

VIVIANE PICCIN DOS SANTOS

**Filogenia molecular de cianobactérias baseada em sequências do
16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS: investigação de transferência lateral do PC**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do *campus* de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos
para obtenção de título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Rio Claro

2011

VIVIANE PICCIN DOS SANTOS

**Filogenia molecular de cianobactérias baseada em sequências do
16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS: investigação de transferência lateral do PC**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do *campus* de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos requisitos
para obtenção de título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Comissão examinadora

Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Mariana Cabral de Oliveira

Luís Henrique Zanini Branco

Rio Claro, 17 de fevereiro de 2011.

À minha mãe Maria Aparecida e seu amor incondicional, dedico

Ao meu irmão Wagner, minha cunhada Eliana e minha sobrinha Júlia, ofereço

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar
completamente com o nosso saber e a nossa ciência. "

Johan Wolfgang Von Goethe

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde e força pra cumprir esta jornada e por sempre colocar as pessoas certas em meu caminho.

À Prof. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, por todos os ensinamentos, pelo incentivo, pelo exemplo de determinação e segurança, por ter me proporcionado a chance de desenvolver este projeto que tanto amo, e acima de tudo, por sempre ter acreditado em mim.

Ao Pós-doutorando Marcelo Mendes Brandão, pelo auxílio com as análises de bioinformática e pelas inúmeras dúvidas sanadas.

Ao Prof. Dr. Paulo Salomon, por toda atenção e disponibilidade em me receber, pelos conhecimentos teóricos que tanto me ajudaram e pelo auxílio na elaboração e entendimento das análises filogenéticas.

À Prof. Dra. Edna Granéli, por ter me recebido com tanto carinho e atenção em seu grupo de pesquisa e pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Márcio de Castro, por ter disponibilizado seu laboratório para a realização de parte das análises filogenéticas deste trabalho.

Ao Doutorando Marco Marinho, pela ajuda na elaboração de elementos da discussão deste trabalho.

À Prof. Dra. Mariana Cabral de Oliveira, pelo auxílio nos primeiros passos com a bioinformática.

À Prof. Dra. Ariadne do Nascimento Moura, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade.

Aos preciosos amigos com os quais compartilhei meus primeiros anos de laboratório: Selma, por todos os ensinamentos, pelo exemplo de determinação e acima de tudo pela amizade verdadeira. Bruna, pela amizade, pelos felizes momentos compartilhados e pelo exemplo de superação. Talita, pelo apoio e amizade. Érika, pelo carinho e amizade. Fabrício, Danilo e Kajuru por fazerem meus momentos de laboratório muito mais felizes.

Aos incríveis “novos” amigos de laboratório: Micheline, por cantar, por rir, por dançar, por alegrar qualquer ambiente e acima de tudo por ser uma amiga verdadeira especialmente no fim desta etapa. Helton, pelo carinho, pela amizade e por ser a pessoa especial que é. Ítalo, pela amizade e apoio. Karina, pelo apoio e pelas longas conversas. Cássia, pelo apoio e pela paz que naturalmente transmite.

Aos colegas de mestrado Luís Felipe, Shirley, Natália, Nádia, Carmélia, Mariëllen, Jeniffer, Luciana, Angélica, Aurélio, Nicolau, Weliton e em especial o amigo Régis, por terem feito esta caminhada muito mais leve.

Aos amigos da Linnaeus University, em especial Fábio, Michelle, Nayani, Johannes, Joakin e Polly, por terem feito dos meus meses suecos muito mais que uma experiência profissional.

Aos amigos Gustavo, Sheila, Aline, Larissa, Felipe, Izabela, Cléber e Enéas, por terem dividido intensamente este período comigo e por serem minha família piracicabana.

Aos amigos Everton e Vanessa, pela amizade, carinho e por cuidarem de mim sempre que precisei.

Aos amigos Jonas, Lucas e Adriana, pela amizade e apoio.

Ao amigo Diego, pelo carinho, por estar sempre presente na minha vida e por simplesmente ser quem é.

À professora e amiga Bruna, pelo apoio e pelas correções no inglês.

Às amigas Keila e Vanessa, pela amizade desde sempre e pelos anos de confiança.

Às amigas Sônia e Melissa, pelo carinho e apoio.

Ao amigo Anderson, por me lembrar de sorrir na difícil fase final desta caminhada.

Aos meus padrinhos Célia e João e minha tia Clementina, pelo apoio e pelas orações.

Ao meu pai Joaquim (in memoriam) por ter me ensinado a ser uma pessoa mais forte e independente.

À minha mãe Maria, pelo carinho e apoio constante e por ser sempre meu “porto seguro”.

Ao meu irmão Wagner, presente de Deus sem o qual tenho certeza que jamais teria chegado até aqui, pelo apoio e incentivo a todo e qualquer momento.

À minha irmã de coração Eliana, pela amizade, carinho, incentivo, pelos muitos e precisos conselhos e pelo exemplo de coragem e determinação.

À minha sobrinha Júlia, por com cada sorriso fazer minha vida muito mais feliz.

À todos que me incentivaram e de alguma forma participaram dessa caminhada.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

As cianobactérias apresentam uma ampla variabilidade fenotípica e ecológica. Porém, esta variabilidade, muitas vezes, não corresponde à sua diversidade genética. Assim, o uso de marcadores moleculares é fundamental para os estudos de filogenia neste grupo. Entretanto, a filogenia molecular enfrenta um desafio na seleção dos marcadores devido à ocorrência relativamente frequente da transferência de genes de forma lateral entre os procariotos. Em cianobactérias os marcadores dos espaçadores dos genes ribossomais (16S-23S-ITS rDNA) e do *operon* da ficocianina (PC-IGS) estão entre os mais utilizados nestes estudos. Contudo, alguns trabalhos sugerem que o PC-IGS possa ter sido transferido lateralmente em sua história evolutiva. A identificação de morfoespécies dos gêneros *Microcystis* e *Geitlerinema* é baseada em caracteres morfológicos que em geral não correspondem à sua variabilidade genética. Com o objetivo de investigar a transferência lateral do *operon* da ficocianina em *Geitlerinema* e *Microcystis*, foram obtidas e comparadas árvores filogenéticas de ambas espécies baseadas nos marcadores PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA. As topologias das árvores obtidas para ambos os marcadores foram muito semelhantes e indicaram que o PC-IGS é estável e indicado para os estudos de taxonomia e filogenia de linhagens de *Geitlerinema* e *Microcystis*. Assim, hipótese inicial de transferência lateral foi refutada. Algumas linhagens tiveram seu posicionamento divergente entre um marcador e outro, o que ressalta a importância do uso de mais de um marcador em estudos de filogenia. O marcador PC-IGS apresentou melhor desempenho que 16S-23S-ITS rDNA. As árvores filogenéticas de *Geitlerinema* baseadas em ambos os marcadores indicaram a ocorrência de espécies crípticas dentre as linhagens estudadas e corroboraram que *G. amphibium* e *G. unigranulatum* devem ser consideradas sinônimas. A árvore filogenética do PC-IGS formou um clado monofilético para as linhagens da morfoespécie *M. wesenbergii* concordando com os dados de morfologia. No entanto, o mesmo não ocorreu para as demais morfoespécies de *Microcystis* estudadas, reafirmando a necessidade de revisão do grupo.

Palavras chave: 16S-23S-ITS rDNA. Filogenia. *Geitlerinema*. *Microcystis*. PC-IGS. Transferência lateral de genes.

ABSTRACT

Cyanobacteria show a wide phenotypic and ecological variability, but frequently this variability does not correspond to their genetic variation. Therefore, the use of molecular markers is critical for phylogenetic studies in this group. At the same time, the selection of molecular markers represents a challenge for the molecular phylogeny due to the horizontal gene transfer, which is a relatively common process among the prokaryotes. In cyanobacteria, markers for the ribosomal genes spacer (16S-23S-ITS rDNA) and for the phycocyanin operon spacer (PC-IGS) are among of the most used for phylogeny. However, some studies suggest that the PC-IGS marker may have been horizontally transferred during its evolutionary history. The identification of the morphospecies from the genus *Microcystis* and *Geitlerinema* is based in their morphological characters, but they generally do not correspond to genetic variability. In order to investigate the possibility of horizontal transfer of the phycocyanin operon in *Microcystis* and *Geitlerinema*, phylogenetic trees based on the PC-IGS and 16S-23S-ITS rDNA were generated and compared. The topologies obtained for both markers were very similar, indicating that the PC-IGS marker is stable and suitable for taxonomical and phylogenetic studies in *Microcystis* and *Geitlerinema*. Therefore, the initial hypothesis of horizontal transfer was rejected. Some strains were found to have divergent positions between the trees based on the two molecular markers, which highlights the importance of using more than one marker in phylogenetic studies. The PC-IGS marker performed better than 16S-23S-ITS rDNA. The *Geitlerinema* phylogenetic trees based on both markers indicated the occurrence of cryptic species among the strains and corroborated that *G. amphibium* and *G. unigranulatum* should be treated as synonyms. The phylogenetic tree based on PC-IGS formed a monophyletic clade for the *M. wesenbergii* morphospecies, which is in agreement with morphological data, but the same situation did not occur to any of other morphospecies of *Microcystis* studied reaffirming the need for revision of the group.

Key words: 16S-23S-ITS rDNA. *Geitlerinema*. Horizontal gene transfer. *Microcystis*. PC-IGS. Phylogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfoespécie, código e local de origem das linhagens e fonte das sequências utilizadas neste estudo.....	35
---	----

Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados e suas sequências, fonte de consulta e condições de amplificação.....	37
--	----

Tabela 3. Número de táxons, tamanho da matriz, divergências, número de sítios informativos, número de árvores mais parcimoniosas, índices de homoplasia, probabilidade do teste PTP, e modelo evolutivo selecionado das matrizes de alinhamento utilizadas para apresentação dos resultados. SI Número de sítios informativos da parcimônia; NAP Número de árvores mais parcimoniosas; IC Índice de consistência; IR Índice de retenção; RC Índice de consistência rescalonado; PTP valor p do teste de permutação PTP (<i>Permutation Tail Probability Test</i>); TrN Tamura e Nei 1993; TPM1 e TPM2 modelo de três parâmetros (Kimura 1981); HKY Hasegawa, Kishino e Yano 1985; ef frequências iguais; uf frequências desiguais; G taxa de variação entre os sítios; I proporção de sítios invariáveis; - análise não realizada.....	38
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfoespécies de *Geitlerinema*. **A.** *G. amphibium*. **B.** *G. unigranulatum*. Barra de escala = 10µm. Fonte: Bittencourt-Oliveira et al. (2009a).....39

Figura 2. Morfoespécies de *Microcystis*. **A.** *M. wesenbergii*. **B.** *M. aeruginosa*. **C.** *M. panniformis*. Fonte: A e B- Bittencourt-Oliveira et al. (2001); C- Bittencourt-Oliveira et al (2007b).....40

Figura 3. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo apenas as linhagens de *Geitlerinema* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575949) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,05 substituições.....41

Figura 4. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contento as linhagens de *Geitlerinema* spp. sequenciadas neste estudo e as selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575949) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,06 substituições.....42

Figura 5. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para o alinhamento das sequências do PC-IGS de *Geitlerinema* sequenciadas neste estudo e selecionadas do GenBank (PC-IGS

Geitlerinema). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.....43

Figura 6. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para a matriz de alinhamento das sequências do 16S-23S-ITS rDNA de *Geitlerinema* (ITS-23S-ITS rDNA *Geitlerinema*). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.....44

Figura 7. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do 16S-23S-ITS rDNA contendo as linhagens de *Geitlerinema* spp. sequenciadas neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas e para a Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Todas as linhagens foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575935) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,06 substituições.....45

Figura 8. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo apenas as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,03 substituições.....46

Figura 9. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo e algumas selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram

realizadas com 2000 réplicas para NJ e MP e 200 réplicas para MV. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,03 substituições.....47

Figura 10. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo e todas as demais selecionadas do GenBank. Valores de probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. ** Linhagens presentes também na árvore do 16S-23S-ITS rDNA (Figura 14). Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,01 substituições.....48

Figura 11. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para o alinhamento das sequências do PC-IGS de *Microcystis* (PC-IGS *Microcystis* B). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.....49

Figura 12. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Todas as linhagens foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,01 substituições...50

Figura 13. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo e algumas selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de

bootstrap foram realizadas com 2000 réplicas para NJ e MP e 200 réplicas para MV. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. ** Linhagens presentes também na árvore do PC-IGS (Figura 10). Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,04 substituições.....51

Figura 14. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo e todas as demais selecionadas do GenBank. Valores de probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,4 substituições.....52

Figura 15. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para a matriz de alinhamento das sequências do 16S-23S-ITS rDNA de *Microcystis* (ITS-23S-ITS rDNA *Microcystis* **B**). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.....53

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Linhagens e condições de cultivo.....	13
2.2. Extração de DNA.....	13
2.3. Amplificação de DNA (PCR).....	14
2.4. Quantificação.....	14
2.5. Purificação.....	15
2.6. Sequenciamento do DNA.....	15
2.7. Análise das sequências.....	15
2.8. Análises filogenéticas.....	16
2.8.1. Construção das árvores filogenéticas com sequências de <i>Geitlerinema</i>	17
2.8.2 Construção das árvores filogenéticas com sequências de <i>Microcystis</i>	17
3. RESULTADOS.....	18
3.1. Análises filogenéticas das linhagens de <i>Geitlerinema</i>	18
3.1.1. Filogenia das linhagens de <i>Geitlerinema</i> baseada no PC-IGS.....	18
3.1.2. Filogenia das linhagens de <i>Geitlerinema</i> baseada no 16S-23S-ITS rDNA.....	19
3.1.3. Comparação entre as filogenias baseadas no PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA para linhagens de <i>Geitlerinema</i>	20
3.2. Análises filogenéticas das linhagens de <i>Microcystis</i>	21
3.2.1. Filogenia das linhagens de <i>Microcystis</i> baseada no PC-IGS.....	21
3.2.2. Filogenia das linhagens de <i>Microcystis</i> baseada no 16S-23S-ITS rDNA.....	23
3.2.3. Comparação entre as filogenias baseadas no PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA para linhagens de <i>Microcystis</i>	24
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
7. ANEXOS.....	71
7.1. Anexo A – Matriz de alinhamento PC-IGS <i>Geitlerinema</i>	72
7.2. Anexo B – Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA <i>Geitlerinema</i>	75
7.3 Anexo C - Matriz de alinhamento PC-IGS <i>Microcystis</i> A.....	77
7.4 Anexo D - Matriz de alinhamento PC-IGS <i>Microcystis</i> B.....	82

7.5 Anexo E - Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA <i>Microcystis</i> A.....	87
7.6 Anexo F - Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA <i>Microcystis</i> B.....	90

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias caracterizam-se como os únicos organismos procarióticos capazes de realizar a fotossíntese com a liberação de oxigênio (REVIERS, 2006). Estima-se que estes organismos tenham surgido há pelo menos 2,7 bilhões de anos, sendo representantes dos procariotos mais antigos da Terra (HOEK; MANN; JAHNS, 2005; LEE, 1999; REVIERS, 2006).

A era Proterozóica, aproximadamente de 2,5 a 0,5 bilhões de anos atrás, chamada também de “Idade das Cianobactérias”, foi dominada pelas cianobactérias. Neste período, devido à intensa atividade fotossintética destes organismos os níveis de oxigênio da atmosfera terrestre foram elevados a níveis que tornaram possível o surgimento dos primeiros organismos aeróbicos e, em particular, dos primeiros eucariotos aeróbicos (HOEK; MANN; JAHNS, 2005).

Em sua longa história evolutiva na Terra, as cianobactérias acumularam adaptações fisiológicas e ecológicas que lhes permitiram colonizar os mais diversos habitats. Atualmente, espécies de cianobactérias são encontradas em quase todos os ambientes, incluindo os mais extremos como desertos, fontes termais e geleiras (WHITTON; POTTS, 2000). Além disso, representam um grupo morfológicamente bastante diverso, compreendendo formas unicelulares, coloniais e filamentosas com desenvolvimento da capacidade de formação de células diferenciadas chamadas heterócitos e acinetos (REVIERS, 2006; LEE, 1999).

Os heterócitos, presentes em alguns grupos de cianobactérias, são células especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico que possuem a enzima nitrogenase redutase (REVIERS, 2006; LEE, 1999). Já os acinetos são células de maiores dimensões, com paredes espessas e reservas nutricionais, caracterizando-se como estruturas de resistência às condições desfavoráveis de crescimento (HOEK; MANN; JAHNS, 2005).

As cianobactérias apresentam sistema fotossintético semelhante ao dos cloroplastos de algas eucarióticas e plantas. Possuem os fotossistemas I e II, utilizam a água como doadora de elétrons e liberam O₂ como produto final da fotossíntese (HOEK; MANN; JAHNS, 2005; REVIERS, 2006). Baseando-se nestas semelhanças e em estudos bioquímicos e moleculares, credita-se que tenham dado origem a todos os cloroplastos atuais através eventos de endossimbiose ocorridos há mais de 1 bilhão de anos (ARCHIBALD, 2006; McFADDEN, 2001).

Além de seu importante papel ecológico como organismos fotossintetizantes e fixadores de nitrogênio e, conseqüentemente, como base das cadeias alimentares em muitos ambientes, as cianobactérias também são conhecidas por sua capacidade de formação de florações e produção de toxinas. As florações de cianobactérias causam alterações na qualidade das águas utilizadas pela população humana para consumo e recreação. O consumo das cianotoxinas podem causar prejuízos à saúde de humanos e animais (CARMICHAEL 1994).

Agrupadas na divisão Cyanophyta, as cianobactérias compõem um agrupamento monofilético dentro do domínio *Bacteria* (CASTENHOLZ, 2001). A taxonomia do grupo é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos e ecológicos de acordo com os critérios de classificação botânicos (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK 1985, 1988, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS 1986, 1989, 1999, 2005).

Baseando-se em caracteres como forma do talo (unicelular, filamentosa, etc.), padrão de divisão celular e de presença/ausência de células especializadas, Anagnostidis e Komárek (1985) dividiram as cianobactérias em quatro ordens: Chroococcales, incluindo as formas unicelulares e coloniais; Oscillatoriales, as filamentosas homocitadas (ausência de heterócitos e acinetos); Nostocales, as heterocitadas (presença de heterócitos e/ou acinetos) e sem ramificações verdadeiras (apenas um plano de divisão celular) e Stigonematales, os filamentos heterocitados e com ramificações verdadeiras.

Entretanto, as características morfológicas a serem avaliadas nas cianobactérias são relativamente poucas e em muitos casos se sobrepõem entre táxons próximos. Além disso, a variabilidade morfológica muitas vezes não corresponde à diversidade genética do grupo (PREMANANDH et al., 2006; WILLAME et al., 2006; WILSON et al., 2000). Assim, o uso exclusivo de caracteres morfológicos na taxonomia tem acarretado problemas de identificação e, conseqüentemente, causado confusão na classificação e filogenia de seus grupos.

O uso de técnicas moleculares tem promovido o acesso à variabilidade genética e possibilitado a reconstrução da história evolutiva das cianobactérias e conseqüentemente ajudado a elucidar muitos destes problemas (WILMOTTE, 1994). Estas técnicas são particularmente importantes na discriminação e filogenia de espécies (BOLCH et al., 1996, CASAMATTA et al., 2005; NEILAN, 1995, NEILAN et al., 1994, THOMAZEAU et al 2010; WILLAME et al., 2006) por apresentarem a vantagem de independer de condições de cultivo e plasticidade fenotípica, características que muitas vezes representam um desafio à identificação baseada em caracteres morfológicos (BELTRAN; NEILAN, 2000; OTSUKA et al., 1998, 1999).

Além da aplicabilidade na classificação correta dos organismos, a filogenia molecular vem permitindo estudos sobre diversidade genética de linhagens oriundas de regiões geográficas e condições ambientais diversas, gerando dados sobre processos ecológicos e evolutivos, como os mecanismos de dispersão e produção de toxinas (BELTRAN; NEILAN, 2000; CHONUDOMKU et al., 2004; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; NEILAN et al., 2003; RANTALA et al., 2004).

Uma das primeiras técnicas moleculares a serem aplicadas ao estudo das cianobactérias foi a comparação de padrões de isoenzimas por eletroforese em gel, que apesar de não serem numerosos (HOLTON, 1981) produziram alguns resultados que já indicavam a não correspondência entre dados morfológicos e moleculares (SCHENK et al., 1973 apud WILMOTTE, 1994; WEEDEN; HIGGINS.; GOTTLIEB, 1982). Além desta técnica, o padrão de outras enzimas revelado por gel de eletroforese e técnicas imunológicas, como fluorescência de anticorpo e anticorpo monoclonal, também produziram resultados neste mesmo sentido (LADHA; WATANABE, 1982; ZILINSKAS; HOWELL, 1987).

