Martins, L.H.Z. Branco, A widespread cyanobacterium supported by polyphasic approach: proposition of *Koinonema pervagatum* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales)1, J. Phycol. 53 (2017) 1097–1105. doi:10.1111/jpy.12568.
- [28] J. Komárek, A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications, Eur. J. Phycol. 51 (2016) 346–353. doi:10.1080/09670262.2016.1163738.
- [29] K. Sciuto, C. Andreoli, N. Rascio, N. La Rocca, I. Moro, Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria), Cladistics. 28 (2012) 357–374. doi:10.1111/j.1096-0031.2011.00386.x.
- [30] J. Komárek, J. Kaštovský, J. Mareš, J.R. Johansen, Taxonomic classification of

- cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach, Preslia. (2014) 295–335.
- [31] N. Engene, E.C. Rottacker, J. Kaštovský, T. Byrum, H. Choi, M.H. Ellisman, J. Komárek, W.H. Gerwick, *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62 (2012) 1171–1178. doi:10.1099/ijms.0.033761-0.
 - [32] I. Iteman, R. Rippka, N.T. De Marsac, M. Herdman, Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria, Microbiology. 146 (2000) 1275–1286. doi:10.1099/00221287-146-6-1275.
 - [33] J.R. Johansen, L. Kovačik, D.A. Casamatta, K. Fučíková, J. Kaštovský, 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), Nov. Hedwigia. 92 (2011) 283–302. doi:10.1127/0029-5035/2011/0092-0283.
 - [34] P.-S. Seo, A. Yokota, The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, gyrB, rpoC1 and rpoD1 gene sequences., J. Gen. Appl. Microbiol. 49 (2003) 191–203. doi:10.2323/jgam.49.191.
 - [35] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria, J. Gen. Microbiol. 111 (1979) 1–61.
 - [36] B. Thiers, Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff, Bot. Gard. Virtual Herb. (2018). <http://sweetgum.nygb.org/ih/> (accessed October 1, 2018).
 - [37] A. Taton, S. Grubisic, E. Brambilla, R. De Wit, A. Wilmotte, Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach, Society. 69 (2003) 5157–5169. doi:10.1128/AEM.69.9.5157.
 - [38] B.A. Neilan, D. Jacobs, T. Del Dot, L.L. Blackall, P.R. Hawkins, P.T. Cox, A.E. Goodman, rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*., Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (1997) 693–697.

doi:10.1099/00207713-47-3-693.

- [39] B. Ewing, P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities, *Genome Res.* 8 (1998) 186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186.
- [40] B. Ewing, L. Hillier, M.C. Wendl, P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment, *Genome Res.* 8 (1998) 175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175.
- [41] D. Gordon, C. Abajian, P. Green, G.E.T. Al, Consed: a graphical tool for sequence finishing, *Genome Res.* 8 (1998) 195–202.
- [42] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673.
- [43] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- [44] J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist, MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics.* 17 (2001) 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- [45] T. Hall, BioEdit: an important software for molecular biology, *GERF Bull. Biosci.* 2 (2011) 60–61. doi:10.1002/prot.24632.
- [46] T.M. Lowe, S.R. Eddy, TRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence, *Nucleic Acids Res.* 25 (1996) 955–964. doi:10.1093/nar/25.5.0955.
- [47] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595.
- [48] A.D. Jungblut, B. A. Neilan, Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria, *Arch. Microbiol.* 185 (2006) 107–114. doi:10.1007/s00203-005-0073-5.
- [49] A. Ballot, J. Fastner, C. Wiedner, Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany, *Appl. Environ.*