A técnica de hibridização DNA-DNA foi proposta por Wayne (1987) como um critério de delimitação de espécies bacterianas indicando que cepas que apresentassem acima de 70% de hibridização deveriam ser consideradas da mesma espécie. Em cianobactérias, a técnica foi aplicada pela primeira vez por Stan e Venema (1975) e utilizada por vários outros autores mais tarde (STAM; BOELE-BOS; STULP, 1985; STULP; STAM, 1984; OTSUKA et al., 2001). Otsuka et al., (2001) aplicou a proposta de delimitação de espécies por hibridização DNA-DNA no estudo de linhagens de *Microcystis*. Porém, esta técnica apresenta dificuldades relacionadas à sensibilidade a fatores físico-químicos, como temperatura de hibridização entre outras. Em decorrência disto seu uso na determinação de espécies não foi consensual entre os bacteriologistas (BAPTESTE; BOUCHER, 2008; VANDAMME et al., 1996)

As técnicas de detecção de variações e polimorfismos nas sequências de DNA foram as que mais se desenvolveram no estudo das cianobactérias. Algumas destas técnicas são úteis especialmente no acesso à variabilidade genética dentro de espécies ou populações. Nestas técnicas é realizada a comparação de padrões de fragmentos de DNA dos diferentes táxons em gel de agarose. A saber, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2009b; BOLCH et al., 1996; ITEMAN et al., 2002; LYRA et al., 2001; LU et al., 1997) e DNA *fingerprinting* como, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (CASAMATTA et al., 2003; NISHIHARA et al., 1997; PRABINA; KUMAR; KANNAIYAN, 2005; SHALINI et al., 2007), STRR (*Short Tandemly Repeated Repetitive*) (CHONUDOMKUL et al., 2004; VALÉRIO et al., 2009; WILSON et al., 2000) e

HIP1 (*Highly Iterated Palindrome*) (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2007a, 2007b; NEILAN et al., 2003; ORCUTT et al., 2002; POMATI et al., 2004; WILSON et al., 2005; ZHENG et al., 2002).

Um grande avanço nas técnicas moleculares no estudo das cianobactérias, especialmente para os estudos de filogenia molecular, foi o advento do sequenciamento direto dos marcadores moleculares (WILLMOTE, 1994).

O gene 16S rDNA foi o primeiro a ser estudado e é um dos marcadores moleculares mais utilizados para estudos de filogenia e inferências sobre história evolutiva das cianobactérias (CASAMATTA et al., 2003; ENGEL; COATES; GERWICK, 2010; FOSTER; ZEHR, 2006; GIOVANNONI et al., 1988; HEATH; WOOD; RYAN, 2010; HERRY; NASRI; BOUAÏCHA, 2008; LEE; BAE, 2002; LÈPERE; WILMOTTE; MEYER, 2000; LYRA et al., 2001; NEILAN et al., 1994; 1997; NELISSEN et al., 1992; 1994; 1995; 1996; NÜBEL et al., 1997; OTSUKA et al., 1998; PALINSKA et al., 1996; SVENNING; ERIKSSON; RASMUSSEN, 2005; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001; THOMAZEAU et al., 2010; TOMITANI et al., 2006; VALÉRIO et al., 2009; WILLAME et al., 2006).

Este gene constitutivo codifica a subunidade menor do ribossomo e corresponde a uma região altamente conservada do genoma. Como os demais genes ribossomais são moléculas universais e a similaridade na sua estrutura sugere que tenha evoluído muito cedo em um ancestral comum a todos os seres vivos e se alterado relativamente pouco até hoje (WILMOTTE, 1994). Sequências do 16S rDNA também são utilizadas pelos bacteriologistas para delimitação de táxons, sendo considerados como pertencentes à mesma espécie organismos que apresentam acima de 97% de similaridade (VANDAMME et al., 1996). Em cianobactérias, sua estrutura foi revelada por Doolittle et al. (1975) que confirmaram a semelhança genética entre as cianobactérias e outras bactérias.

Giovannoni et al. (1988) foram os primeiros a apresentar uma filogenia baseada em sequências do 16S rDNA contendo diversos grupos de cianobactérias. Os autores analisaram 29 linhagens deste grupo juntamente com sequências de cloroplastos de algas e plantas superiores. Seus resultados demonstraram que a separação das cianobactérias unicelulares e filamentosas homocitadas não apresentava suporte filogenético. Além disso, confirmaram que os cloroplastos formavam um agrupamento monofilético junto com as cianobactérias e sugeriram o posicionamento destes como um agrupamento interno na radiação das cianobactérias e não mais como grupo irmão como era proposto até então.

Recentemente, Hoffmann, Komárek e Kastovský (2005) propuseram uma nova classificação para as cianobactérias baseada em sequências do 16S rDNA juntamente com

características morfológicas e ultraestruturais, especialmente de posicionamento dos tilacóides em relação à superfície celular. Nesta classificação as cianobactérias foram divididas em seis ordens: Gloeobacterales, Synechococcales e Chroococcales incluindo as unicelulares e coloniais; Oscillatoriales e Pseudanabaenales com as filamentosas homocitadas e Nostocales com todas as heterocitadas. Entretanto, a maioria dos estudos confirmam apenas a monofilia das cianobactérias heterocitadas, estando os demais grupos ainda com posicionamento controverso (TOMITANI et al., 2006; VALÉRIO et al., 2009).

Por tratar-se de uma região bastante conservada do genoma, o marcador 16S rDNA, em muitos casos, mostrou-se inadequado para estudos com grupos mais próximos, os quais visaram discriminar espécies dentro de gêneros ou linhagens dentro de espécies (CHONUDOMKUL et al., 2004; FOX; WISOTZKEY; JURTSCHUK, 1992).

Assim, vários outros marcadores vêm sendo utilizados em cianobactérias tanto objetivando atender a estes estudos, quanto buscando genes que possam ser usados em conjunto com o 16S rDNA. Dentre estes marcadores estão: a subunidade B da DNA girase (*gyrB*) (SEO; YOKOTA, 2003); o gene *hetR* envolvido na diferenciação dos heterócitos (JANSON; GRANÉLI, 2002; FOSTER; ZEHR, 2006; TOMITANI et al., 2006); a subunidade grande da RUBISCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) (*rbcL*) e proteína chaperonina proteína X (*rbcLX*) (GUGGER et al., 2002; RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998; TOMITANI et al., 2006); genes codificantes de subunidades da RNA polimerase DNA-dependente (*rpoB*), (*rpoC1*) e (*rpoC2*) (PALENIK; SWIFT, 1996; VALÉRIO et al., 2009; WILSON et al., 2000); o gene *tuf* responsável pela transcrição do fator de alongação EF-Tu (*tufA*) (DELWICHE; KUNSEL; PALMER, 1995); genes *nif* da nitrogenase (*nifH*) (DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; ZEHR; MELLON; HIRNS, 1997); além do espaçador interno transcrito entre os genes ribossomais (16S-23S-ITS rDNA) e o *operon* da ficocianina (PC)

O marcador do espaçador interno transcrito entre os genes ribossomais 16S e 23S (16S-23S-ITS rDNA) contém pequenos trechos dos genes 16S e 23S e o espaçador ITS entre eles. Em cianobactérias a região do ITS pode conter um ou dois RNA transportadores inseridos em sua sequência, sendo eles tRNA(Ala) e tRNA(Ile), ou não possuí-los (BOYER; FLECHTNER; JOHANSEN, 2001). Este marcador foi sequenciado pela primeira vez em cianobactérias por Otsuka et. al (1999) para inferir a filogenia de linhagens tóxicas e não tóxicas do gênero *Microcystis*. Neste trabalho os autores demonstraram que o marcador apresentou regiões menos conservadas que o 16S rDNA.

Devido a esta maior variabilidade e por ser parte do *operon* dos genes ribossomais, o 16S-23S-ITS rDNA tornou-se um dos marcadores mais utilizados em trabalhos de filogenia

envolvendo linhagens próximas (CADEL-SIX et al., 2007; CHEN et al., 2006; FINSINGER et al., 2008; GUGGER et al., 2005; HUMBERT et al., 2005; ITEMAN, et al., 2000; OTSUKA et al. 1999; TAN et al., 2010; VALÉRIO et al., 2005). Entretanto, alguns autores indicam que o marcador deve ser utilizado com cautela devido à existência de variabilidade intragenômica nas sequências das múltiplas cópias dos genes ribossomais presentes nas cianobactérias (BOYER; FLECHTNER; JOHANSEN, 2001; ENGINE; COATES; GERWICK, 2010; ITEMAN et al., 2000, 2002).

Outro marcador bastante utilizado, especialmente em estudos em nível infra-genérico, é o baseado no *locus* da ficocianina (BARKER et al., 2000; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001, 2009a; BOLCH et al., 1999; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; HANNDE et al., 2007; HAVERKAMP et al., 2008, 2009; JONSON; GRANÉLI, 2002; MANEN; FALQUET, 2002; ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001; SANCHIS et al., 2005; SIX et al., 2007; TAN et al., 2010; WU et al., 2010).

A ficocianina é um pigmento fotossintético acessório que confere às cianobactérias a coloração verde-azulada (GLAZER, 1984). Os genes que codificam a ficocianina como o *cpcB* e *cpcA* estão presentes em todas as cianobactérias, ausentes em outras bactérias e presentes em algumas microalgas de água doce, como as das Divisões Cryptophyta e Glaucophyta.

O fragmento do *operon* da ficocianina analisado em estudos de filogenia (PC-IGS) inclui partes dos genes *cpcB* e *cpcA* e a região intergênica (IGS) entre eles (BOLCH et al., 1996; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). O espaçador IGS caracteriza-se como uma região de alta variabilidade possuindo sequências com taxas de substituições mais altas do que aquelas do 16S rDNA (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). Estudos recentes mostram que o marcador pode ser até mais eficiente que o 16S-23S-ITS rDNA na discriminação de algumas espécies e no acesso à diversidade genética de algumas linhagens (HAVERKAMP et al., 2009; TAN et al 2010).

Apesar da comprovada aplicabilidade das técnicas moleculares para estudos de filogenia, alguns trabalhos mostram que resultados baseados em diferentes *loci* podem apresentar diferenças significativas indicando que o uso de um único *locus* nestes estudos pode ser insuficiente para a obtenção de resultados consistentes (FOSTER; ZEHR, 2006; HAN; FAN; HU, 2009; JANSON; GRANELI, 2002; TAN et al., 2010; WU et al., 2010). Uma das possíveis causas destas divergências é a ocorrência de transferência lateral de genes (TLG).

A transferência lateral (ou horizontal) de genes consiste na incorporação de um gene exógeno, ou parte dele, por transformação, transdução ou conjugação (JAIN et al., 2002). Em cianobactérias de água doce as formas mais comumente identificadas têm sido a transformação natural e a conjugação (YERRAPRAGADA; SIEFERT; FOX, 2009).

Este evento passou a ser intensamente estudado quando se descobriu que linhagens bacterianas podiam adquirir genes de resistência a antibióticos de forma horizontal e que isto ocorria não apenas entre membros da mesma espécie, mas também entre organismos mais distantes (GRAY; FITCH, 1983; TRIEU-CUOT et al., 1987).

A transferência lateral de genes e a substituição de genes ortólogos são fatores de grande importância na história evolutiva dos procariotos (BOUCHER et al., 2003; GRIBALDO; BROCHIER, 2009; ZHAXYBAYEVA; GOGARTEN 2002). Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para tentar detectar e mensurar estes eventos. A hipótese da transferência lateral de genes é comumente levantada quando uma sequência de DNA ou proteína de um organismo apresenta uma similaridade mais forte com sua sequência homóloga de um organismo mais distante do que com aquelas de seus parentes obviamente mais próximos. Neste caso reflete um evento de transferência lateral de genes relativamente recente (YERRAPRAGADA; SIEFERT; FOX, 2009).

Alguns métodos mais elaborados também são utilizados como marcadores da transferência lateral de genes e visam indicar a ocorrência destes eventos mesmo que não sejam tão recentes. Dentre estes métodos destacam-se a observação de padrões não usuais de evolução na filogenia de genes, a distribuição atípica de nucleotídeos, métodos estatísticos e a observação de filogenias incongruentes baseadas em diferentes marcadores (HAVERKAMP et al., 2008, 2009; KOONIN; MAKAROVA; ARAVIND, 2001; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000; RAGAN, 2001; SHI; FALKOWSKI, 2008; SIX et al., 2007; ZHAXYBAYEVA; GOGARTEN; CHARLEBOIS, 2006).

Apesar dos resultados baseados em diferentes métodos serem ainda controversos sobre a abrangência da transferência lateral de genes sobre os genomas dos procariotos (NAKAMURA et al., 2004; OCHMAN et al., 2000; SHI; FALKOWSKI, 2008; ZHAXYBAYEVA; GOGARTEN; CHARLEBOIS, 2006), em cianobactérias estes eventos parecem ser ainda subestimados (ZHAXYBAYEVA; GOGARTEN; CHARLEBOIS, 2006). Acredita-se que virtualmente qualquer gene pode ter sido transferido pelo menos uma vez durante os mais de 3 bilhões de anos de evolução microbiana (GRIBALDO; BROCHIER, 2009).

Esta possibilidade de ocorrência massiva de transferência lateral de genes em procariotos levou a busca por agrupamentos de genes que apresentassem evidências de serem mais estáveis, ou seja, menos favoráveis a serem transferidos, e consequentemente mais indicados ao uso em estudos filogenéticos (MAKAROVA et al., 1999).

Em cianobactérias, Shi e Falkowski (2008) analisaram 13 genomas completos sequenciados e identificaram um grupo de 682 genes ortólogos presentes em todos eles. Destes, 323 demonstraram ter uma história evolutiva similar, ou seja, não teriam sofrido transferência lateral ou teriam sido raramente transferidos. Estes 323 genes representam apenas cerca de 3% do maior genoma analisado pelos pesquisadores e correspondem principalmente a genes ribossomais e essenciais para o processo fotossintético. Os autores também verificaram que genes mais conservados tenderam a apresentar menor probabilidade de serem transferidos. Porém, utilizando metodologia diferente Zhaxybayeva; Gogarten e Charlebois (2006) demonstraram que genes de praticamente todas as funções podem estar sujeitos à transferência lateral. Assim, são necessários estudos caso a caso, focando especialmente os *loci* mais amplamente aplicados aos estudos de taxonomia e filogenia.

Questionamentos sobre a ocorrência de transferência lateral do *operon* da ficocianina surgiram quando foram observados padrões não usuais de evolução e anomalias na sequência de seu marcador. Também foram observadas divergências entre as filogenias baseadas no marcador da ficocianina em comparação com aquelas baseadas em outros marcadores (HAVERKAMP et al., 2008, 2009; JANSON; GRANÉLI, 2002; SIX et al., 2007).

Manen e Falquet (2002), investigando a diversidade genética de *Arthrospira* e sua relação com outros gêneros de cianobactérias, verificaram a presença de um padrão de mosaico de substituição nucleotídica nas sequências do marcador da ficocianina das linhagens estudadas. Os autores sugeriram eventos de recombinação do *locus* entre as linhagens para explicar tanto este padrão, quanto a não congruência entre a filogenia resultante e os dados de morfologia e localização geográfica.

Comparando as filogenias produzidas pelos marcadores PC-IGS e *hetR* para 41 sequências de *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Nodularia*, Janson e Granéli (2002) obtiveram filogenias divergentes e verificaram a presença de padrões anômalos na região do PC-IGS demonstrando que, ao contrário do esperado, em algumas linhagens a região codificante do marcador foi mais variável que a do espaçador IGS.

Six et al. (2007) sequenciaram e analisaram 11 linhagens de *Synechococcus* provenientes de ambiente marinho e constataram que as árvores filogenéticas baseadas no PC-

IGS e no 16S-23S-ITS rDNA foram distintas. Além disso, identificaram um gene *cpcB* adicional externo ao *operon* da ficocianina em uma das linhagens analisadas.

Haverkamp et al. (2008), analisando picocianobactérias do Mar Báltico, verificaram que as análises realizadas com sequências do PC-IGS reuniram as linhagens de coloração verde, as aproximaram de cianobactérias verdes de água doce e as distinguiram das avermelhadas. Por outro lado, as análises realizadas com 16S-23S-ITS rDNA tenderam a reunir as linhagens marinhas e distingui-las das de água doce independente da coloração. Em um trabalho posterior, pesquisadores do mesmo grupo utilizando um número maior de linhagens confirmaram a não congruência das filogenias obtidas a partir dos marcadores 16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS para linhagens de picocianobactérias e verificaram novamente que a árvore do PC-IGS era congruente com o agrupamento pela coloração das linhagens, padrão não observado para o 16S-23S-ITS rDNA (HAVERKAMP et al., 2009).

Esses autores sugerem que esta possível evolução divergente entre o *operon* da ficocianina e os demais genes possa ter sido viabilizada pela transferência lateral do *operon* ou de parte dele (HAVERKAMP et al., 2008, 2009; JANSON; GRANÉLI 2002; SIX et al., 2007).

O gênero *Microcystis* é composto por espécies coloniais delimitadas por uma bainha mucilagínosa homogênea. Suas células apresentam três planos de divisão e a presença de aerótopos (vesículas gasosas) (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS 1986, 1999). Espécies deste gênero são responsáveis pelo maior número de relatos de florações em lagos e reservatório no mundo (CARMICHAEL 1996; CODD; MORRISON; METCALF, 2005). A toxina microcistina, um peptídeo hepatotóxico produzido por linhagens de diferentes espécies deste gênero, é responsável por diversos relatos de danos à saúde de humanos e outros animais (BOURKE et al., 1983; BRIAND et al., 2003; CARMICHAEL 1996; FALCONER; BERESFORD; RUNNEGAR, 1983; JEWEL; AFFAN; KHAN, 2003; JOCHIMSEN et al., 1998; PADILLA; SANZ-ALFÉREZ; DEL CAMPO, 2005; SIVONEN; JONES 1999).

O gênero está incluso na ordem Chroococcales, de acordo com a classificação de Anagnostidis e Komárek (1985), sendo a identificação de suas morfoespécies baseada em caracteres morfológicos observados em amostras de campo. As principais características morfológicas utilizadas para a identificação são: distribuição das células na colônia, forma e estrutura da colônia e sua mucilagem e dimensões celulares (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS 1986, 1999). Entretanto, em cultivo muitas destas características são alteradas ou perdidas, tornando impossível a distinção de algumas morfoespécies (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001; OTSUKA et al., 2000; SANCHIS et al., 2005).

Zhang et al. (2007) demonstraram que além das alterações na morfologia, cultivos de *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing com células desagregadas apresentaram concentrações mais baixas de clorofila *a*, ficocianina e carboidratos quando comparadas àquelas em formato colonial. Assim, esta ampla plasticidade fenotípica apresentada pelo grupo e a sobreposição da delimitação dos caracteres morfológicos podem levar a confusões na taxonomia e filogenia do grupo (OTSUKA et al., 2000, 2001).

Estudos de filogenia baseados em dados moleculares demonstraram que como gênero *Microcystis* representa um agrupamento monofilético, porém o mesmo não ocorre dentre suas morfoespécies e, por isso, que estas precisam ser revistas (LEE; BAE, 2002; THOMAZEAU et al., 2010; VALÉRIO et al., 2009).

A não correspondência entre dados moleculares e morfológicos entre as morfoespécies de *Microcystis* já foi verificada por diversos autores com base em vários marcadores, incluindo 16S rDNA (HERRY; NASRI; BOUAÏCHA, 2008; LEE; BAE, 2002; LÈPERE; WILMOTTE; MEYER, 2000; NEILAN et al., 1997; OTSUKA et al., 1998; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001), 16S-23S-ITS rDNA (HAANDE et al., 2007; HERRY; NASRI; BOUAÏCHA, 2008; OTSUKA et al., 1999; SANCHIS et al., 2005; YOSHIDA et al., 2008; ZHANG et al., 2007), PC-IGS (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001; HAANDE et al., 2007; SANCHIS et al., 2005) e *rpoC1* (YOSHIDA et al., 2008).

Considerando esta não correspondência entre a variabilidade fenotípica e genética no grupo, e baseando-se na delimitação de espécies por hibridização DNA-DNA do Código de Nomenclatura de Bactérias e na filogenia do marcador 16S rDNA, Otsuka et al. (2001) propuseram a união de seis morfoespécies deste gênero, *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* Kützing, *M. novacekii* Komárek (Compère), *M. viridis* (A. Braun) Lemmermann e *M. wessenbergii* Komárek (Komárek) em um táxon único.

Da mesma forma que o observado para os dados de morfologia, também não foi verificada correspondência significativa entre a diversidade genética das morfoespécies de *Microcystis* e características bioquímicas ou de produção de toxinas (OTSUKA et al., 1998, 1999; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001; YOSHIDA et al., 2006).

A ocorrência de transferência lateral de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários no gênero *Microcystis* vem sendo estudada, especialmente para os genes codificantes das peptídeo sintetases responsáveis pela produção das toxinas microcistinas (FEWER et al., 2007; TANABE et al., 2004). Porém, ainda são escassos estudos investigando a possibilidade de ocorrência deste evento em outras regiões do genoma.

O gênero *Geitlerinema*, foi inicialmente estabelecido como um subgênero de *Phormidium* por Anagnostidis e Komárek (1988). Anagnostidis (1988) elevou o táxon ao nível de gênero dentro da família Pseudanabaenaceae. Este gênero inclui cianobactérias filamentosas com tricomas homocitados, sem ramificações verdadeiras, retos ou flexuosos e com movimento deslizante ou oscilante (SANT'ANA; BRANCO; AZEVEDO, 2006) e está incluso na ordem Oscillatoriales de acordo com a classificação de Anagnostidis e Komárek (1985).

Geitlerinema é cosmopolita, inclui representantes de água doce, salobra, salgada e hipersalina (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2007a; MARGHERI et al., 2003; TORGAN; PAULA 1994). Suas espécies podem apresentar ampla variabilidade genética que, muitas vezes, não é refletida em sua morfologia (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2009a; MARGHERI et al., 2003; WOOD et al., 2002).

As espécies *Geitlerinema amphibium* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis e *G. unigranulatum* (R. N. Singh) Komárek e Azevedo são espécies morfológicamente semelhantes que, segundo Komárek e Anagnostidis (2005), poderiam ser diferenciadas por suas dimensões celulares e número de grânulos de cianoficinas próximos à parede celular.