- Microbiol. 76 (2010) 1173–1180. doi:10.1128/AEM.02285-09.
- [50] L.A. Lawton, C. Edwards, G.A. Codd, Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters, *Analyst*. 119 (1994) 1525. doi:10.1039/an9941901525.
- [51] J. Komárek, E. Zapomělová, J. Šmarda, J. Kopecký, E. Rejmánková, J. Woodhouse, B.A. Neilan, J. Komárková, Polyphasic evaluation of *Limnoraphis robusta*, a water-bloom forming cyanobacterium from Lake Atitlan, Guatemala, with a description of *Limnoraphis* gen. nov., *Fottea*. 13 (2013) 39–52. doi:10.5507/fot.2013.004.
- [52] J. Komárek, Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system, *Hydrobiologia*. 811 (2018) 7–17. doi:10.1007/s10750-017-3379-9.
- [53] M. Kim, H.S. Oh, S.C. Park, J. Chun, Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (2014) 346–351. doi:10.1099/ijls.0.059774-0.
- [54] L.A. Pearson, E. Dittmann, R. Mazmouz, S.E. Ongley, P.M. D’Agostino, B.A. Neilan, The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria, *Harmful Algae*. 54 (2016) 98–111. doi:10.1016/j.hal.2015.11.002.
- [55] J. Komárek, Delimitation of the family Oscillatoriaceae (Cyanobacteria) according to the modern polyphasic approach (introductory review). *Brazilian Journal of Botany*. 41(2017). doi: 10.1007/s40415-017-0415-y
- [56] J. S. Uyeda, L. J. Harmon, C. E. Blank, A comprehensive study of cyanobacterial morphological and ecological evolutionary dynamics through deep geologic time. *PLoS ONE*. 11 (2016) 1-32. doi: 10.1371/journal.pone.0162539.
- [57] B. E. Schirrmeister, A. Antonelli, H. C. Bagheri, The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology*. 11 (2011) 1-21. doi: 10.1186/1471-2148-11-45.

CAPÍTULO VI – Conclusões e considerações gerais

Os objetivos propostos para o estudo foram atingidos e as hipóteses formuladas foram confirmadas.

Das 41 populações estudadas, 28 (68%) representam novos táxons para a ciência, sendo 19 populações relacionadas a gêneros novos. Essas populações são relacionadas a táxons reconhecidamente polifiléticos, como são os casos de *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Phormidium* e *Calothrix*, a partir dos quais novos táxons crípticos têm sido descritos nos últimos anos. Neste trabalho, algumas das populações relacionadas a prováveis novos táxons foram alocadas em gêneros já descritos, como *Limnothrix*, *Leptolyngbya* e *Calothrix*, entretanto, serão realocadas em novos gêneros a serem descritos para publicação. Outras populações permaneceram sem identificação no nível genérico, identificadas apenas como Oscillatoriaceae, e também serão realocadas em novos gêneros a serem descritos em publicações posteriores. As novas espécies para o gênero *Microcoleus* também comporão uma publicação futura.

O estudo dos novos gêneros e espécies crípticos *Koinonema pervagatum* e *Blennothricopsis peryphitica* foram contemplados nos Capítulos III e IV, respectivamente, sendo que o segundo será submetido à revista *Phytotaxa*. Novas espécies para o gênero *Phormidium* foram descritas no Capítulo V, incluindo uma espécie produtora de microcistina, e o manuscrito será revisado após a identificação do análogo de microcistina encontrado e, então, será submetido à revista *Algal Research*.

A prospecção de toxinas revelou apenas uma linhagem produtora de microcistina (*Phormidium* sp.2) encontrada em um reservatório para abastecimento público, sendo o primeiro registro de uma população bentônica produtora de toxina para o estado de São Paulo. O fato de que apenas uma população tóxica foi observada é um resultado positivo do ponto de vista de impactos relacionados à presença de cianobactérias em corpos d'água para uso público. Entretanto, mostra a importância dos estudos de prospecção de toxinas em cianobactérias bentônicas no Brasil, ainda pouco explorados.

A utilização dos genes RNAr 16S e 16S-23S ITS incorporados no estudo taxonômico das populações bentônicas do noroeste do estado de São Paulo através da abordagem polifásica confirmou a habilidade do gene RNAr 16S na separação e delimitação de novos táxons. Entretanto, sua utilização tornou difícil a interpretação filogenética de vários caracteres morfológicos e de como estes se relacionam para a reconstrução da história evolutiva das cianobactérias. Sequências do 16S-23S ITS são ainda escassas no *GenBank*, impossibilitando uma análise mais completa no nível infragenérico. Na maior parte dos casos, a estrutura secundária das regiões D1-D1', Box-B e V3 do ITS 16S-23S corroborou as relações construídas a partir do RNAr 16S. Além disso, a identificação dos táxons é dificultada pela ausência de sequências do RNAr 16S para as espécies tipos, as quais, em sua maioria, só podem ser comparadas morfolologicamente através de materiais de herbário.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os achados recentes dos estudos de abordagem polifásica para Cyanobacteria, mostrando que a falta de correspondência dos aspectos morfológicos com a filogenia obtida pelo uso do RNAr 16S, no nível genérico, vem revelando um grande número de táxons crípticos. A identificação dos criptotáxons, em contrapartida, tem promovido um avanço na reconstrução da história evolutiva das Cyanobacteria, um grupo marcado por reversões e perdas e reaquisições de características morfológicas, que torna complexo o reconhecimento de linhagens monofiléticas e a fragilidade desse critério.

Referências

- ABOAL, M.; PUIG, M. Á. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 509–518, 2005.
- 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.
- ANDREOTE, A.; VAZ, M.; GENUÁRIO, D. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian

saline-alkaline lakes. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 4, p. 675–684, 2014.

BALLOT, A.; FASTNER, J.; WIEDNER, C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1173–1180, 2010.

BERRENDERO, E.; PERONA, E.; MATEO, P. Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 3039–3051, 2011.

BORGES, H. L. F.; BRANCO, L. H. Z.; MARTINS, M. D.; LIMA, C. S.; BARBOSA, P. T.; LIRA, G. a. S. T.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. J. R. Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. **Harmful Algae**, v. 43, p. 46–57, 2015.

BRANCO, L. H. Z.; NECCHI JÚNIOR, O.; BRANCO, C. C. Z. Ecological distribution of Cyanophyceae in lotic ecosystems of São Paulo State. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 99–108, 2001.

CARMICHAEL, W. A Review: Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445–459, 1992.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; ELISE, M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human Fatalities from Cyanobacteria : Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. **Environmental Health**, v. 109, n. 7, p. 663–668, 2001.

CHATCHAWAN, T.; KOMÁREK, J.; STRUNECKÝ, O.; ŠMARDÁ, J.; PEERAPORNPIPAL, Y. *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). **Cryptogamie Algologie**, v. 33, n. 1, p. 41–59, 2012.

DASEY, M.; RYAN, N.; WILSON, J.; MCGREGOR, G.; FABBRO, L.; NEILAN, B. A.; BURNS, B. P.; KANKAANPÄÄ, H.; MORRISON, L. F.; CODD, G. A.; RISSIK, D.; BOWLING, L. Investigations into the taxonomy, toxicity and ecology of benthic cyanobacterial accumulations in Myall Lake, Australia. **Marine and Freshwater Research**, v. 56, n. 1, p. 45, 24 fev. 2005.

DVOŘÁK, P.; JAHODÁŘOVÁ, E.; HAŠLER, P.; GUSEV, E.; POULÍČKOVÁ, A. A new tropical cyanobacterium *Pinocchia polymorpha* gen. et sp. nov. derived from the genus *Pseudanabaena*. **Fottea**, v. 15, n. 1, p. 113–120, 2015.

DVOŘÁK, P.; POULÍČKOVÁ, A.; HAŠLER, P.; BELLI, M.; CASAMATTA, D. A.; PAPINI, A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 739–757, 2015.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1 mar. 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, n. 3, p. 175–185, 1 mar.

1998.

FIORE, M. F.; GENUÁRIO, D. B.; DA SILVA, C. S. P.; SHISHIDO, T. K.; MORAES, L. A. B.; NETO, R. C.; SILVA-STENICO, M. E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**, v. 53, n. 7–8, p. 754–761, 2009.

GENUÁRIO, D. B.; SILVA-STENICO, M. E.; WELKER, M.; BERALDO MORAES, L. A.; FIORE, M. F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 846–854, 2010.

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

GORHAM, P. R. Toxic Waterblooms of Blue-Green Algae. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 1, n. 6, p. 235–45, 1960.

GUGGER, M.; LENOIR, S.; BERGER, C.; LEDREUX, A.; DRUART, J. C.; HUMBERT, J. F.; GUETTE, C.; BERNARD, C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 919–928, 2005.

HAMILL, K. D. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): First observations in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 35, n. 5, p. 1057–1059, 2001.

HARLAND, F.; WOOD, S.; BROADY, P.; GAW, S.; WILLIAMSON, W. Polyphasic studies of cyanobacterial strains isolated from benthic freshwater mats in Canterbury, New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 52, n. 1, p. 116–135, 2014.

HITZFELD, B. C.; LAMPERT, C. S.; SPAETH, N.; MOUNTFORT, D.; KASPAR, H.; DIETRICH, D. R. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Toxicon**, v. 38, p. 1731–1748, 2000.