Entretanto, Bittencourt-Oliveira et al. (2007a, 2009a) demonstraram que as medidas máximas e mínimas das dimensões celulares destas duas morfoespécies se sobrepunham. O número de grânulos de cianoficina próximos à parede também não apresentou variação e não permitiu distinção entre as espécies.

Além da análise da morfologia, Bittencourt-Oliveira et al. (2007a), analisaram as linhagens de ambas as espécies através de DNA *fingerprinting* e demonstraram que geneticamente as morfoespécies também não se distinguiram uma da outra. Os autores sugeriam então que *G. unigranulatum* fosse tratada como sinônimo de *G. amphibium*.

Posteriormente, Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) confirmaram estes resultados através de análises por microscopia óptica, ultraestrutura e seqüenciamento do PC-IGS destas mesmas linhagens. Neste mesmo trabalho, duas linhagens destacaram-se por terem apresentado o espaçador intergênico (IGS) mais curto e a região codificante (genes *cpcB* e *cpcA*) bastante divergente quando comparadas às outras linhagens. Os autores discutiram que, apesar da ausência de diferenças morfológicas, baseando-se somente em informações deste *operon*, estas linhagens poderiam representar uma espécie distinta de *Geitlerinema*. Porém consideraram que para a confirmação desta hipótese a análise dos genes ribossomais seria necessária, pois esta variação poderia também ter sido promovida pela transferência lateral do marcador PC-IGS.

Dada sua relevância como marcador, o envolvimento do PC-IGS na transferência lateral de genes precisa ser investigado, pois, caso confirmado, tornaria inviável sua utilização para inferências filogenéticas e demais estudos taxonômicos e comprometeria os dados já obtidos com base nele.

Assim, considerando-se as dificuldades enfrentadas pelos estudos baseados em caracteres morfológicos em cianobactérias, a relevância da busca por marcadores mais estáveis em relação à transferência lateral de genes em procariotos, a importância do marcador PC-IGS nos estudos filogenéticos com cianobactérias e a necessidade de investigação de sua participação na transferência lateral de genes a presente dissertação teve como hipótese e objetivos:

Hipótese:

O *operon* da ficocianina (PC), ou parte dele, foi transferido lateralmente durante sua história evolutiva.

Objetivo Geral:

- Investigar a transferência lateral de genes do *operon* da ficocianina (PC) em *Geitlerinema* e *Microcystis* comparando-se as filogenias produzidas através dos *loci* 16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS.

Objetivos Específicos:

- Inferir a filogenia molecular de linhagens brasileiras *Microcystis* e *Geitlerinema* através dos *loci* 16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS.
- Investigar as relações filogenéticas entre populações brasileiras de *Microcystis* e *Geitlerinema* com as de outras localidades geograficamente distintas através de sequências disponíveis no GenBank.
- Contribuir para o conhecimento da diversidade genética de cianobactérias de regiões tropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagens e condições de cultivo

As linhagens clonais e não axênicas utilizadas neste trabalho são pertencentes ao *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo* (BCCUSP) do Laboratório de Cianobactérias - Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, USP.

Foram analisadas 12 linhagens de *Geitlerinema amphibium* e *G. unigranulatum* (Figura 1) e oito de *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* Komárek et al. e *M. wesenbergii* (Figura 2). A designação de morfoespécies (segundo Bittencourt-Oliveira 2001, 2009a), o local de origem das linhagens, bem como o número de acesso das sequências no GenBank encontram-se na Tabela 1. A caracterização morfológica das linhagens de *Geitlerinema* e *Microcystis* sequenciadas neste trabalho encontram-se em Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) e Bittencourt-Oliveira et al. (2001), respectivamente.

As linhagens foram mantidas em câmaras climáticas (mod. 122FC, EletroLab, São Paulo, Brasil) com condições controladas de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo 14:10hs claro:escuro e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (fotômetro LI-COR, mod. LI-250), em meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al., 1979), pH 7.4, modificado por Bittencourt-Oliveira (2000).

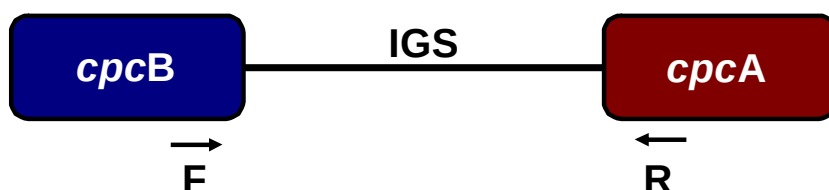
2.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico foram centrifugados aproximadamente 3ml dos cultivos de cada linhagem em fase exponencial de crescimento. Foi utilizado o tampão CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) 2% (m/v) (ROGERS; BENDICH, 1985) com incubação a 60°C por 30 minutos. Foi realizada a purificação com a adição de 60 μl de clorofórmio-isoamílico (24:1) seguida de agitação e centrifugação (14.000 rpm por cinco minutos a 25°C). Em seguida, foram adicionados 5 μl de RNase (10 mg/ μl) e realizada uma nova incubação a 37° por 15 minutos. O DNA foi finalmente precipitado com isopropanol e eluído em 50 μl do tampão TE (Tris-EDTA).

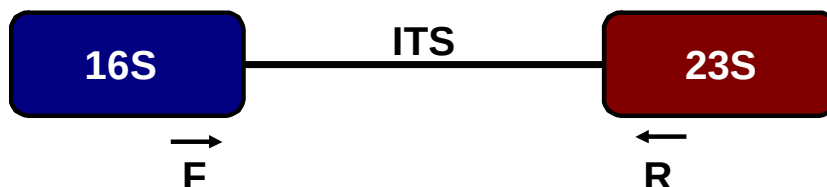
2.3. Amplificação de DNA (PCR)

A amplificação do DNA genômico foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando-se kit pureTaq Ready-To-Go PCR Beads TM (GE Healthcare, Fairfield, CT), segundo recomendações do fabricante. Em cada reação foram adicionados 5 a 10 ng do DNA extraído e 20 μ M de cada *primer*. O volume final da reação foi de 25 μ L.

Foram utilizados dois conjuntos de *primers*, sendo o primeiro para amplificar a região do espaçador da ficocianina. Estes *primers* se anelam nos genes *cpcB* e *cpcA* e amplificam toda a extensão do espaçador IGS, de acordo com o esquema abaixo:



O segundo conjunto de *primers* foi utilizado para amplificar a região do espaçador interno transcrito dos genes ribossomais. Estes se anelam nos genes 16S rDNA e 23S rDNA e amplificam toda a extensão do espaçador ITS, de acordo com o esquema abaixo:



Os *primers* utilizados, suas seqüências, fonte de consulta e condições de amplificação encontram-se na Tabela 2. Todos os *primers* foram sintetizados por laboratórios especializados e adquiridos comercialmente. Reações de controle negativo foram realizadas sob as mesmas condições e utilizando os mesmos *primers* porém com ausência do DNA genômico.

2.4. Quantificação

A quantificação do DNA genômico e dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (2 μ g/ml), com fotodocumentação (EDAS 290 Kodak, Japão) e análise a partir do programa Kodak Digital

Science 1D 3.6 utilizando o marcador de concentração molecular Low DNA MassTM (Invitrogen, USA).

2.5. Purificação

Os fragmentos de DNA amplificados a serem utilizados no sequenciamento foram purificados utilizando o kit comercial Purelink (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segundo normas do fabricante. Quando necessário, as bandas de tamanho esperado foram extraídas do gel de agarose utilizando o kit QIAquick (Qiagen, Hilden, Germany) como recomendado pelo fabricante.

2.6. Sequenciamento do DNA

As regiões PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA das linhagens foram diretamente sequenciadas utilizando-se os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* com o Kit DYEnamic ET (GE Healthcare) e sequenciador 3100 ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo orientações do fabricante. Em cada reação foi utilizada cerca de 70ng do produto da PCR. As reações de sequenciamento foram realizadas em cada sentido (*forward* e *reverse*), até que não existissem ambiguidades em toda a extensão do fragmento de DNA investigado.

2.7. Análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas juntamente com outras selecionadas do GenBank utilizando o programa ClustalW dentro do programa BioEdit (HALL, 1999) e, posteriormente, inspecionadas e ajustadas manualmente.

Foram selecionadas no GenBank apenas sequências publicadas e que apresentassem o tamanho mínimo para realização das análises. Para as análises de *Geitlerinema* com o marcador 16S-23S-ITS rDNA nenhuma sequência foi selecionada devido à ausência destas em artigos publicados ou com identificação de morfoespécies que pudessem ser confirmadas.

As distâncias evolutivas entre as sequências foram calculadas por *P distance* no programa MEGA 4.0.2 (TAMURA et al., 2007). Para a avaliação do sinal filogenético foi realizado o teste de permutação PTP (*Permutation Tail Probability Test*) (ARCHIE, 1989) com 1000 repetições e índice de confiança de 99% ($p < 0,01$). O número de sítios informativos e os índices de consistência (IC) de retenção (IR) e de consistência rescalonado (RC) foram

obtidos pela busca baseada na parcimônia com auxílio do programa PAUP* versão 4.0b10 (SWOFFORD 2000).

Para comparar a variação entre os marcadores nas diferentes matrizes de alinhamento foi utilizado o índice de informação de Shannon-Wiener (H_x) (SHANNON; WEAVER, 1949), definido como:

$$H_x = - \sum_{i=1}^4 p_i \ln p_i$$

Onde p é a proporção de A, T, C e G.

Os valores para cada sítio foram calculados e plotados como gráfico de entropia pelo programa BioEdit.

2.8. Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas com os programas PAUP* versão 4.0b10 (SWOFFORD 2000) e Mr. Bayes v3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003). Modelos evolutivos apropriados para cada matriz de alinhamento foram selecionados com o uso dos programas jModelTest (POSADA, 2008) e MrModeltest 2.2 (NYLANDER, 2004) utilizando-se o critério AIC (Akaike information criterion).

O dendrograma baseado no método de Neighbor-Joining (NJ) (SAITON; NEI 1987) foi construído seguindo o modelo de Tamura e Nei (1993). As árvores de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV) foram obtidas por pesquisa heurística. Árvores iniciais foram obtidas por *stepwise* oie com adição de sequências aleatória (10 repetições) usando o algoritmo *tree bisection-reconnection* (TBR) *branch-swapping*. Nas análises de NJ e MP os *gaps* foram tratados como dados ausentes e todos os sítios foram igualmente ponderados. Análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) foram realizadas com 2000 réplicas pelos métodos descritos acima. Para as análises de MV com linhagens de *Microcystis* incluindo sequências selecionadas do GenBank o número de réplicas foi reduzido para 200 devido a limitações computacionais. Os valores de *bootstrap* foram considerados baixos quando menores que 70%, moderados de 71% a 90% e alto acima de 90%. Apenas os valores acima de 70% foram apresentados nas figuras.

Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. As primeiras 2.500 gerações foram descartadas por *burn-in*. Os mesmos critérios aplicados para os valores de *bootstrap* foram

utilizados para os valores de probabilidade *a posteriori* (PP). Com isso, foram apresentados apenas valores de PP (multiplicado por 100) maiores de 70.

As linhagens *Spirulina subsalsa* Örsted PD2002/gca, AY575949 (PC-IGS); AY575935 (16S-23S-ITS rDNA) e *Cyanothece* sp. ATCC51142, CP000806 (PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA), foram utilizadas como grupo externo para a construção das árvores com sequências de *Geitlerinema* e *Microcystis*, respectivamente. Estas linhagens foram escolhidas por apresentarem sequências disponíveis para os dois marcadores utilizados neste trabalho e por estas apresentarem um nível de similaridade que possibilitou o alinhamento com o grupo interno.

2.8.1 Construção das árvores filogenéticas com sequências de *Geitlerinema*

Para as análises de *Geitlerinema* com as sequências do PC-IGS foram obtidas duas matrizes de alinhamento e duas árvores filogenéticas (segundo a metodologia acima descrita) contendo os seguintes conjuntos de sequências:

- a)** Apenas as linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho. Esta topologia foi construída visando obter árvores que contivessem as mesmas linhagens para os dois marcadores.
- b)** As linhagens sequenciadas neste trabalho mais as selecionadas do GenBank.

2.8.2 Construção das árvores filogenéticas com sequências de *Microcystis*

Para as análises de *Microcystis* com as sequências tanto do PC-IGS quanto do 16S-23S-ITS rDNA foram obtidas três matrizes de alinhamento e três árvores filogenéticas (segundo a metodologia acima descrita) contendo os seguintes conjuntos de sequências:

- a)** Apenas as sequências que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho.
- b)** As linhagens sequenciadas neste trabalho e algumas selecionadas no GenBank. Estas árvores apresentam as mesmas linhagens para os dois marcadores.
- c)** As linhagens sequenciadas neste trabalho e todas as demais as selecionadas do GenBank.

3. RESULTADOS

3.1. Análises filogenéticas das linhagens de *Geitlerinema*

Foram obtidas 16 sequências das linhagens de *Geitlerinema* spp., sendo quatro para o marcador PC-IGS e 12 para o 16S-23S-ITS rDNA (Tabela 1).

As topologias das árvores obtidas pelos diferentes métodos (NJ, MP, MV e Bayesiana) foram muito semelhantes. Assim, apenas as árvores filogenéticas obtidas a partir da análise Bayesiana foram apresentadas (Figuras 3-4 e 7).

3.1.1. Filogenia das linhagens de *Geitlerinema* baseada no PC-IGS

O fragmento obtido para o marcador PC-IGS variou entre 427 e 637 pares de bases devido à presença de inserções e deleções e incluiu trechos dos genes *cpcB* e *cpcA* e toda a extensão do espaçador IGS.

Para este marcador foram obtidas duas árvores, a primeira contendo apenas as linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho (vide material e métodos 2.8.1 a) (Figura 3) e a segunda adicionando-se a estas as linhagens selecionadas do GenBank (vide material e métodos 2.8.1 b) (Figura 4).

A árvore filogenética resultante da análise com maior número de sequências (Figura 4) não alterou o posicionamento relativo das linhagens e apresentou menos politomias. Sendo assim, esta árvore (Figura 4) e sua matriz de alinhamento (PC-IGS *Geitlerinema*) foram utilizadas para apresentação dos resultados e desenvolvimento da discussão.

A matriz de alinhamento (PC-IGS *Geitlerinema*) está apresentada no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3. O teste PTP confirmou a presença de sinal filogenético e os índices IC, IR e RC indicaram um baixo índice de homoplasias (Tabela 3).

Na árvore filogenética obtida a partir da análise das sequências deste marcador formaram-se dois agrupamentos principais (I e II) (Figura 4).

O grupo I incluiu três linhagens, uma de *G. amphibium* (BCCUSP80) (sequenciada neste trabalho) e duas de *G. unigranulatum* (BCCUSP352 acesso FJ545643 e BCCUSP94 acesso FJ545642) (obtidas do GenBank). Estas linhagens apresentaram a região correspondente ao espaçador IGS mais curto, com apenas 84 pares de bases, enquanto que as demais linhagens apresentaram até 294 pares de bases. Tais linhagens também mostraram-se

evolutivamente bastante distantes das demais. A distância calculada por *P distance* entre estas e as linhagens do grupo II foi de até 0,098 enquanto que dentre as linhagens do grupo II este valor não ultrapassou 0,056.

O grupo II incluiu todas as demais linhagens e pôde ser subdividido em dois agrupamentos menores (A e B). O grupo A incluiu apenas linhagens da morfoespécie *G. amphibuum*, enquanto que o B foi formado tanto por linhagens de *G. amphibuum* quanto de *G. unigranulatum*, além de duas linhagens de “*Oscillatoria* sp.” (identificadas por Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) como *Geitlerinema* sp.). A linhagem FP1 “*Planktothrix* sp.” (identificada por Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) como *Geitlerinema* sp.) formou um ramo independente dentro do agrupamento II como grupo irmão dos sub-grupos A e B.

O gráfico do índice de Shannon-Wiener (Hx) mostrou a presença de sítios mais conservados e mais variáveis distribuídos ao longo do alinhamento, além de uma região bastante densa em sítios variáveis dentro do espaçador IGS (aproximadamente entre os nucleotídeos 200 e 410) que corresponde à região ausente nas sequências BCCUSP 80, 352 e 94 (Figura 5).

3.1.2. Filogenia das linhagens de *Geitlerinema* baseada no 16S-23S-ITS rDNA

Os fragmentos obtidos para o marcador 16S-23S-ITS rDNA variaram entre 498 e 541 pares de bases devido à presença de inserções e deleções e compreenderam trechos do 16S rDNA e do espaçador 16S-23S-ITS RDNA. Devido à má qualidade apresentada pelas extremidades das sequências, a região referente ao gene 23S rDNA foi descartada. Todas as linhagens apresentaram o RNA transportador tRNA(Ile) inserido no ITS.

A matriz de alinhamento utilizada (16S-23S-ITS rDNA *Geitlerinema*) está apresentada no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3. O teste PTP confirmou a presença de sinal filogenético e os índices IC, IR e RC indicaram baixo índice de homoplasias (Tabela 3).

O gráfico do índice de Shannon-Wiener (Hx) mostrou a presença de agrupamentos de sítios mais conservados e mais variáveis ao longo do alinhamento e duas regiões de aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos de sítios invariáveis. A primeira região (aproximadamente entre as posições 50 e 110) encontra-se dentro do trecho do 16S e a segunda (aproximadamente entre 260 e 330) corresponde ao trecho do tRNA (Ile) (Figura 6).

Na árvore resultante das sequências deste marcador também foi observada a formação de dois agrupamentos principais (I e II) (Figura 7). O grupo I incluiu duas linhagens da

morfoespécie *G. unigranulatum*. Já o II reuniu linhagens de ambas as morfoespécies e pode ser dividido em dois (A e B). O grupo A apresentou apenas linhagens de *G. amphibium* e o B duas *G. amphibium* e uma *G. unigranularum*. A linhagem de *G. amphibium* BCCUSP80 formou um ramo independente como grupo irmão do grupo II.

De forma semelhante ao que ocorreu na filogenia baseada no PC-IGS, as linhagens do grupo I mostraram-se evolutivamente bastante distantes das do grupo II. A distância calculada por *P distance* entre as linhagens inclusas no grupo I em relação àquelas inclusas no II foi de até 0.162, enquanto que dentre as do II a maior distância foi de 0.089.

3.1.3. Comparação entre as filogenias baseadas no PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA para linhagens de *Geitlerinema*

O marcador 16S-23S-ITS rDNA mostrou-se mais variável que o PC-IGS. O PC-IGS apresentou índices de homoplasias levemente mais baixos, porém ambos apresentaram o valor do IC alto. Portanto, para ambos os marcadores não foram indicados problemas com homoplasias (Tabela 3).

Comparando-se as árvores filogenéticas construídas pelos marcadores PC-IGS (Figura 4) e 16S-23S-ITS rDNA (Figura 7) algumas diferenças puderam ser observadas. A linhagem de *G. amphibium* BCCUSP80 foi inserida no grupo I na árvore do PC-IGS enquanto que na árvore do 16S-23S-ITS rDNA posicionou-se como grupo irmão do grupo II. Entretanto, deve-se notar que na árvore baseada no PC-IGS os valores de *bootstrap* e PP foram mais altos. Diferenças de posicionamento também foram observadas dentro dos subgrupos do agrupamento II. As linhagens de *G. amphibium* BCCUSP 85 e 91 foram inclusas no subgrupo B na árvore do PC-IGS e no A na do 16S-23S-ITS rDNA, porém o posicionamento da linhagem BCCUSP91 na árvore do 16S-23S-ITS rDNA não é bem suportado estatisticamente.

Apesar destas divergências, as árvores filogenéticas baseadas nos dois marcadores foram muito semelhantes. Em ambas houve a formação de dois grupos principais incluindo relativamente as mesmas linhagens. Destaca-se o fato de que as linhagens de *G. unigranulatum* BCCUSP 94 e 352, que contêm o espaçador IGS mais curto e formam um grupo bem separado na árvore do PC-IGS, apresentaram comportamento semelhante na árvore resultante da análise do 16S-23S-ITS rDNA. Além disso, tanto para o marcador da ficocianina quanto para o dos genes ribossomais estas linhagens apresentaram aproximadamente o dobro da distância evolutiva observada entre as demais linhagens,

demonstrando que tratam-se de linhagens geneticamente divergentes. Apesar desta divergência, todas as linhagens de *Geitlerinema* estudadas são morfolologicamente indistintas.

A congruência entre as árvores obtidas pelos dois marcadores analisados não indicaram a ocorrência de transferência lateral de genes nas linhagens utilizadas neste estudo.

3.2. Análises filogenéticas das linhagens de *Microcystis*

Foram obtidas oito sequências das linhagens de *Microcystis* spp., sendo todas para o marcador 16S-23S-ITS rDNA (Tabela 1).

Apenas as árvores filogenéticas obtidas a partir da análise Bayesiana foram apresentadas.

3.2.1. Filogenia das linhagens de *Microcystis* baseada no PC-IGS

Para este marcador foram obtidas árvores filogenéticas baseadas em três conjuntos de sequências, sendo:

- a) Apenas as linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho (Figura 8);
- b) As linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho e algumas selecionadas do GenBank (Figura 9);
- c) As linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho e todas as demais selecionadas do GenBank (Figura 10).

Na árvore resultante das análises com o conjunto de sequências “a”, as linhagens dividiram-se em dois grupos principais (I e II) (Figura 8). A posição da linhagem BCCUSP011 variou entre as topologias resultantes dos diferentes métodos empregados (NJ, MP, MV e Bayesiana) posicionando-se, ora como um ramo politômico em relação aos ramos dos grupos I e II e ora como grupo irmão do grupo I como ocorrido na análise Bayesiana (Figura 8). Porém em ambas situações seu posicionamento não apresentou suporte estatístico relevante. Com a adição de outras sequências do GenBank o posicionamento da BCCUSP011 foi definido e o agrupamento das demais linhagens não alterado (Figuras 9 e 10).

Na árvore resultante das análises com o conjunto de sequências “b”, formaram-se quatro grupos principais (I a IV) (Figura 9). Estes mesmos agrupamentos formaram-se com a utilização dos diferentes métodos (NJ, MP, MV e Bayesiana), porém o posicionamento destes variou de um método para o outro. A análise Bayesiana foi a que apresentou a árvore mais

bem resolvida, apresentando menos politomias. Dessa forma a topologia oriunda da análise Bayesiana foi utilizada para apresentação da árvore filogenética (Figura 9).

A matriz de alinhamento das sequências analisadas que deu origem a esta árvore (PC-IGS *Microcystis* A) está no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3. O teste PTP confirmou a presença de sinal filogenético e os índices IC, IR e RC indicaram baixo índice de homoplasias (tabela 3).

Para a construção da árvore filogenética com o conjunto de sequências “c” foi utilizada apenas a análise Bayesiana (Figura 10). A topologia desta árvore manteve os agrupamentos principais das árvores menores. Por conter o maior número de sequências e apresentar bom suporte estatístico na maioria dos ramos, esta topologia e sua respectiva matriz de alinhamento (PC-IGS *Microcystis* B) foram utilizadas para apresentação dos resultados da topologia da árvore e desenvolvimento da discussão. A matriz de alinhamento das sequências analisadas (PC-IGS *Microcystis* B) está apresentada no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3.

O gráfico do índice de Shannon-Wiener (Hx) resultante para esta matriz mostrou a presença de vários sítios com pouca variação e alguns com maior variação distribuídos ao longo do alinhamento. Destacou-se também a presença de uma concentração de sítios mais variáveis dentro do trecho do gene *cpcA* (aproximadamente entre os nucleotídeos 440 e 520) (Figura 11).

Na árvore filogenética resultante formaram-se sete grupos principais (I a VII) (Figura 10), sendo que o grupo I conteve todas as linhagens de *M. wesenbergii*; o II *M. aeruginosa*, *M. panniformis*, *M. viridis* e *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner; o III *M. aeruginosa* e *M. novacekii*; o IV *M. aeruginosa* e *M. flos-aquae*; o V *M. aeruginosa* e uma *Microcystis* sp. e os grupos VI e VII foram formados somente por linhagens de *M. aeruginosa*. A linhagem NPLS-1 (*Microcystis* sp.) formou um ramo independente como grupo irmão dos grupos II e III. A linhagem de *M. aeruginosa* NIVA-CYA 497 formou um ramo independente politômico ao grupo VI e ao conjunto dos grupos II a V. Já a linhagem de *M. aeruginosa* NIVA-CYA 482 formou um ramo independente como grupo irmão do conjunto que inclui a linhagem NIVA-CYA 497 e os grupos II a VI. A linhagem de *M. novacekii* UAM 259 formou um ramo isolado de todos os grupos.

Verificou-se portanto, que as linhagens de *M. wesenbergii* formaram um clado monofilético nesta árvore (Figura 10, grupo I) estando em correspondência com os dados morfológicos, porém esta correspondência não foi observada para nenhuma das outras morfoespécies de *Microcystis* analisadas.

3.2.2. Filogenia das linhagens de *Microcystis* baseada no 16S-23S-ITS rDNA

O fragmento obtido para o marcador 16S-23S-ITS rDNA variou entre 468 e 470 pares de bases devido à presença de inserções e deleções. Compreendeu trechos do 16S rDNA e do espaçador ITS. Devido à má qualidade apresentada pelas extremidades das sequências, a região referente ao gene 23S rDNA foi descartada. Todas as linhagens apresentaram o RNA transportador tRNA(Ile) inserido no ITS. Por ser idêntica entre linhagens sequenciadas neste trabalho e ausente em muitas das sequências do GenBank, a região do 16S rDNA foi desprezada durante a realização dos alinhamentos.

Da mesma forma que para o PC-IGS, com este marcador também foram obtidas árvores filogenéticas baseadas em três conjuntos de sequências, sendo:

- a) As linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho (Figura 12);
- b) As linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho e algumas selecionadas do GenBank (Figura 13);
- c) As linhagens que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste trabalho e todas as demais selecionadas do GenBank (Figura 14).

Na árvore resultante das análises com o conjunto de sequências “a”, as linhagens se dividiram em dois grupos principais (I e II) (Figura 12). As topologias obtidas pelos diferentes métodos de inferência (NJ, MP, MV e Bayesiana) foram idênticas. O agrupamento das linhagens foi mantido nas árvores obtidas com a utilização de outras sequências selecionadas do GenBank (Figuras 13 e 14). A única exceção foi a linhagem BCCUSP200 que na topologia com maior número de sequências formou uma ramo isolado (Figura 14).

Na árvore resultante das análises com o conjunto de sequências “b”, formaram-se apenas quatro grupos (I a IV) com suporte estatístico significativo (valor de bootstrap e/ou PP > 70) (Figura 13). Estes grupos foram formados pelos diferentes métodos de inferência aplicados (NJ, MP, MV e Bayesiana), porém o posicionamento destes e das linhagens não inclusas nos agrupamentos variou de um método para o outro. A análise Bayesiana, novamente, foi a que gerou a topologia com menos politomias, assim, esta análise foi selecionada para a apresentação da árvore filogenética (Figura 10).

A matriz de alinhamento das linhagens desta árvore (16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* A) está apresentada no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3. Observa-se que neste caso o teste PTP também confirmou a presença de sinal filogenético, porém o número de

árvores igualmente parcimoniosas foi bastante alto (1560 árvores) e os índices IC e RC demonstram um grau moderado de homoplasias (Tabela 3.).

Da mesma forma que ocorreu com o PC-IGS, para a construção da terceira árvore foi utilizada apenas a análise Bayesiana (Figura 10).

A árvore resultante das análises com o conjunto de sequências “c” (Figura 14) manteve os agrupamentos que tiveram suporte estatístico nas outras duas menores (exceto para BCCUSP200), apresentou relativamente um menor número de politomias e bom suporte estatístico na maioria dos ramos. Assim esta árvore e sua matriz de alinhamento (16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* B) foram utilizadas para apresentação dos resultados. A matriz de alinhamento (16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* B) está apresentada no Anexo A e seus dados resumidos na Tabela 3.

O gráfico do índice de Shannon-Wiener (Hx) mostrou a presença de sítios mais e menos variáveis distribuídos ao longo do alinhamento. Nele destacou-se a presença de uma região contendo vários sítios invariáveis (aproximadamente entre os nucleotídeos 110 e 175), região que corresponde ao RNA transportador tRNA (Ile) (Figura 15).

Na árvore filogenética obtida a partir da análise destas sequências formaram-se oito grupos principais (I a VIII) (Figura 14). A saber: o grupo I foi formado por linhagens de *M. wesenbergii* e uma de *M. novacekii*; o II por *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. wesenbergii* e *M. viridis*; o III por *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* e *Microcystis* sp.; IV e V foram formados por linhagens de *M. aeruginosa* e *Microcystis* sp. e VI e VII apenas por *M. aeruginosa*. No grupo VIII ficaram agrupadas linhagens de *M. flos-aquae* e *M. viridis*.

A linhagem M31 de *M. aeruginosa* formou um ramo isolado como grupo irmão dos grupos I e II. Sete linhagens (NIES 101, Brown, NT1, UAM 246, UAM 256, UAM 255 e BCCUSP200) formaram politomias e não foram inseridas em nenhum dos agrupamentos.

Nesta árvore não foi observada a formação de clados monofiléticos para nenhuma das morfoespécies de *Microcystis* analisadas, indicando a não correspondência entre os dados morfológicos e a filogenia.

3.2.3. Comparação entre as filogenias baseadas no PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA para linhagens de *Microcystis*

O marcador 16S-23S-ITS rDNA mostrou-se mais variável que o PC-IGS. O teste PTP indicou a presença de sinal filogenético para ambos os marcadores.

Comparando-se os dados das matrizes PC-IGS *Microcystis* A e 16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* A (Tabela 3), que incluíram as mesmas linhagens, notou-se que o marcador 16S-23S-ITS rDNA apresentou índices moderados de homoplasias e um número muito grande de árvores mais parcimoniosas, o que não ocorreu com marcador PC-IGS (tabela 3).

Comparando-se as árvores filogenéticas obtidas pela análise com o maior número de sequências com os marcadores PC-IGS (Figura 10) e 16S-23S-ITS rDNA (figura 14), notou-se que a árvore baseada no marcador da ficocianina apresentou um número menor de politomias.

O marcador PC-IGS formou um clado monofilético com alta PP contendo todas as linhagens de *M. wesenbergii* (Figura 10, grupo I). Já na árvore obtida pela análise do 16S-23S-ITS rDNA, três linhagens de *M. wesenbergii* (BCCUSP011, NIES 107 e NIES 604) não foram inclusas no grupo que incluiu a maioria as linhagens desta morfoespécie (Figura 14, grupo I). Além disso, este grupo apresentou PP apenas moderada e ainda incluiu uma linhagem de *M. novacekii* (UAM 259) que havia formado um ramo isolado na árvore do PC-IGS (Figura 10).

Apesar destas diferenças no posicionamento de algumas linhagens, pode-se observar correspondência entre as árvores resultantes da utilização dos dois marcadores, PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA.

Considerando-se as linhagens que estão presentes em ambas as árvores (linhagens marcadas com ** nas figuras 10 e 14), observou-se que as linhagens do grupo I do PC-IGS correspondem às mesmas do grupo I do 16S-23S-ITS rDNA, com exceção de BCCUSP011. As do II do PC-IGS, exceto NIES 99 e 102, correspondem às dos grupos VI, VII e VIII e às linhagens que não foram inclusas em nenhum agrupamento pelo 16S-23S-ITS rDNA. As linhagens inseridas no grupo III do PC-IGS ficaram agrupadas dentro do II do 16S-23S-ITS rDNA. Já as dos grupos IV, V e VI do PC-IGS correspondem àquelas inclusas no grupo III do 16S-23S-ITS rDNA.

De forma semelhante ao observado para as linhagens de *Geitlerinema*, a congruência entre as árvores obtidas pelos dois marcadores analisados não indicaram a ocorrência de transferência lateral do *operon* da ficocianina nas linhagens de *Microcystis* utilizadas neste estudo.

4. DISCUSSÃO

A ampla plasticidade e variabilidade fenotípica, de habitats e de processos fisiológicos apresentada pelas cianobactérias, e a não correspondência destas com sua variabilidade genética, tornam a taxonomia e a filogenia, baseadas em caracteres morfológicos, em muitos casos, inviáveis para este grupo (OTSUKA et al., 2000, PREMANANDH et al., 2006; WILLAME et al., 2006). Além disso, como ocorre para outros organismos procarióticos os caracteres morfológicos disponíveis para avaliação são poucos e geralmente insuficientes para uma caracterização adequada dos táxons.

Neste contexto, a filogenia molecular tornou-se uma ferramenta de extrema relevância, pois vem proporcionando dados e ferramentas que possibilitam tanto a classificação mais adequada dos grupos, quanto a exploração da diversidade genética e a reconstrução da história evolutiva das cianobactérias e dos demais procariotos (CASAMATTA et al., 2005; NEILAN et al., 1994, THOMAZEAU et al., 2010; WILLAME et al., 2006).

Apesar de suas vantagens, as análises baseadas em dados moleculares dependem de uma série de fatores, tais como, a escolha de um marcador adequado para o conjunto de dados e a realização de um cuidadoso alinhamento das sequências, para que sejam eficientes na reconstrução de filogenias consistentes (BRINKMAN; LEIPE; 2001).

Dentre os desafios enfrentados na seleção de um marcador destaca-se, especialmente para os procariotos, a necessidade da avaliação da possibilidade deste marcador ter sido transferido lateralmente durante sua história evolutiva (GRIBALDO; BROCHIER, 2009). Uma preocupação crescente entre os pesquisadores que utilizam as técnicas moleculares para inferência de filogenias em cianobactérias é a possibilidade da ocorrência da transferência lateral do marcador dos genes da ficocianina PC-IGS (HAVERKAMP et al., 2008, 2009; JANSON; GRANÉLI, 2002; SIX et al., 2007).

No presente trabalho foi avaliada a hipótese da ocorrência de transferência lateral do *operon* da ficocianina comparando-se as árvores filogenéticas de linhagens de *Geitlerinema* e *Microcystis*, obtidas com sequências do marcador PC-IGS, com aquelas do 16S-23S-ITS rDNA.

Avaliando a filogenia baseada no PC-IGS de linhagens de *Geitlerinema*, Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) observaram que duas linhagens morfológicamente indistintas das demais formaram um grupo isolado na árvore, apresentaram o espaçador IGS bem mais curto e os trechos dos genes *cpcB* e *cpcA* bastante divergentes quando comparadas às demais

linhagens. Os autores sugeriram que a filogenia baseada nos genes ribossomais deveria ser investigada para confirmar se tais linhagens representavam realmente táxons geneticamente bastante distintos dos demais, ou se essa variabilidade do marcador PC-IGS poderia ter sido promovida por outro processo, como a transferência lateral de genes.

No presente estudo, a reconstrução da filogenia baseada no marcador PC-IGS destas mesmas linhagens de *Geitlerinema* com adição de outras sequenciadas demonstrou o mesmo padrão, ou seja, a formação de dois grupos principais e uma alta divergência genética entre as linhagens de um agrupamento e outro (Figura 4). De forma semelhante, a árvore filogenética obtida com as mesmas linhagens, porém baseada em sequências do 16S-23S-ITS rDNA também formou os dois grupos principais (Figura 7) e as linhagens do grupo I novamente apresentaram uma divergência genética bastante superior àquela observada dentre as demais linhagens estudadas, demonstrando uma alta congruência entre as árvores resultantes dos dois marcadores.

Em adição a estas, foram obtidas árvores filogenéticas baseadas nos marcadores PC-IGS (Figura 10) e 16S-23S-ITS rDNA (Figura 14) para linhagens de *Microcystis*. Neste caso as árvores foram também relativamente congruentes. Esta relevante congruência observada entre as árvores indicam uma história evolutiva comum entre os marcadores da ficocianina e dos genes ribossomais. Sendo assim, não foram encontradas evidências de que o marcador PC-IGS teria sofrido o processo de transferência lateral de genes.

A transferência de genes de forma horizontal é muito comum entre os procariotos, porém, não afeta da mesma forma todos os genes. Além disso, os genomas tendem a apresentar agrupamentos de genes com menor probabilidade de serem transferidos (GRIBALDO; BROCHIER, 2009; SHI; FALKOWSKI 2008). Considerando-se a importância da filogenia molecular para os procariotos, a busca por estes genes mais estáveis tem se tornado fundamental para a filogenia e taxonomia destes organismos (GRIBALDO; BROCHIER, 2009; MAKAROVA et al., 1999).

O marcador PC-IGS é amplamente utilizado em estudos de reconstrução filogenética em cianobactérias (BARKER et al., 2000; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001, 2009a; BOLCH et al., 1999; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; HANNDE et al., 2007; JONSON; GRANÉLI, 2002; MANEN; FALQUET, 2002; ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001; TAN et al., 2010; WU et al., 2010) e a comprovação de tenha sido transferido lateralmente comprometeria toda uma gama de dados já obtidos com base nele. Os resultados obtidos neste trabalho não corroboraram com esta hipótese e indicaram que o marcador da

ficocianina é estável e indicado para os estudos de taxonomia e filogenia de linhagens de *Geitlerinema* e *Microcystis*.

Apesar da correspondência observada entre as árvores resultantes das análises dos dois marcadores utilizados neste trabalho, algumas diferenças foram observadas.

Para as árvores obtidas com as linhagens de *Geitlerinema* a principal diferença observada está no posicionamento da linhagem de *G. amphibium* BCCUSP80. Entretanto deve-se notar que em ambas as árvores (Figuras 4 e 7) esta linhagem é a primeira a divergir na linha evolutiva e que na árvore do marcador dos genes ribossomais o suporte estatístico foi mais baixo. Portanto, provavelmente esta diferença de posicionamento se deve a um menor poder de resolução apresentando por este último marcador.

Entre as árvores obtidas para as linhagens de *Microcystis* (Figuras 10 e 14) foram encontradas diferenças no posicionamento de várias linhagens. Destacou-se o fato de que a árvore obtida pelo 16S-23S-ITS rDNA não ficou bem resolvida apresentando várias politomias.

Em ambos os casos as divergências de posicionamento das linhagens parecem estar ligadas a uma diferença de qualidade entre marcadores, ou seja, marcador PC-IGS além de resolver melhor a filogenia das linhagens de *Microcystis* ainda apresentou, tanto para as árvores filogenéticas de *Geitlerinema*, quanto para as de *Microcystis*, ramos mais bem suportados estatisticamente.

A presença de homoplasias, causadas por convergências, paralelismos ou reversões é um dos fatores que podem reduzir a qualidade de certos marcadores (PAGE; HOLMES, 1998). Os índices IC, IR e RC demonstraram que o marcador dos genes ribossomais foi mais homoplásico que o PC-IGS para ambos os gêneros estudados. No caso das linhagens de *Microcystis*, esta diferença foi mais relevante sendo também observado um baixo número de sítios informativos e um número muito alto de árvores mais parcimoniosas (tabela 3). Todas estas características favorecem o padrão de politomias apresentado pelas árvores baseadas no 16S-23S-ITS rDNA. Han et al. (2009) avaliando quatro marcadores moleculares (*rpoC1*, *hetR*, *rbcLX* e 16S-23S-ITS rDNA) em linhagens de *Nostoc* também verificaram que o marcador dos genes ribossomais foi o que apresentou o valor de IC mais baixo, sendo, portanto, o mais homoplásico.

Além das diferenças entre as árvores obtidas utilizando os dois marcadores, evidenciou-se uma maior dificuldade com o 16S-23S-ITS rDNA na obtenção dos dados, tanto nos processos de amplificação e sequenciamento dos fragmentos, quanto no alinhamento das sequências obtidas. Já o PC-IGS não apresentou

dificuldades nestes mesmos processos, caracterizando-se como um marcador de fácil manipulação em laboratório.

Ambos os marcadores utilizados neste trabalho apresentaram padrões complexos de substituição nucleotídica, apresentando tanto sítios bastante variáveis quanto regiões muito conservadas em seus fragmentos. Esta característica pode ser verificada tanto nos gráficos de índice de informação de Shannon-Wiener (Hx) (Figuras 5, 6, 11 e 15), quanto pelos modelos evolutivos selecionados para cada uma das matrizes (Tabela 3). Este fato pode explicar o melhor desempenho (gerando menos politomias) apresentado pela análise Bayesiana em comparação com os demais métodos de inferência filogenética utilizados. A análise Bayesiana tem maior poder de resolução de politomias e se adapta melhor a modelos evolutivos mais complexos e com mais parâmetros (HOLDER; LEWIS, 2003).

Nos gráficos de índice de informação de Shannon-Wiener (Hx) do marcador 16S-23S-ITS rDNA pode-se ainda notar que o RNA transportador tRNA(Ile) corresponde a uma região bastante conservada, tanto para as linhagens de *Geitlerinema* (Figuras 6) quanto para as de *Microcystis* (Figura 15). Assim o marcador 16S-23S-ITS rDNA apresentou regiões relativamente longas de sítios não variáveis intercaladas com as regiões variáveis (Figuras 6 e 15). Esta distribuição mais complexa e a maior proporção de sítios invariáveis também pode ter contribuído para o pior desempenho apresentado pelo marcador em comparação ao PC-IGS.

Além disso, a escolha de modelos evolutivos diferentes para matrizes contendo as mesmas linhagens (Tabela 3) demonstraram que os marcadores não apresentaram o mesmo padrão de evolução. Diferentes regiões do genoma podem apresentar padrões diversos de evolução. Esta diferença de padrão, em alguns casos, promove o processo de *incomplete lineage sorting*, que se caracteriza quando a taxa de fixação da linhagem gênica diverge da taxa de fixação do táxon (GOGARTEN; ZHAXYBAYEVA, 2008; MADDISON; KNOWLES, 2006;).

Maddison e Knowles (2006) demonstraram que mesmo um marcador apresentando sinal filogenético significativo, como ocorreu para o 16S-23S-ITS rDNA neste trabalho, pode estar sob este processo e, conseqüentemente, a filogenia obtida a partir de suas sequências não refletirá a filogenia do táxon. Os autores ressaltam ainda que quanto menor o tempo de divergência entre os táxons maior as chances das linhagens gênicas estarem sujeitas ao *incomplete lineage sorting*. Com isso, os estudos envolvendo táxons de nível infragenéricos, como o presente trabalho estão mais suscetíveis a este problema.

Outro problema relacionado ao uso do marcador 16S-23S-ITS rDNA é variabilidade intragenômica que o marcador pode apresentar em algumas linhagens. Os *operons* contendo os genes ribossomais e suas regiões espaçadoras estão normalmente presentes em múltiplas cópias dentro dos genomas. Em eucariotos estas cópias são regidas por um processo chamado “evolução em conserto”, que tende a manter as múltiplas cópias idênticas (SMITH, 2000).