IPT. Diagnóstico da situação atual dos recursos hídricos e estabelecimento de diretrizes técnicas para a elaboração do Plano da Bacia Hidrográfica do São José dos Dourados—minuta. Comitê da Bacia Hidrográfica do São José dos Dourados e Fundo Estadual de Recursos Hídricos. 1999.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; DE 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, n. 6, p. 1275–1286, 2000.

IZAGUIRRE, G.; JUNGBLUT, A. D.; NEILAN, B. a. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. **Water Research**, v. 41, n. 2, p. 492–498, 2007.

JOHANSEN, J. R.; KOVAČIK, L.; CASAMATTA, D. A.; FUČIKOVÁ, K.; KAŠTOVSKÝ, 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.

JUNGBLUT, A. D.; NEILAN, B. a. Molecular identification and evolution of the cyclic

peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 185, n. 2, p. 107–114, 2006.

KIM, M.; OH, H. S.; PARK, S. C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 346–351, 2014.

KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. **European Journal of Phycology**, v. 51, n. 3, p. 346–353, 2016.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota -2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales**. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; JEZBEROVÁ, J. Phylogenetic and taxonomic delimitation of the cyanobacterial genus *Aphanothece* and description of *Anathece* gen. nov. **European Journal of Phycology**, v. 46, n. 3, p. 315–326, 2011.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, p. 295–335, 2014.

KOMÁREK, J.; KOPECKÝ, J.; CEPÁK, V. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. **Cryptogamie Algologie**, v. 20, n. 3, p. 209–222, 1 jul. 1999.

KORELUSOVA, J.; KASTOVSKY, J.; KOMAREK, J. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *synechocystis* and description of a new genus, *geminocystis*. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 4, p. 928–937, 2009.

KRIENITZ, L.; BALLOT, A.; KOTUT, K.; WIEGAND, C.; PÜTZ, S.; METCALF, J. S.; CODD, G. A.; PFLUGMACHER, S. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 2, p. 141–148, 15 mar. 2003.

LAPAGE, S. P., SNEATH, P. H. A., LESSEL, E. F., SKERMAN, V. B. D., SEELIGER, H. P. R. & CLARK, W. A. **International Code of Nomenclature of Bacteria**. Washington, USA. American Society for Microbiology, 1975.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **The Analyst**, v. 119, n. 7, p. 1525, 1 jan. 1994.

LEE, R. E. **Phycology**. 3. ed.- ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., STAHL, D.A., CLARK, D. P. **Brock - Biology of Microorganisms**. 13th. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012.

MEZ, K.; HANSELMANN, K.; NAEGELI, H.; PREISIG, H. R. Protein phosphatase-inhibiting activity in cyanobacteria from alpine lakes in Switzerland. **Phycologia**, v. 35, n. 6S, p. 133–139, 1996.

MOHAMED, Z. A. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 17–27, 1 jan. 2008.

MOHAMED, Z. a.; EL-SHAROUNY, H. M.; ALI, W. S. M. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 584–590, 2006.

MONBEIG, P. **Pioneiros e fazendeiros de SãoPaulo**. Hucitec, SãoPaulo. 1998.

NECCHI-JR, O. Fauna e flora de fragmentos florestais remanescentes da região noroeste do Estado de São Paulo. v. 38, n. 4, p. 301, 2012.

NECCHI, O.; BRANCO, C. C. Z.; SIMÃO, R. C. G.; BRANCO, L. H. Z. Distribution of stream macroalgae in the northwest region of São Paulo State, southeastern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 299, n. 3, p. 219–230, 1995.

NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L. L.; HAWKINS, P. R.; COX, P. T.; GOODMAN, A. E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 693–697, 1997.

NÜBEL, U; GARCIA-PICHEL, F., MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v.63, n.8, p. 3327–32, 1997.

OSORIO-SANTOS, K.; PIETRASIAK, N.; BOHUNICKÁ, M.; MISCOE, L. H.; KOVÁČIK, L.; MARTIN, M. P.; JOHANSEN, J. R. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 4, p. 450–470, 2014.

PEREIRA, J. L.; ZANINI, H. Macroalgas em nascentes e arredores de riachos na região noroeste do Estado de São Paulo. v. 37, n. 3, p. 435–444, 2010.