Em cianobactérias e outras bactérias o *operon* dos genes ribossomais, em geral, também se apresenta em várias cópias no genoma, Porém estas cópias nem sempre apresentam a mesma sequência e o mesmo número de nucleotídeos (BOYER; FLECHTNER; JOHANSEN, 2001; CASE et al., 2007; ENGEL; COATES; GERWICK, 2010). Boyer; Flechtner e Johansen (2001) identificaram duas cópias diferentes do espaçador ITS em uma linhagem unialgal de *Calothrix parietina* (Nägeli) Thuret, sendo que estas apresentaram tamanhos iguais, mas sequências divergentes, em *Scytonema hyalinum* Gardner encontraram três cópias com diferenças nas sequências e também no tamanho do fragmento. Engel; Coates e Gerwick (2010) amplificaram e clonaram fragmentos dos genes ribossomais de células isoladas de tricomas de *Lyngbya* e encontraram duas diferentes cópias do gene 16S rDNA dentro da mesma célula. Este fato comprovou que o *operon* pode apresentar variações intragenômicas. Boyer; Flechtner e Johansen (2001) argumentam ainda que cópias com determinadas sequências podem ser favorecidas no *annealing* dos *primers* e serem preferencialmente amplificadas em detrimento das outras, o que consequentemente traria problemas para as filogenias baseadas nestas sequências.

O uso do sequenciamento direto do produto de PCR pode ter mascarado esta diversidade para linhagens estudadas no presente estudo e pode também estar relacionado com as diferenças entre filogenias obtidas em comparação com o marcador PC-IGS especialmente para as linhagens de *Microcystis*.

Em uma busca realizada no banco de dados Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) observou-se que entre genomas completos de cianobactérias sequenciados até o momento, o *operon* da ficocianina também pode apresentar mais de uma cópia. O mais comum nos genomas presentes neste banco de dados é presença de duas cópias. Porém estudos sobre variações intragenômicas para o marcador PC-IGS e sua influência sobre os estudos de filogenia ainda não estão disponíveis na literatura.

Além disso, apesar de o marcador PC-IGS apresentar menos homoplasias e melhor suporte estatístico nas árvores que o 16S-23S-ITS rDNA, uma situação inversa foi observada por Haverkamp et al. (2009) para linhagens de *Synechococcus*. Assim, ressalta-se a importância da utilização de mais de um marcador em estudos moleculares visando a

reconstrução de filogenias mais consistentes. Neste sentido, destacando-se os trabalhos que utilizam as análises *multilocus*, nas quais sequências de vários marcadores são concatenadas para a geração das árvores filogenéticas. Este processo pode minimizar os efeitos de problemas como o das homoplasias e do *incomplete lineage sorting*, dentre outros (GRIBALDO; BROCHIER, 2009; MADDISON; KNOWLES 2006; THOMAZEAU et al., 2010; WU et al., 2010).

Nas árvores filogenéticas resultantes da análise com as linhagens de *Geitlerinema* para ambos os marcadores (Figuras 4 e 5) observou-se que as morfoespécies *G. amphibium* e *G. unigranulatum* não formaram clados monofiléticos isolados entre si, demonstrando que não são distintas geneticamente e corroborando assim, com a proposição de Bittencourt-Oliveira et al. (2007a e 2009a) de que estas devam ser tratadas como sinônimas. Tal fato é reforçado com os resultados obtidos com dados oriundos do *operon* dos genes ribossomais.

Bittencourt-Oliveira et al. (2009a) discutiram ainda que, baseando-se nos dados do marcador PC-IGS, as linhagens BCCUSP 352 e 94, por apresentarem alta divergência genética em relação às demais linhagens estudadas, poderiam ser consideradas uma espécie distinta. Na árvore filogenética resultante da análise das sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA no presente estudo (Figura 7) estas também formaram um grupo isolado e, de forma semelhante ao que ocorreu para o PC-IGS, apresentaram uma divergência genética relativamente alta em relação às demais. Estes dados corroboram com a observação de que se tratam de linhagens que, apesar da ausência de diferenças morfológicas significativas, são geneticamente bastante divergentes das outras linhagens estudadas. Assim, estas linhagens podem representar uma espécie críptica de *Geitlerinema*.

Alta variabilidade genética entre linhagens deste gênero foi anteriormente observada por alguns outros autores (MARGHERI et al., 2003; WOOD et al., 2002). Wood et al. (2002) utilizando sequências do 16S rDNA também identificaram a presença de espécies crípticas dentre as linhagens de *Geitlerinema*. Na árvore filogenética obtida por estes autores, linhagens para as quais eles não observaram diferenças morfológicas demonstraram serem geneticamente mais próximas a outros gêneros que umas às outras. Estes resultados ressaltam a importância do uso das técnicas moleculares na taxonomia e filogenia por serem capazes de identificar a ocorrência de espécies crípticas.

Nas árvores das árvores de *Geitlerinema* observou-se ainda que não houve separação dos clados por distribuição geográfica e algumas linhagens brasileiras mostraram-se mais próximas de linhagens européias que de outras brasileiras.

Na árvore filogenética obtida para as sequências do PC-IGS de *Microcystis* as sequências da morfoespécie *M. wesenbergii* formaram um clado monofilético (Figura 10, grupo I). Em comparação com as demais morfoespécies do gênero *Microcystis*, as colônias de *M. wesenbergii* podem ser mais facilmente distinguidas de outras devido às suas células de grandes dimensões e à espessa bainha mucilaginosa (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS 1986). A formação de um grupo monofilético contendo tais linhagens demonstra uma concordância entre os dados morfológicos e moleculares.

Outros trabalhos também relataram a formação de um clado monofilético para as linhagens de *M. wesenbergii* em árvores baseadas no marcador dos genes da ficocianina (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001; SANCHIS et al., 2005; TAN et al., 2010). Além disso, Bittencourt-Oliveira et al. (2001) relataram a presença de uma região distinta, característica para as linhagens de *M. wesenbergii*. Tan et al. (2010) desenharam *primers* dentro desta região específicos para esta morfoespécie, e indicaram o PC-IGS como um marcador efetivo para sua caracterização. Esta região está dentro do gene *cpcA*, região codificante e, em geral, mais conservada.

No presente estudo, verificou-se no gráfico de índice de informação de Shannon-Wiener (Hx) (Figura 11) que esta mesma região se destacou por apresentar uma concentração de sítios bastante variáveis. Assim, a região codificante do gene *cpcA* mostrou-se mais variável que a região não codificante do espaçador PC (Figura 11), situação não comum. Porém, grande parte desta variação deveu-se exatamente à divergência entre as linhagens de *M. wesenbergii* e as demais linhagens.

Na árvore baseada no 16S-23S-ITS rDNA, houve a formação de um grupo com a maioria das linhagens de *M. wesenbergii* (Figura 14, grupo I). Entretanto três linhagens de *M. wesenbergii* ficaram fora deste agrupamento e *M. novacekii* (UAM 258) foi incluída. Este resultado está de acordo com outros trabalhos que utilizaram o mesmo marcador (OTSUKA et al., 1999; SANCHIS et al., 2005; TAN et al., 2010; YOSHIDA et al., 2008). *M. novacekii* (UAM 258) foi sequenciada por Sanchis et al. (2005) e os autores já haviam relatado sua proximidade com as linhagens de *M. wesenbergii*. Outros marcadores como o *rpoC1* e o 16S rDNA também não formaram um grupo monofilético para as linhagens de *M. wesenbergii* (LÈPERE; WILMOTTE; MEYER, 2000; NEILAN et al., 1997; OTSUKA et al., 2000; YOSHIDA et al., 2008).

Para as demais morfoespécies incluídas nas análises, *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. flos-aquae*, *M. novacekii* e *M. panniformis*, não foram formados clados monofiléticos em nenhum dos dois marcadores analisados. A caracterização destas morfoespécies, assim como das

demais do gênero *Microcystis*, é baseada em caracteres observados em amostras da natureza. Estes caracteres estão sujeitos à plasticidade fenotípica e muitas vezes são perdidos em cultivo, impossibilitando sua identificação (OTSUKA et al., 2000; SANCHIS et al., 2005).

A não formação de grupos monofiléticos pelas morfoespécies de *Microcystis* já é bem documentada na literatura (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001; HAANDE et al., 2007; HERRY; NASRI; BOUAÏCHA, 2008; OTSUKA et al., 1998, 1999; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001; YOSHIDA et al., 2008; ZHANG et al., 2007). Otsuka et al. (2001) realizaram hibridização DNA-DNA de morfoespécies do gênero de *Microcystis* e observaram que a divergência entre elas nunca ultrapassou 70%. Baseando-se nestes resultados e na filogenia do 16S, os autores propuseram a união de várias morfoespécies de *Microcystis*, dentre elas *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. novacekii* e *M. wesenbergii* em um táxon único. Além disso, consideraram que *M. flos-aquae* seria apenas uma variação morfológica deste táxon.

Os resultados do presente trabalho corroboraram que várias morfoespécies de *Microcystis* não correspondem a agrupamentos monofiléticos e precisam ser revistas. Porém, a filogenia baseada no marcador PC-IGS indicou que a morfoespécie *M. wesenbergii*, ao contrário do proposto por Otsuka et al. (2001), é geneticamente divergente e não deve ser considerada um táxon único juntamente com as demais. A técnica de hibridização DNA-DNA utilizada por estes autores é questionada tanto na sua aplicabilidade na delimitação de espécie quanto na sensibilidade de seu processo (BAPTESTE; BOUCHER, 2008; VANDAMME et al., 1996). Além disso, o marcador 16S rDNA, em muitos casos, mostra-se muito conservado e não indicado para a distinção entre táxons próximos (FOX; WISOTZKEY; JURTSCHUK, 1992). Assim, os estudos visando a reavaliação e possível unificação de morfoespécies do gênero *Microcystis* devem utilizar outros marcadores, além do 16S rDNA.

A exemplo do que ocorreu em *Geitlerinema*, para as linhagens de *Microcystis* também não foi observado nenhum padrão significativo de agrupamento por distribuição geográfica, tendo ocorrido, por exemplo, o agrupamento no mesmo clado de linhagens brasileiras, européias, asiáticas e africanas tanto para o marcador PC-IGS (Figura 10, grupo II) quanto para o 16S-23S-ITS (Figura 14, grupo III).

5. CONCLUSÕES

- A hipótese inicial de transferência lateral do *operon* da ficocianina foi refutada, pois as árvores obtidas para os marcadores PC-IGS e 16S-23S-ITS rDNA foram muito semelhantes, tanto para as linhagens de *Geitlerinema* quanto para as de *Microcystis*.
- O uso de mais de um marcador molecular é importante em estudos de filogenia.
- O marcador 16S-23S-ITS rDNA apresentou maiores dificuldades na amplificação e sequenciamento das linhagens comparado com o PC-IGS.
- O marcador PC-IGS foi menos homoplásico e construiu árvores filogenéticas com menor número de politomias e suporte estatístico mais significativo nos ramos principais em comparação com as aquelas pelo 16S-23S-ITS rDNA, portanto, é o mais indicado quando houver a necessidade de utilização de um único marcador
- A árvore filogenética baseada no marcador 16S-23S-ITS rDNA corroborou com a proposta de que as morfoespécies *G. amphibium* e *G. unigranulatum* devem ser consideradas sinônimas.
- As árvores filogenéticas das linhagens de *Geitlerinema* revelaram a presença de linhagens geneticamente muito divergentes das demais e que podem representar espécies crípticas dentro do grupo.
- A árvore filogenética baseada no marcador PC-IGS formou um clado monofilético para as linhagens da morfoespécie *M. wesenbergii* concordando com os dados de morfologia.
- Não foram formados clados monofiléticos para as morfoespécies *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. flos-aquae* e *M. panniformis* indicando que estas precisam ser revistas.

Tabela 1. Morfoespécie, código e local de origem das linhagens de cianoabactérias utilizadas e número de acesso no GenBank das sequências presentes neste estudo. PC-IGS – marcador do espaçador dos genes da ficocianina. 16S-23S-ITS rDNA – marcador do espaçador dos genes ribossomais. BCCUSP - Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo .

Morfoespécie	Código	Local	Número de acesso –	
			GenBank- PC-IGS	Número de acesso – GenBank- 16S-23S ITS rDNA
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP31	Lago Albufera, Valência, Espanha	FJ545649	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP79	Res. Jucazinho, Caruaru, PE	FJ545644	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP80	Res. Tapacura, São Lorenono da Mara, PE	Este trabalho	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP84	Res. Jucazinho, Surubim, PE	Este trabalho	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP85	Res. Jucazinho, Surubim, PE	FJ545646	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP86	Res. Jucazinho, Surubim, PE	Este trabalho	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP87	Res. Jucazinho, Surubim, PE	FJ392653	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP91	Lagoa Ornamental, Piracicaba, SP	FJ545650	Este trabalho
<i>G. unigramulatum</i>	BCCUSP94	Lagoa da Usina Sta. Rita, Maracaí, SP	FJ545642	Este trabalho
<i>G. amphibium</i>	BCCUSP338	Lagoa da Usina Sta. Rita, Maracaí, SP	Este trabalho	Este trabalho
<i>G. unigramulatum</i>	BCCUSP350	Lagoa da Usina Sta. Rita, Maracaí, SP	FJ545647	Este trabalho
<i>G. unigramulatum</i>	BCCUSP352	Lagoa da Usina Sta. Rita, Maracaí, SP	FJ545643	Este trabalho
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP09	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385375	Este trabalho
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP30	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385376	Este trabalho
<i>M. panniformis</i>	BCCUSP200	Res. Salto Grande, São Paulo, SP	AF385374	Este trabalho
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP232	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385372	Este trabalho

Tabela 1. continuação.

Morfoespécie	Código	Local	Número de acesso –	
			GenBank- PC-IGS	GenBank- 16S-23S ITS
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP262	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385369	Este trabalho
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP298	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385370	Este trabalho
<i>M. aeruginosa</i>	BCCUSP299	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	AF385371	Este trabalho
<i>M. wesenbergii</i>	BCCUSP011	Lagoa da Usina Sta. Rita, Maracá, SP	AF385389	Este trabalho

Tabela 2. *Primers* utilizados e suas seqüências, fonte de consulta e condições de amplificação.

<i>Primer</i>	Seqüência	Fonte de consulta	Condições de amplificação
PC-IGS			
<i>cpcβ</i> -F	5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3'	Neilan; Jacobs;	1(94°C/ 4'); 30 (94°C/ 10'' ; 50°C /20''; 72°C/ 40''); 1 (72°C/ 7')
<i>cpcα</i> -R	5'-CCAGTACCACCCAGCAACTAA-3'	Goodman, (1995)	
16S-23S-ITS rDNA			
322F	5'-TGTACACACCGCCCGTG-3'	Iteman et al. (2000)	1 (94°C/ 4') 31 (94°C/ 1'; 52°C/ 1'; 72°C 1,5') 1 (72°C/ 8') – para linhagens de <i>Geitlerinema</i> ^e
340R	5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATATCC-3'		1 (94°C/ 4') 31 (94°C/ 1'; 58°C/ 1'; 72°C 1,5') 1 (72°C/ 8') – para linhagens de <i>Microcystis</i>

Tabela 3. Número de táxons, tamanho da matriz, divergências, número de sítios informativos, número de árvores mais parcimoniosas, índices de homoplasia, probabilidade do teste PTP, e modelo evolutivo selecionado das matrizes de alinhamento utilizadas para apresentação dos resultados. SI Número de sítios informativos da parcimônia; NAP Número de árvores mais parcimoniosas; IC Índice de consistência; IR Índice de retenção; RC Índice de consistência rescalonado; PTP valor p do teste de permutação PTP (*Permutation Tail Probability Test*); TrN Tamura e Nei 1993; TPM1 e TPM2 modelo de três parâmetros (Kimura 1981); HKY Hasegawa, Kishino e Yano 1985; ef frequências iguais; uf frequências desiguais; G taxa de variação entre os sítios; I proporção de sítios invariáveis; - análise não realizada.

Alinhamento	Táxons	Pares de base no alinhamento	Distância entre linhagens ^a			SI	NAP	Índices de homoplasia			PTP	Modelo evolutivo ^b
			Média	Máxima	Mínima			IC	IR	RC		
PC-IGS <i>Geitlerinema</i>	19	642	0,047	0,098	0,000	75	2	0,889	0,894	0,794	p<0,01	TrN ef+G
16S-23S-ITS rDNA <i>Geitlerinema</i>	13	565	0,073	0,162	0,000	87	1	0,861	0,828	0,713	p<0,01	TPM2 uf+G
PC-IGS <i>Microcystis</i> A	27	608	0,038	0,068	0,000	51	2	0,817	0,870	0,710	p<0,01	TPM1 uf+G
PC-IGS 2 <i>Microcystis</i> B	74	608	0,037	0,070	0,000	-	-	-	-	-	-	TPM1 uf+G
16S-23S-ITS rDNA <i>Microcystis</i> A	27	331	0,035	0,072	0,000	27	1560	0,777	0,824	0,640	P<0,01	TrN+I+G
16S-23S-ITS rDNA <i>Microcystis</i> B	79	331	0,038	0,128	0,000	-	-	-	-	-	-	HKY+G

^a calculada por *P distance*, ^b selecionado pelo programa jModeltest

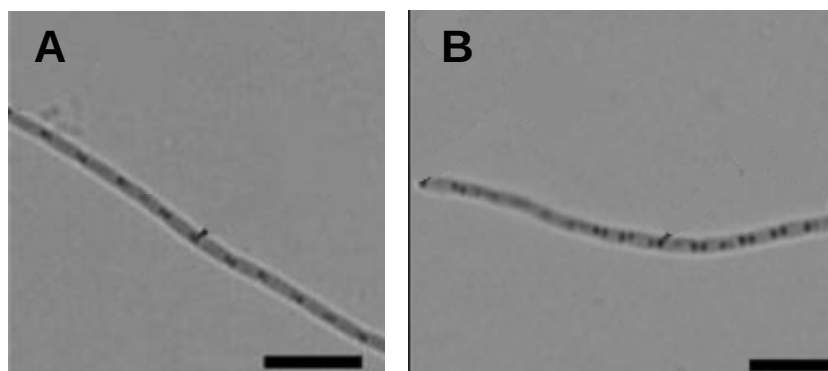


Figura 1. Morfoespécies de *Geitlerinema*. **A.** *G. amphibium*. **B.** *G. unigranulatum*. Barra de escala = 10 μ m.
Fonte: Bittencourt-Oliveira et al. (2009a).

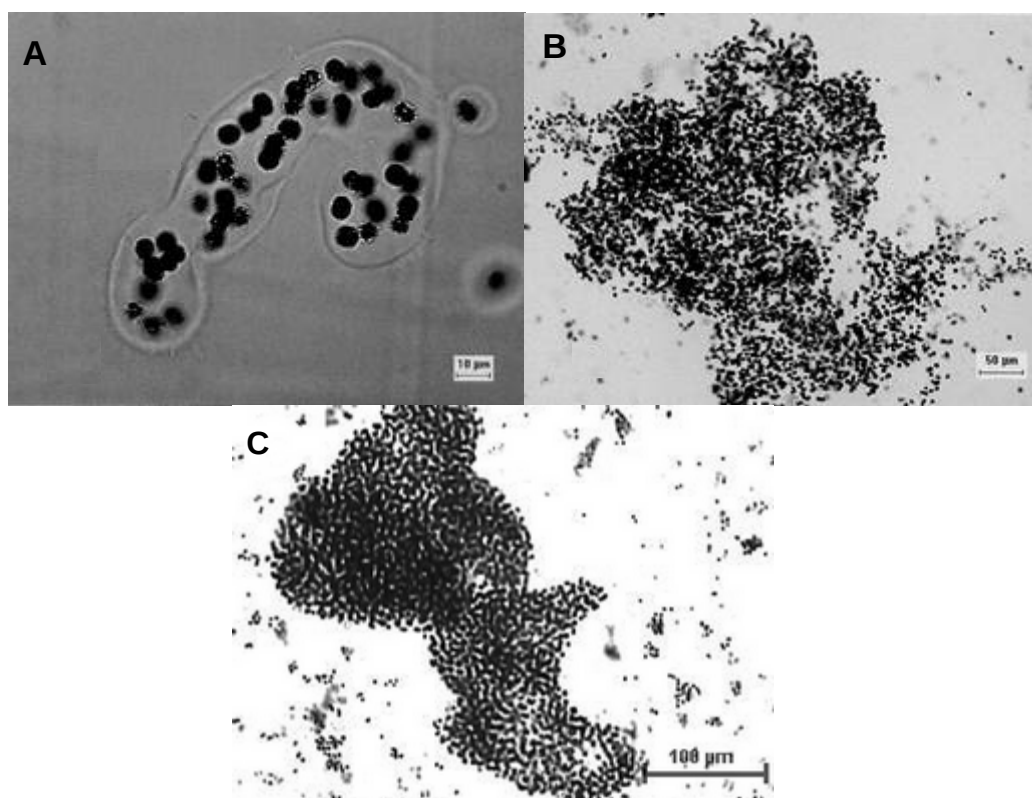


Figura 2. Morfoespécies de *Microcystis*. **A.** *M. wesenbergii*. **B.** *M. aeruginosa*. **C.** *M. panniformis*. Fonte: A e B- Bittencourt-Oliveira et al. (2001); C- Bittencourt-Oliveira et al (2007b).

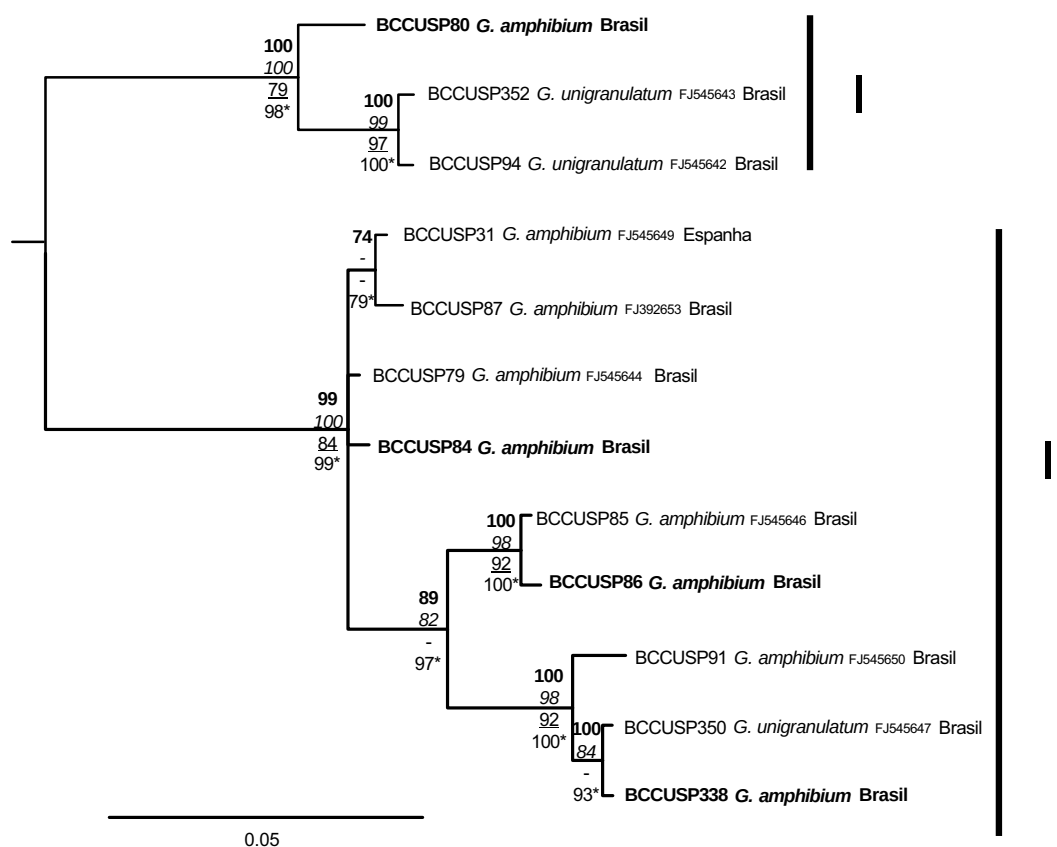


Figura 3. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo apenas as linhagens de *Geitlerinema* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575949) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,05 substituições.

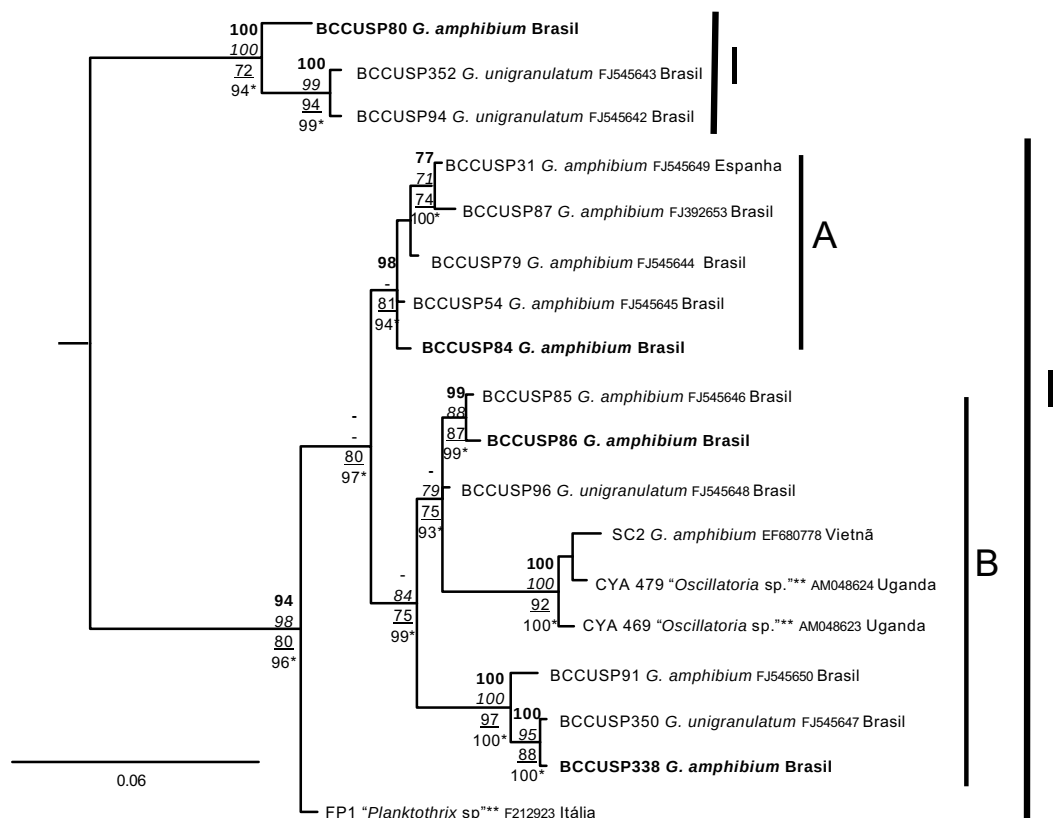


Figura 4. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com seqüências do PC-IGS contendo as linhagens de *Geitlerinema* spp. sequenciadas neste estudo e as selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575949) utilizado na análise mas não mostrado. ** Linhagens identificadas por Bittencourt-Oliveira (2009a) como *Geitlerinema* sp. A barra de escala corresponde a 0,06 substituições.

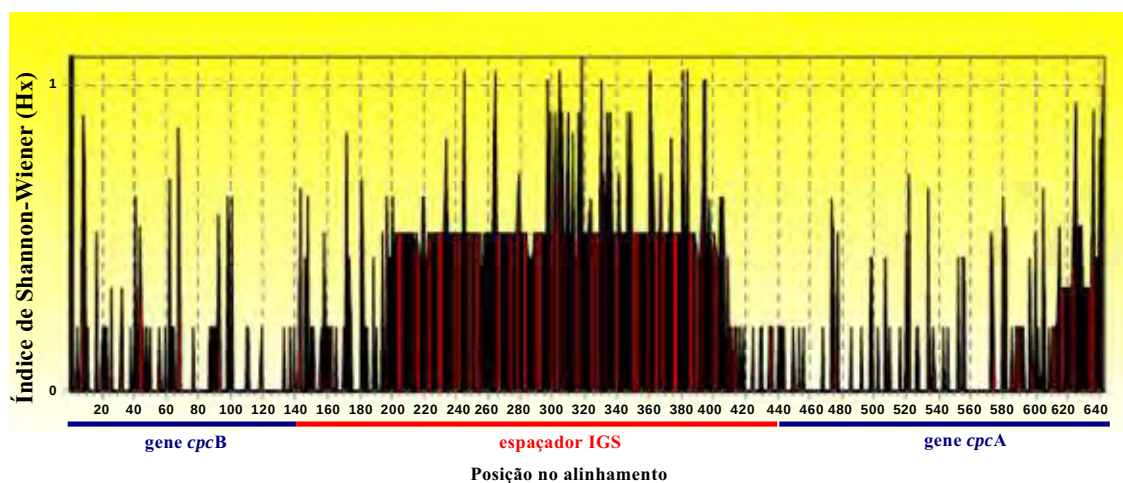


Figura 5. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para o alinhamento das sequências do PC-IGS de *Geitlerinema* sequenciadas neste estudo e selecionadas do GenBank (PC-IGS *Geitlerinema*). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.

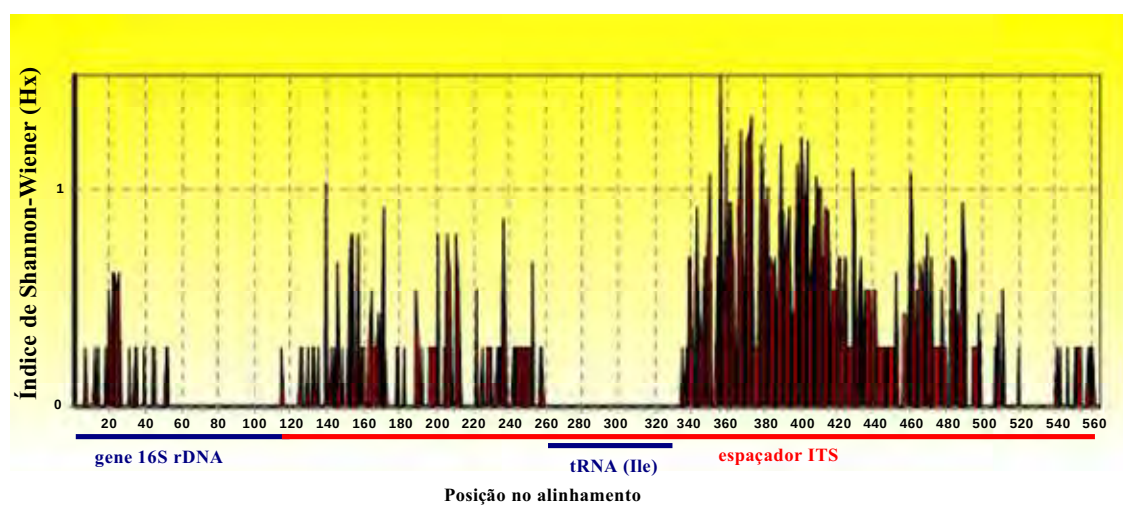


Figura 6. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para a matriz de alinhamento das sequências do 16S-23S-ITS rDNA de *Geitlerinema* (ITS-23S-ITS rDNA *Geitlerinema*). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.

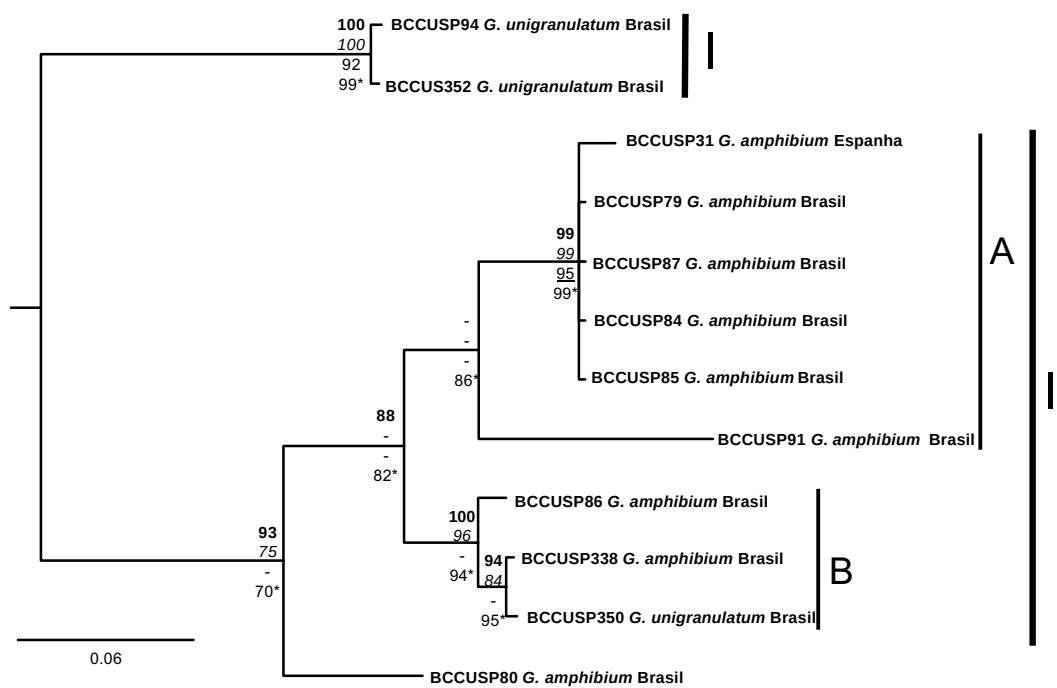


Figura 7. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do 16S-23S-ITS rDNA contendo as linhagens de *Geitlerinema* spp. sequenciadas neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas e para a Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Todas as linhagens foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Spirulina subsalsa* PD2002/gca (AY575935) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,06 substituições.

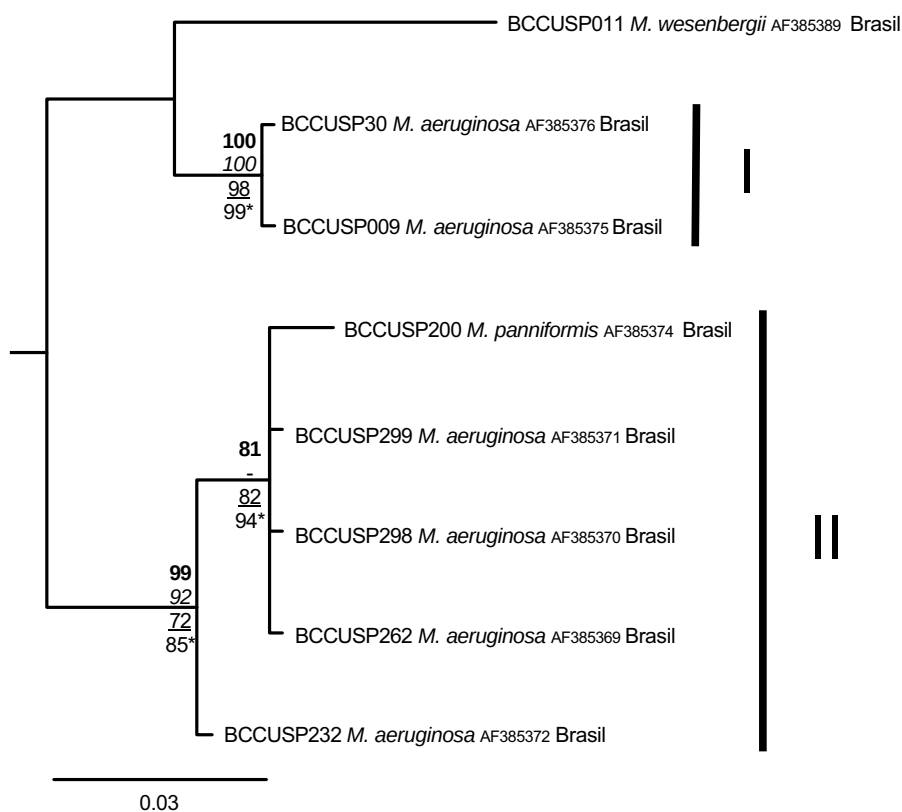


Figura 8. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com seqüências do PC-IGS contendo apenas as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,03 substituições.

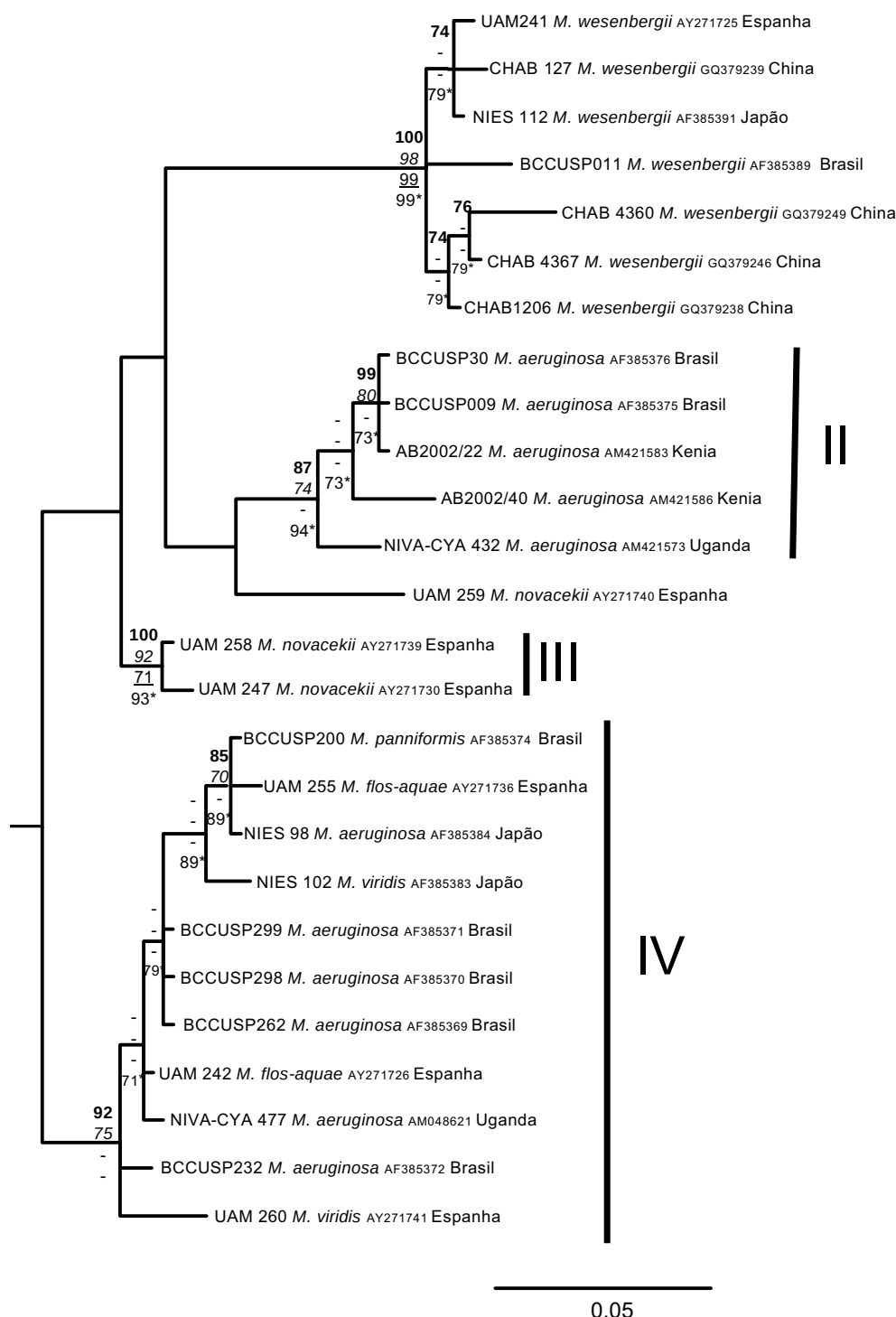


Figura 9. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo e algumas selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas para NJ e MP e 200 réplicas para MV. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Grupo externo: *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,03 substituições.

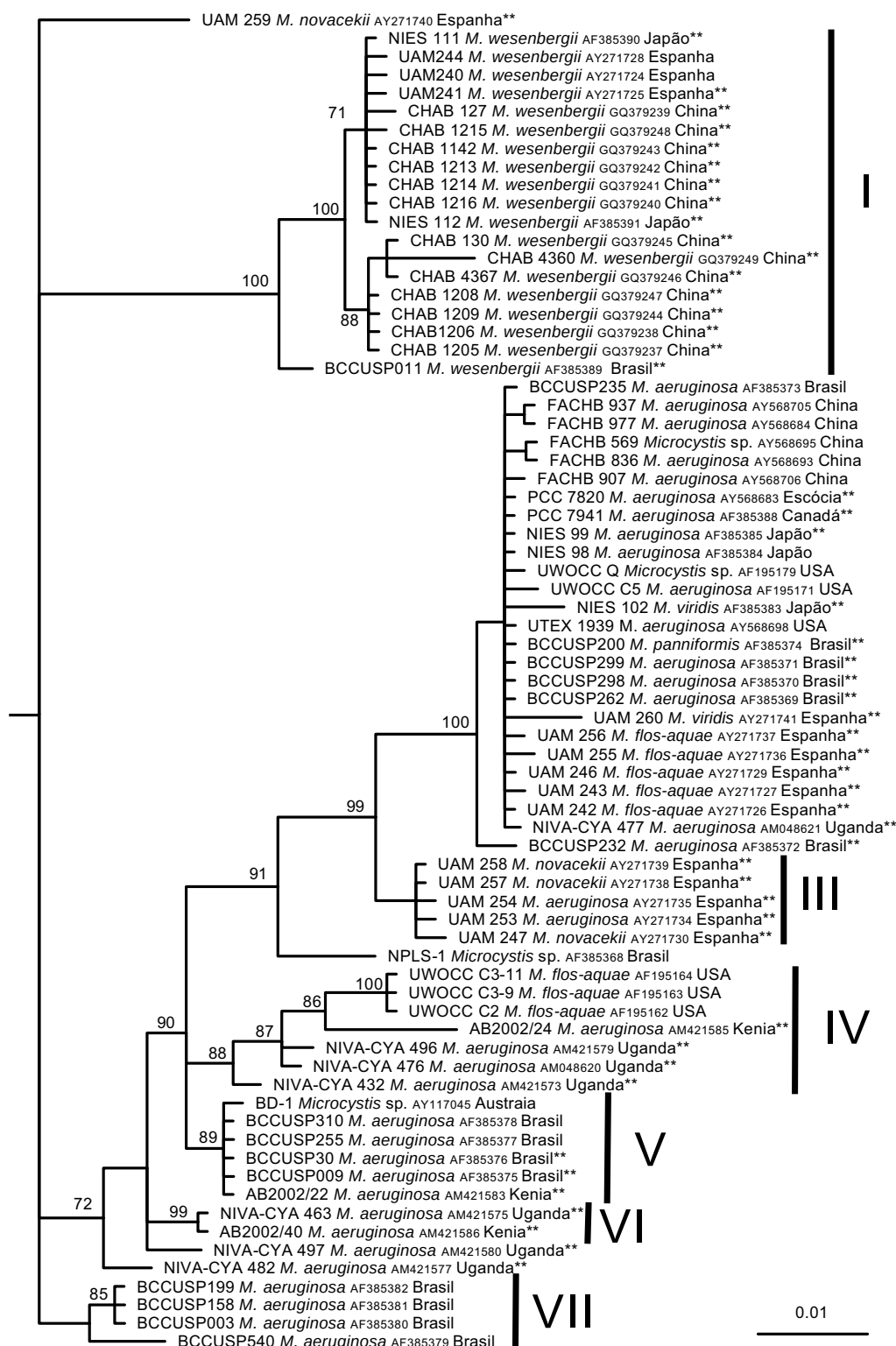


Figura 10. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do PC-IGS contendo as linhagens de *Microcystis* spp. que tiveram o marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciado neste estudo e todas as demais selecionadas do GenBank. Valores de probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. ** Linhagens presentes também na árvore do 16S-23S-ITS rDNA (Figura 14). Grupo externo: *Cyanothec* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,01

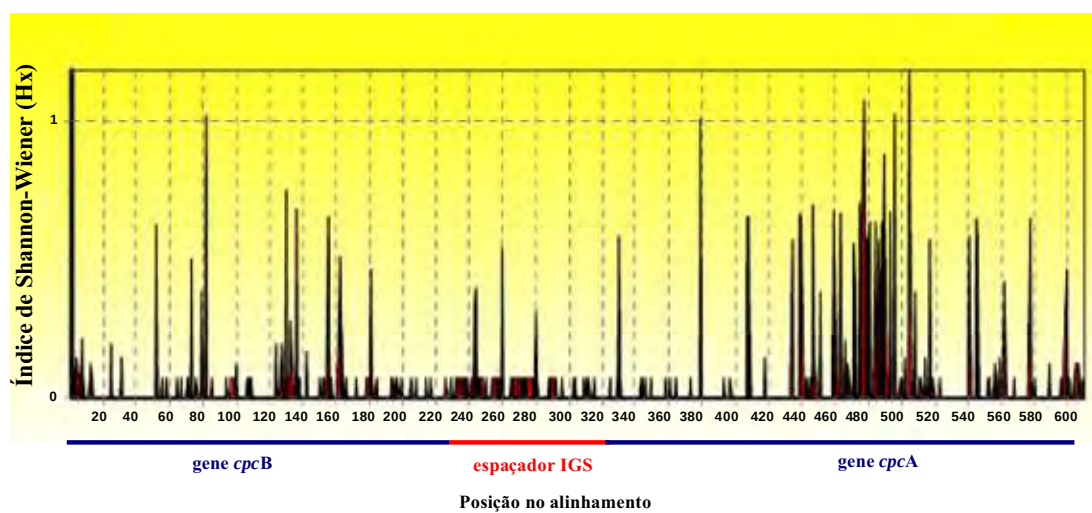


Figura 11. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para o alinhamento das sequências do PC-IGS de *Microcystis* (PC-IGS *Microcystis* B). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.