QUIBLIER, C.; WOOD, S.; ISIDORA, E. S.; MARK, H.; AURÉLIE, V.; JEAN-FRANÇOIS, H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5464–5479, 2013.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 111, p. 1–61, 1979.

ROTT, E.; PENTECOST, A.; MAREŠ, J. Introduction: Recent developments in cyanobacterial research with special reference to aquatic habitats, molecular ecology and phylogenetic taxonomy. **Hydrobiologia**, v. 811, n. 1, p. 1–6, 2018.

SANT'ANNA, C. L.; BRANCO, L. H. Z.; GAMA JÚNIOR, W. A.; WERNER, V. R. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 455–495, 2011.

SCHIRRMMEISTER, B. E.; ANTONELLI, A.; BAGHERI, H. C. The origin of multicellularity in cyanobacteria. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.

SCIUTO, K.; MORO, I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group.

Biodiversity and Conservation, v. 24, n. 4, p. 711–738, 2015.

SCOTT, J. T.; MARCARELLI, A. M. Cyanobacteria in Freshwater Benthic Environments. In: WHITTON, B.A. **Ecology of cyanobacteria II**. London, Springer Science+Business Media, 2012, cap. 4, p. 271-289.

SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. **Cyanobacteria: an economic perspective**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons Ltd., 2014.

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, n. 6, p. 1572–1585, 2008.

SILVA, A.M., CASATTI, L., ÁLVARES, C.A., LEITE, A.M., MARTINELLI, L.A., DURRANT, S.F. Soil loss risk and habitat quality in streams of a mesoscale river basin. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 336–343, 2007.

SMITH, F. M. J.; WOOD, S. a.; VAN GINKEL, R.; BROADY, P. a.; GAW, S. First report of saxitoxin production by a species of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema* Agardh. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 566–573, 2011.

STACKEBRANDT, E. & EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v.33, p.152-155, 2006.

STAL, L.J. Cyanobacterial mats and stromatolites. In: WHITTON, B.A. **Ecology of cyanobacteria II**. London, Springer Science+Business Media, 2012, cap. 4, p. 65-126.

STAFLEU, F. A., BONNER, C. E. B., MCVAUGH, R., MEIKLE, R. D., ROLLINS, R. C., Ross, R., CHOPF, M., SCHULZE, G. M., DE VILMORIN, R. & Voss, E. G. **International Code of Botanical Nomenclature**. Utrecht, The Netherlands: A. Oosthoek, 1972.

STANIER, R.Y., SISTROM, W.R., HANSEN, T.A., WHITON, B.A., CASTENHOLZS, R.W.; PFFENIG, N.; GORLENKO, V.N.; KONDRATIEVA, E.N., EIMHJELLEN, K.E., WHITTENBURY, R., GHERNA, R.L., TRÜPER, H.G. Propose to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n.2, 335-336, 1978.

STRUNECKÝ, O.; BOHUNICKÁ, M.; JOHANSEN, J.R.; ČAPKOVÁ, K.; RAABOVÁ, L.; DVOŘÁK, P.; KOMÁREK, J. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriophycidae, Cyanobacteria). **Fottea**, v.17, n. 1, p. 114-126, 2017.L

STRUNECKÝ, O.; KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J.; LUKEŠOVÁ, A.; ELSTER, J. Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 49, n. 6, p. 1167–1180, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; WIT, R. De; WILMOTTE, A.

Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Society**, v. 69, n. 9, p. 5157–5169, 2003.

THIERS, B. **Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff**. Acesso em: 1 ago. 2018.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

WERNER, V. Cianofíceas planctônicas da Lagoa de Tramandaí e da Lagoa do Armazém. Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v.37, p. 33-70, 1988.

WETTSTEIN, R. **Handbuch der Systematischen Botanik**. Disponível em <http://caliban.mpipz.mpg.de/wettstein/botanik/index.html>. Acesso em 20 de novembro de 2018.

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.

WOOD, S. a.; HEATH, M. W.; HOLLAND, P. T.; MUNDAY, R.; MCGREGOR, G. B.; RYAN, K. G. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 897–903, 2010.

ZHU, M.; YU, G.; LI, X.; TAN, W.; LI, R. Taxonomic and phylogenetic evaluation of *Limnothrix* strains (Oscillatoriales, Cyanobacteria) by adding *Limnothrix planktonica* strains isolated from central China. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 367–374, 2012.

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