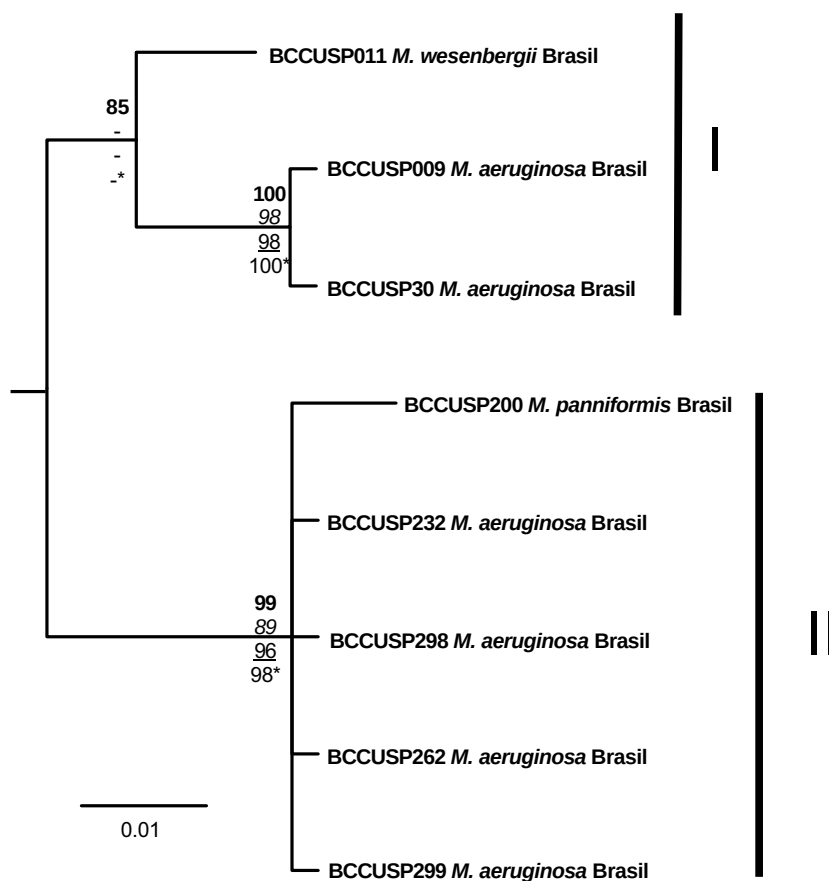


Figura 12. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Todas as linhagens foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,01 substituições.

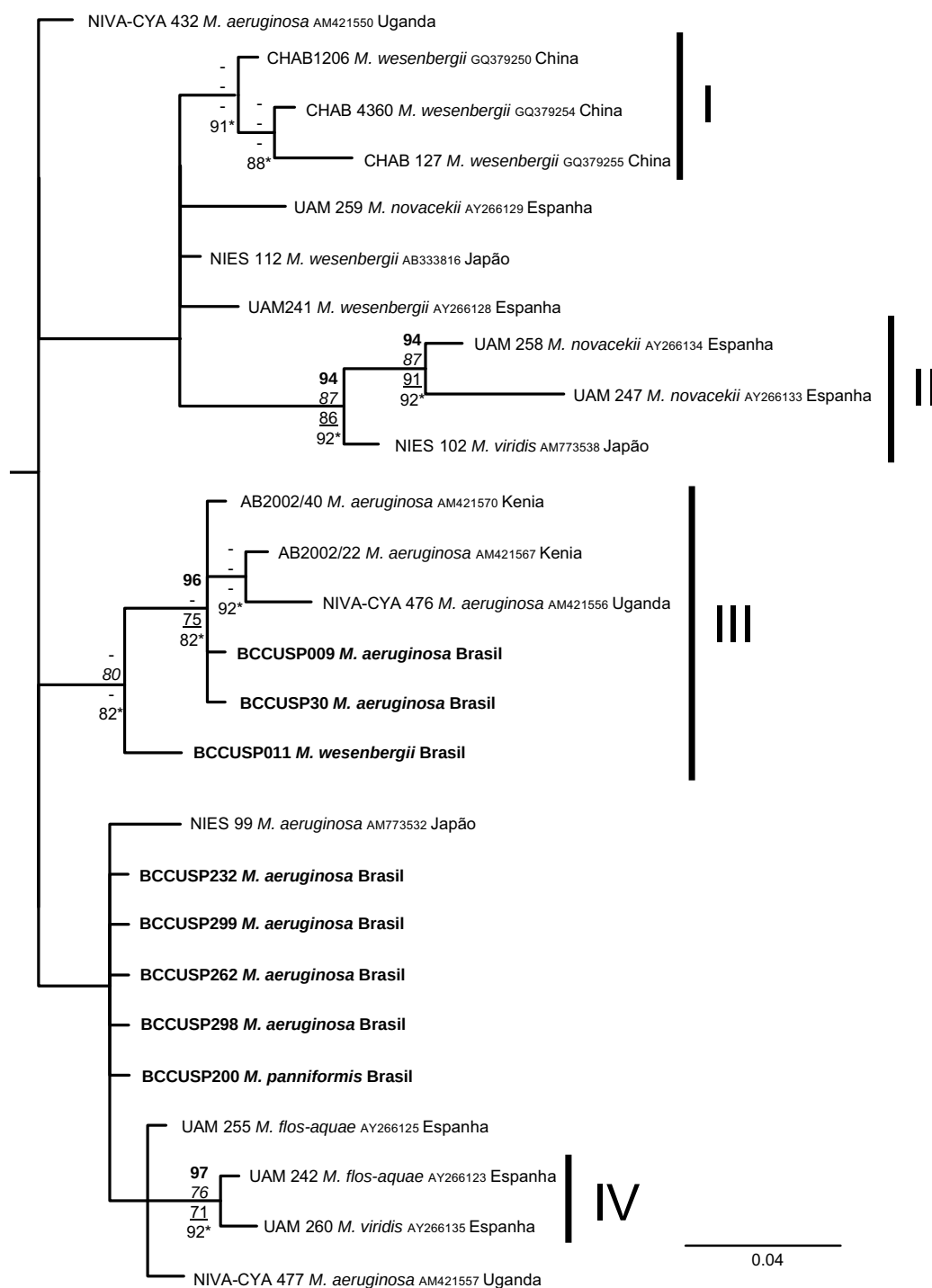


Figura 13. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo e algumas selecionadas do GenBank. Valores de *bootstrap* e probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos: NJ fonte em negrito, MP em itálico, MV sublinhado e valor de PP (x100) marcado com *. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 2000 réplicas para NJ e MP e 200 réplicas para MV. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de *bootstrap* e PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. ** Linhagens presentes também na árvore do PC-IGS (Figura 10). Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,04 substituições.

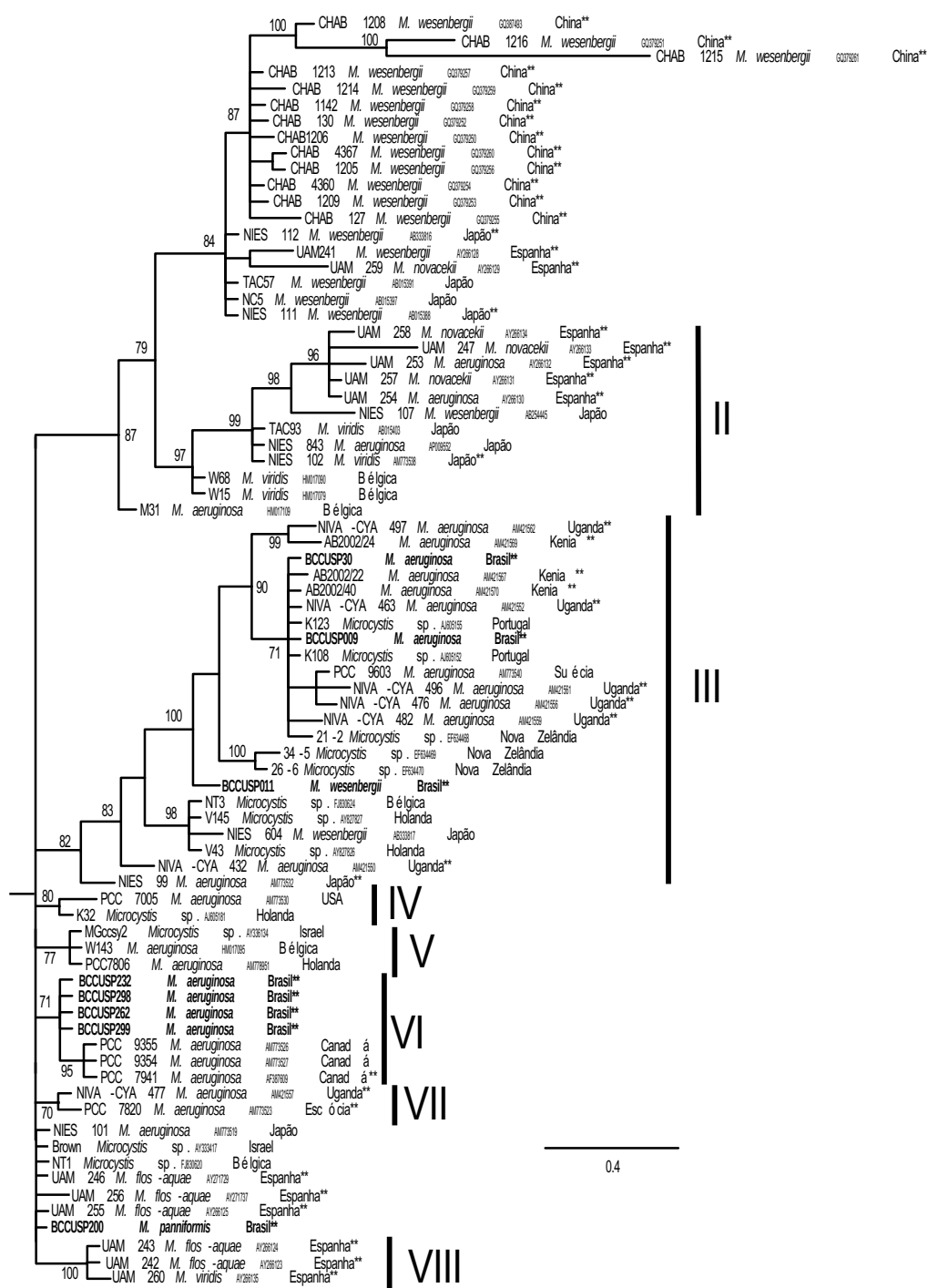


Figura 14. Árvore filogenética resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S-23S-ITS rDNA sequenciadas neste estudo e todas as demais selecionadas do GenBank. Valores de probabilidade a posteriori (PP) foram apresentados nos ramos. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas corridas de quatro cadeias de Markov sobre 5.000.000 de gerações, amostrando-se a cada 100. Apenas valores de PP (x100) maiores que 70 foram apresentados. Linhagens em negrito foram sequenciadas neste estudo. Grupo externo: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (CP000806) utilizado na análise mas não mostrado. A barra de escala corresponde a 0,4 substituições.

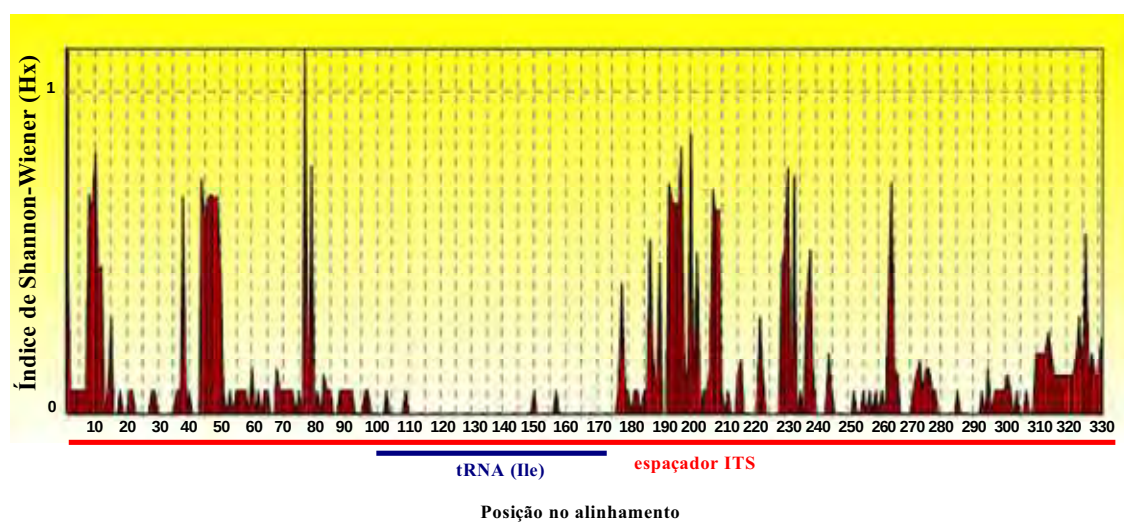


Figura 15. Gráfico do Índice de Shannon-Wiener (Hx) para a matriz de alinhamento das sequências do 16S-23S-ITS rDNA de *Microcystis* (ITS-23S-ITS rDNA *Microcystis* B). O índice Hx apresenta a variação em cada uma das posições do alinhamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTIDIS, K. *Geitlerinema*, a new genus of oscillatorialean cyanophytes. **Plant Systematics and Evolution**, v.164, p.33–46, 1989.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3. Oscillatoriales. **Algological Studies**, v.50/53, p.327–472, 1988.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 5 - Stigonematales. **Algological Studies**, v. 59, p.1-73, 1990.

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

ARCHIBALD J.M. Endosymbiosis: double-take on plastid origins. **Current Biology**, v.16, p.R690–R692., 2006.

ARCHIE, J.M. A randomization test for phylogenetic information in systematic data. **Systematic Zoology**, v.38, p.239-252, 1989.

BAPTESTE, E.; BOUCHER, Y. Lateral gene transfer challenges principles of microbial systematics. **Trends in Microbiology**, v.16, n.5, p.200-207, 2008.

BARKER, G.L.A.; KONOPKA, A.; HANDLEY, B.A.; HAYES, P.K. Genetic variation in *Aphanizomenon* (cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. **Journal of Phycology**, v.36, p.947-950, 2000.

BELTRAN, E.C.; NEILAN B.A. Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4468–4474, 2000.

BERGMAN, B.; GALLON, J.R.; RAI, A.N.; STAL, L.J. N-fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, p-139-185, 1997.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. **Algological Studies**, v.99, p.29-37, 2000.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MASSOLA JR, N.S.; HERNANDEZ-MARINE, M. ROMO, S.; MOURA, A.N. Taxonomic investigation using DNA fingerprinting in *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) **Phycological Research**, v.55, p.214–221, 2007a.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOURA, A.N.; GOUVEA-BARROS, S.; PINTO, E. HIP1 DNA fingerprinting in *Microcystis panniformis* (Chroococcales, Cyanobacteria) **Phycologia** v.46, n.1, p.3–9, 2007b

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C.; BOLCH, C.J.S. Genetic variability of brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). **Journal of Phycology**, v.37, p.810-818, 2001.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOURA, A.N.; OLIVEIRA, M.C.; MASSOLA-JR, N. *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure and DNA sequencing. **Journal of Phycology**, v.45, p. 716-725, 2009a.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; CUNHA, M.C.C.; MOURA, A.N. Genetic polymorphism in brazilian *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) toxic and non-toxic through RFLP-PCR of the *cpcBA*-IGS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p. 901-909, 2009b.

BOLCH, C. J.; BLACKBURN S. I.; NEILAN, B. A.; GREWE, P. M. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, v.32, p.445–451, 1996.

BOLCH, C.J.S.; ORR, P.T.; JONES, G.J.; BLACKBURN, S.I. Genetic, morphological and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, p.35, v.339-355, 1999.

BOUCHER, Y.; DOUADY, C.J.; PAPKE, R.T.; WALSH, D.A.; BOUDREAU, M.E.; NESBO, C.L.; CASE, R.J.; DOOLITTLE, W.F. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. **Annual Review of Genetic**, v.37, p. 283–328, 2003.

BOURKE A.T.C.; HAWES R.B.; NEILSON A. & STALLMAN N.D. An outbreak of hepatitis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon**, v.3, p.45–48, 1983.

BOYER, S.L.; FLECHTNER, V.F.; JOHANSEN, J.R. Is the 16S-23S Internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematic and population genetics? A case study in cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.6, p.1057-1069, 2001.

BRIAND, J.F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**, v.34, p.361-377, 2003.

BRINKMAN, F.S.L.; LEIPE, D.D. Phylogenetic Analysis. In BAXEVANIS, A.D.; OUELLETTE, B.F.F. (Ed.). **Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins**, 2nd ed. Wiley-Liss New York. 470p, 2001.

CADEL-SIX, S.; PEYRAUD-THOMAS, C.; BRIENT, L.; MARSAC, N.T.; RIPPKA, R.; MÉJEAN, M. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.23, p.7605–7614, 2007.

CARMICHAEL, W. W. Toxic *Microcystis* and the environment. In: Watanabe, M. F., Harada, K., Charmichael, W. W. & Fujiki, H. (Eds.) **Toxic *Microcystis* spp.** CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 13–34, 1996.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n.1, p. 78-86, 1994.

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

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

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLOF, I.; HOLMSTROM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, p.278–88, 2007.

CASTENHOLZ, R. W. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria In BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2001. p. 473-599.

CHEN, F.; WANG, K.; KAN, J.; SUZUKI, M.T.; WOMMACK, K.E. Diverse and unique picocyanobacteria in Chesapeake Bay, revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p. 2239–2243, 2006.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; Kawachi, M.; Kasai, F.; Kaya, K.; Watanabe, M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.345–355, 2004.

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

DELWICHE, C. F.; KUNSEL, M.; PALMER, J. D. Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.4, p.110–128, 1995.

DOOLITTLE, W.F.; WOESE, C.R.; SOGIN, M.L.; BONEN, L.; STAHL, D D. Sequence studies on 16S ribosomal RNA from a blue-green alga. **Journal of Molecular Evolution**, v.4, p.307-315, 1975.

DYBLE, J.; PAERL, H.W.; NEILAN, B.A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2567–2571, 2002.

ENGINE,N.; COATES, R.C.; GERWICK, W.H. 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya* **Journal of Phycology**, v.46, p.591–601, 2010.

FALCONER, I.R.; BERESFORD, A.M.; RUNNEGAR, M.T. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Medicine Journal**, v.1, p.511-114, 1983.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approaching using bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

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

FINSINGER, K.; SCHOLZ, I.; SERRANO, A.; MORALES, S.; URIBE-LORIO, L.; MORA, M.; SITTENFELD, A.; WECKESSER, J.; HESS, W.R. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. **Environmental Microbiology**, v.10, n.2, p.460–473, 2008.

FINSINGER, K.; SCHOLZ, I.; SERRANO, A.; MORALES, S.; URIBE-LORIO, L.; MORA, M.; SITTENFELD, A.; WECKESSER, J.; HESS, W.R. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. **Environmental Microbiology**, v.10, p.460–473, 2008.

FOSTER, R.A.; ZEHR, J.P. Characterization of diatom–cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. **Environmental Microbiology**, v.8, n.11, p.1913–1925, 2006.

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

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

GLAZER, A.N. Phycobilisome: a macro molecular complex optimized for light energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.768, p.29–52, 1984.

GOGARTEN; ZHAXYBAYEVA. Horizontal gene transfer: its detection and role in microbial evolution. In. XU; GOGARTEN (Eds.) **Computational Methods for understanding bacterial and archaeal genomes**. Imperial College Press. Singapore, p.137–152, 2008.

GRAY, G.S.; FITCH, W. M. Evolution of antibiotic resistance genes: the DNA sequence of a kanamycin resistance gene from *Staphylococcus aureus* . **Molecular Biology and Evolution**, v.1, p.57–66, 1983.

GRIBALDO, S.; BROCHIER, C. Phylogeny of prokaryotes: does it exist and why should we care? **Research in Microbiology**, v.160, p.513–521, 2009.

GUGGER, M.; MOLICA, R.; BERRE, B.L.; DUFOUR, P.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.1097–1100, 2005.

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

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

HAN, D.; FAN, Y.; HU, Z. An evaluation of four phylogenetic markers in *Nostoc*: implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. **Current Microbiology**, v.58, p.170–176, 2009.

HANNDE, S.; BALLOT, A.; ROHRLACK, T.; FASTNER, J.; WIEDNER, C.; EDVARSEN, B. Diversity of *Microcystis aeruginosa* isolates (Chroococcales, Cyanobacteria) from East-African water bodies. **Archives of Microbiology**, v.188, p.15-25, 2007.

HASEGAWA, M.; KISHINO, K.; YANO, T. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v.22, p.160-174, 1985.

HAVERKAMP, T.; ACINAS, S.G.; DOELEMAN, M.; STOMP, M.; HUISMAN, J.; STAL, L.J. Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. **Environmental Microbiology**, v.10, n.1, p. 174–188, 2008.

HAVERKAMP, T.; SCHOUTEN, D.; DOELEMAN, M.; WOLLENZIEN, U.; HUISMAN, J.; STAL, L.J. Colorful microdiversity of *Synechococcus* strains (picocyanobacteria) isolated from the Baltic Sea. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.3, p.397–408, 2009.

HEATH, M.W.; WOOD, S.A.; RYAN, K.G. Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. **FEMS Microbiology Ecology**, v.73, p.95-109, 2010.

HERRY, S.E.; NASRI, H.; BOUAÏCHA, N. Morphological and phylogenetic analysis of colonies of *Microcystis* morphospecies isolated from the Lebna Dam, Tunisia. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, n.12, p.340-348, 2008.

HOEK, C VAN DEN; MANN, D.G.; JAHNS, H. M. Cyanophyta. In HOEK, C VAN DEN; MANN, D.G.; JAHNS, H. M. (Eds) **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge. Cambridge University Press, p.16-34, 2005.

HOFFMANN, L.; KOMAREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprobaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algological Studies**, v.117, p.95–115, 2005.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.275–284, 2003.

HOLTON, R.W. Some possible chemotaxonomic approaches to understanding cyanobacterial taxonomy and phylogeny. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.361, p.397–408, 1981.

HUMBERT, J.F.; DURIS-LATOUR, D.; LE BERRE, B.; GIRAUDET, H.; SALENCON, M.J. Genetic diversity in *Microcystis* populations of a french storage reservoir assessed by sequencing of the 16S–23S rRNA Intergenic Spacer. **Microbial Ecology**, v.49, p.1–7, 2005.

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

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

JAIN, R.; RIVERA, M.C.; LAKE, J.A. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.3801–3806, 1999.

JAIN, R.; RIVERA, M.C.; MOORE, J.E.; LAKE, J.A. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. **Theoretical Population Biology**, v.61, p. 489–495, 2002.

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

JEWEL, M.A.S.; AFFAN M.A.; KHAN A.S. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.6, n.12, p.1046–1050, 2003.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO-FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to

microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal Medicine**, v.36, n.13, p.373-378, 1998.

KIMURA, M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.78, p.454-458, 1981.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota II. Teil Oscillatoriales. In BÜDEL B., KRIENITZ L., GÄRTNER G.; SCHAGERL, M. (Eds.) **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Elsevier GmbH München 759p, 2005.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In ETTL H.; GÄRTNER G.; HEYNIG H.; MOLLENHAUER D. (Eds.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Gustav Fischer, Stuttgart. v. 19, p.1-545, 1999.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 2 - Chroococcales. **Algological Studies**, v.43, p.157-226, 1986.

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

KOONIN, E.V.; MAKAROVA K.S.; ARAVIND L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: Quantification and classification. **The Annual Review of Microbiology**, v.55, p.709-742, 2001.

LADHA, J. K.; WATANABE I. Antigenic similarity among *Anabaena azollae* separated from different species of *Azolla*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.109, n.3, p.675-682, 1982.

LEE, R. E. **Phycology**. 3th ed. Cambridge: Cambridge University Press. p.547, 1999

LEE, W.J., BAE, K.S. Inferring the molecular phylogeny of chroococcalian strains (blue-green algae/Cyanophyta) from the Geumgang River, based on partial sequences of 16S rRNA gene. **The Journal of Microbiology**, v.40, n.4, p.335-339, 2002.

LEPERE, C.; WILMOTTE, A.; MEYER, B. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. **Journal of Geographical Systems**, v.70, p.275-283, 2000.

LU, W.; EVANS, E.H.; MCCOLL, S.M.; SAUNDERS, V.A. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiology Letters**, v.153, v.1, p.141–149, 1997.

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

MADDISON, W.P.; KNOWLES, L.L. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. **BMC Systems Biology**, v.55, n.1, p.21–30, 2006.

MAKAROVA, K.S.; ARAVIND, L.; GALPERIN, M.Y.; GRISHIN, N.V.; TATUSOV, R.L.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E.V. Comparative genomics of Archaea (Euryarchaeota): Evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. **Genome Research**, v.9, p.608–628, 1999.

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

MARGHERI, M. C.; PICCARD, R.; VENTURA, S.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L. Genotypic diversity of Oscillatoriacean strains belonging to the genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis. **Current Microbiology**, v.46, p.359–64, 2003.

McFadden G.I. "Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids". **Journal of Phycology**, v.37, p.951–9, 2001

NAKAMURA, Y.; ITOH, T.; MATSUDA, H.; GOJOBORI, T. Biased biological function of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. **Nature Genetics**, v.36, p.760–766, 2004.

NEILAN B.A.; JACOBS D.; GOODMAN A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin *locus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3875–3883, 1995.

NEILAN, B.A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2286–2291, 1995.

NEILAN, B.A.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. Towards a molecular taxonomy for the bloom-forming cyanobacteria. *Aust. J. Mar. Freshwater Research*, v.45, p.869–873, 1994.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DOT, T.D.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.T.; 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.6, p. 693-697, 1997.

NEILAN, B.A.; SAKER, M.L. FASTNER, J.; TÖRÖKÉS A.; BURNS, B.P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology*, v.12, p.133-140, 2003.

NELISSEN, B.; DEBAERE, R.; WILMOTTE, A.; DE WACHER, R. Phylogenetic relationship of nonaxenic filamentous cyanobacteria strains based on 16SrRNA sequences analysis. *Journal of Molecular Evolution*, v.42, p.194-200, 1996.

NELISSEN, B.; VAN DE PEER, Y.; WILMOTTE, A.; WACHTER, R. An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v.12, n.6, p. 1166-1173, 1995.

NELISSEN, B.; WILMOTTE, A.; DE BAERE, R.; HAES, F.; VAN DE PEER, Y., NEEFS, J.M.; WACHTER, R. 1992. Phylogenetic study on cyanobacteria on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *Belgian Journal of Botany*, v.125, p.210-213, 1992

NELISSEN, B.; WILMOTTE, A.; NEEFS, J.M.; DE WACHTER, R. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied. Microbiology*, v.17:206–210, 1994.

NISHIHARA, H.; MIWA, H.; WATANABE, M.; NAGASHIMA, M.; YAGI, O; TAKAMURA, Y. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.61, p.1067–1072, 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.3327–3332, 1997.

NYLANDER, J.A.A. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Centre**, Uppsala University, Uppsala, 2004.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v.405, p.299-304, 2000.

ORCUTT, K.M.; RASMUSSEN, U.; WEBB, E.A.; WATERBURY, J.B.; GUNDERSEN, K.; BERGMAN, B. Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.2236–2245, 2002.

OTSUKA, S., S. SUDA, R. LI, M. WATANABE, H. OYAIZU, S. MATSUMOTO; M.M. WATANABE. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. **FEMS Microbiological Letters**, v.172, p.5-21, 1999.

OTSUKA, S.; SUDA, S.; LI, R.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.46, p.39-50, 2000.

OTSUKA, S., S. SUDA, S. SHIBATA, H. OYAIZU, S. MATSUMOTO; M.M. WATANABE. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 873-879, 2001.

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

PADILLA, C.; SANZ-ALFÉREZ, S.; DEL CAMPO, F.F. Toxin characterisation and identification of a *Microcystis flos-aquae* strain from a Spanish drinking-water reservoir. **Archiv für Hydrobiologie**, v.165, n.3, p.383–399, 2005.

PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. Measuring Genetic Change. In PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. (Eds). **Molecular Evolution : A Phylogenetic Approach**. Blackwell Science. Oxford. 346p, 1998.

PALENIK, P.; SWIFT, H. Cyanobacterial evolution and prochlorophyte diversity as seen in DNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **Journal of Phycology**, v.32, p.638–646, 1996.

PALINSKA, K. A.; Liesack, W.; Rhiel, E.; Krumbein, W.E. Phenotype variability of identical genotypes: the need for combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. **Archives of Microbiology**, v.166, p.224-233, 1996.

POMATI, F.; BURNS, B.P.; NEILAN, B.A. Identification of an Na⁺-dependent transporter associated with saxitoxin-producing strains of the Cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.4711–19, 2004.

POSADA D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v.25, p.1253-1256, 2008.

PRABINA, B. J., KUMAR, K.; KANNAIYAN, S. DNA amplification fingerprinting as a tool for checking genetic purity of strains in the cyanobacterial inoculum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.629–634, 2005.

PREMANANDH, J.; PRIYA1, B.; TENEVA, I.; DZHAMBZOV, B.; PRABAHARAN, D.; UMA, L. Molecular characterization of marine cyanobacteria from the indian subcontinent deduced from sequence analysis of the phycocyanin operon (*cpcB-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS region. **The Journal of Microbiology**, v.44, n.6, p. 607-616, 2006.

RAGAN, M.A. Detection of the lateral gene transfer among microbial genomes. **Trends in Microbiology**, v.55, p.709-742, 2001.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J.; BORNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of Natural Academy of Sciences USA**, v.101, p. 568–573, 2004.

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

RIVIERS, B. Divisão Cyanophyta. In: RIVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Santana. Artmed, p.22-33, 2006.

ROBERTSON, B.R.; TEZUKA, N.; WATANABE, M.M. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.51, p.861-871, 2001.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extration of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium am mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v.5, p.69-76, 1985.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p.1572-1574, 2003

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

SAITON, N.; NEI, M. The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

SANCHIS, D.; PADILLA, C.; DEL CAMPO, F.F.; QUESADA, A.; SANZ-ALFÉREZ, S. Phylogenetic and morphological analyses of *Microcystis* strains (Cyanophyta/Cyanobacteria) from a Spanish water reservoir. **Nova Hedwigia**, v.81 n.3, p.4 431- 448, 2005.

SANT'ANNA, C. L.; BRANCO, L. H. Z.; AZEVEDO, M. T. P. Cyanophyceae/Cyanobacteria. In: BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. (Org.). **Gêneros de algas de águas do Brasil**. 2 ed. São carlos: RIMA, p. 19-82, 2006

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

SHALINI; TIWARI, S.;GUPTA, R. K.; PABBI, S.; DHAR, D. W. Protocol optimization for RAPD in Cyanobacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6 , p.549-552, 2007.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana, University of Illinois Press, 117p, 1949.

SHI, T.; FALKOWSKI. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.105, n.7, p.2510-2515, 2008.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water**. A guide to their public health consequences, monitoring and management, London, E & FN SPON, p.41-91, 1999.

SIX, C.; THOMAS, J.C.; GARCZAREK, L.; OSTROWSKI, M.; DUFRESNE, A.; BLOT, N.; SCANLAN, D.J.; PARTENSKY, F. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study **Genome Biology**, v.8, R259, 2007.

SMITH, J.M. The evolution of the eukaryotic genome. In SMITH, J.M. (Ed.) **Evolutionary Genetics**. 2nd ed. Oxford New York. 330p, 2000.

STAM, W.T.; BOELE-BOS, S. A.; STULP, B. K. Genotypic relationships between *Prochloron* samples from different localities and hosts as determined by DNA-DNA reassociations. **Archives of Microbiology**, v.142, p.340-341, 1985

STAM, W.T.; VENEMA, G. The use of DNA-DNA hybridization for determination of the relationship between some blue-green algae Cyanophyceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v.26, p.327– 342, 1975.

STULP, B.K.; STAM, W.T. Genotypic relationships between strains of *Anabaena* (Cyanophyceae) and their correlation with morphological affinities. **British Phycological Journal** 19: 287-301, 1984.

SVENNING M.M.; ERIKSSON, T.; RASMUSSEN, U. Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. **Archives of Microbiology**, v.183, p.19-26, 2005.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA and humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.512-526, 1993.

TAN, W.; LUI, Y.; WU, Z.; LIN, S.; YU, G.; YU, B.; LI, R. cpcBA-IGS as na effective marker to characterize *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondratieva (Cyanobacteria). *Harmful Algae*, v.9, p. 607-612, 2010.

TANABE, Y.; KAYA, K.T.; WATANABE, M.M. Evidence for Recombination in the Microcystin Synthetase (mcy) Genes of Toxic Cyanobacteria *Microcystis* spp. **Journal of Molecular Evolution**, v.58, p.633–641, 2004.

THOMAZEAU, S.; HOUDAN-FOURMONT, A.; COUTE, A.; DUVAL, C. COULOUX, A.; ROUSSEAU, F.; BERNARD, C. The contribution of sub-saharan african strains to the phylogeny of cyanobacteria: focusing on the Nostocaceae (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v.46, p.564–579, 2010.

TILLET, D.; PARKER, D.L.; NEILAN, B.A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. **Applied And Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2810–2818, 2001.

TOMITANI, A.; KNOLL, A.H.; CAVANAUGH, C.M.; OHNO, T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA**, v.103, n.14, p. 5442-5447, 2006.

TORGAN, L. C.; PAULA, M. D. C. F. D. *Geitlerinema amphibium* (Ag. Ex. Gom.) Anag. (Cyanophyta-Pseudanabaenaceae) em um lago no Município de Pântano Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Serie Botânica**, v.45, p.75–87, 1994.

TRIEU-CUOT, P.; CARLIER, C.; MARTIN, P.; COURVALIN, P. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to grampositive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.48, p.289-294, 1987.

VALÉRIO, E.; CHAMBEL, L.; PAULINO, S.; FARIA, N.; PEREIRA, P.; TENREIRO, R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. **Microbiology**, v.155, p. 642-656, 2009.

VALÉRIO, E.; PEREIRA, P.; SAKER, M.L.; FRANCA, S.; TENREIRO, R. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. **Harmful Algae**, v.4, n.6, p.1044-1052, 2005.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, n.2, p. 407–438, 1996.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.;

STARR, M.P.; TRUPER H.G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.463-464, 1987.

WEEDEN, N.; HIGGINS, R.C.; GOTTLIEB L.D. Immunological similarity between a cyanobacterial enzyme and a nuclear DNA-encoded plastid-specific isozyme from spinach. **Proceedings of Natural Academy of Sciences of the USA**, v.79, p.5953-5955, 1982.

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

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In BRYANT, D.A. (Ed.) **The Molecular Biology of the Cyanobacteria**, Dordrecht: Kluwer. p. 1-25, 1994.

WILSON, A. E.; SARNELLE, O.; NEILAN, B. A.; SALMON, T. P.; GEHRINGER, M. M.; HAY, M. E. Genetic variation of the bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among Lakes: implications for harmful Algal blooms. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.6126–6133, 2005.

WILSON, K.M.; SCHEMBRI, M.A.; BAKER, P.D.; SAINT, C.P. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p. 332–338, 2000.

WITTON, B.A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria**. Netherlands: Springer. 704 p. 2000.

WOOD, A.M.; MILLER, S.R.; LI, W.K.W.; CASTENHOLZ, R.W. Preliminary studies of cyanobacteria, picoplankton, and virioplankton in the Salton Sea with special attention to phylogenetic diversity among eight strains of filamentous cyanobacteria. **Hydrobiologia**, v.473, p.77–92, 2002.

WU, Z.; SHI, J.; LIN, S.; LI, L.. Unraveling molecular diversity and phylogeny of *Aphanizomenon* (Nostocales, Cyanobacteria) strains isolated from China. **Journal Phycology**, v.46, p.1048–1058, 2010.

YERRAPRAGADA, S.; SIEFERT, J.L.; FOX G.E. Horizontal gene transfer in cyanobacterial signature genes. **Methods in Molecular Biology**, v.532, p.339-366, 2009.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; SATOMI, M.; TAKASHIMA, Y.; HOSODA, N.; HIROISHI, S. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.407–415, 2008.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; HIORNS, W.D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes : evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. **Microbiology**, v.143, p.1443-1450, 1997.

ZHANG, M.; KONG, F.; TAN, X.; YANG, Z.; CAO, H.; XING, P. Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.663–670, 2007.

ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J. Bootstrap, Bayesian probability and maximum likelihood mapping: Exploring new tools for comparative genome analyses. **BMC Genomics**, v.3, p.4, 2002.

ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; CHARLEBOIS, R.L. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. **Genome Research**, v.16, p.1099-1108, 2006.

ZHENG, W.; SONG, T.; BAO, X.; BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U. High cyanobacterial diversity in coralloid roots of cycads revealed by PCR fingerprinting. **FEMS Microbiology Ecology**, v40, p.215–22, 2002.

ZILINSKAS, B.A.; HOWELL, D.A. Immunological conservation of phycobilisome Rod Linker Polypeptides. **Plant Physiology**, v.85, p.322-326, 1987.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A – Matriz de alinhamento “PC-IGS *Geitlerinema*” com 19 linhagens de *Geitlerinema* com sequências dos genes *cpcB* e *cpcA* e do espaçador IGS do marcador PC-IGS. As sequências dos *primers* foram eliminadas. AY575949 (*Spirulina subsalsa*)- grupo externo.

7.2. Anexo B – Matriz de alinhamento “16S-23S-ITS rDNA *Geitlerinema*” com 13 linhagens de *Geitlerinema*, com sequências do gene 16S, do RNA transportador tRNA (Ile) e do espaçador ITS do marcador 16S-23S-ITS rDNA. As sequências dos *primers* e do gene 23S foram eliminadas. AY575935 (*Spirulina subsalsa*)- grupo externo.

7.3 Anexo C - Matriz de alinhamento “PC-IGS *Microcystis* A” com 27 linhagens de *Microcystis* com sequências dos genes *cpcB* e *cpcA* e do espaçador IGS do marcador PC-IGS. As sequências dos *primers* foram eliminadas. CP000806 (*Cyanothece* sp.) - grupo externo.

7.4 Anexo D - Matriz de alinhamento “PC-IGS *Microcystis* B” com 74 linhagens de *Microcystis* com sequências dos genes *cpcB* e *cpcA* e de seu espaçador IGS do marcador PC-IGS. As sequências dos *primers* foram eliminadas. CP000806 (*Cyanothece* sp.) - grupo externo.

7.5 Anexo E - Matriz de alinhamento “16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* A” com 27 linhagens de *Microcystis* com sequências do RNA transportador tRNA (Ile) e do espaçador ITS do marcador 16S-23S-ITS rDNA. As sequências dos *primers* e dos genes 16S e 23S foram eliminadas. CP000806 (*Cyanothece* sp.) – grupo externo.

7.6 Anexo F - Matriz de alinhamento “16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* B” com 79 linhagens de *Microcystis* com sequências do RNA transportador tRNA (Ile) e do espaçador ITS do marcador 16S-23S-ITS rDNA. As sequências dos *primers* e dos genes 16S e 23S foram eliminadas. CP000806 (*Cyanothece* sp.) – grupo externo.

[illegible]

cpcB

150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280																																																																																				
GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GCCTAGTTGAAGCGCCTTGAAGTCACCTAGAACCTCAATTC	GC

cpcB

IGS

[illegible]

IGS

[illegible]

IGS

cpcA

7.2. Anexo B – Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA *Geitlerinema*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
BCU1SP31	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP79	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP87	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP84	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP85	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP86	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP88	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP89	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP90	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
BCU1SP91	GAAGTCATTACCCTAACCCG	---AAGGAGGGGGATGCTTAAGCAGAGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT
AY575935	GAAGTCGTTACTCCAACTGT	TTACACAGAGAGGGCCGAAGGTGGGGCTAGTAGTGATG666GTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGACAGAGGTGTGGCTGGATCACTTCCTTT	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	---	---	---	---	---	---	---	CAAGGAGACCTTACCCAC	---	CAAT

[illegible][illegible]

7.2. Anexo B – Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA *Geilgerinema* continuação[illegible]

ITS

BCU5P31	GGTA	498
BCU5P79	GGTA	498
BCU5P87	GGTA	498
BCU5P84	GGTA	498
BCU5P85	GGTA	498
BCU5P86	GGTA	541
BCU5P94	GGTA	517
BCU5P352	GGTA	516
BCU5P80	GGTA	519
BCU5P338	GGTA	520
BCU5P350	GGTA	520
BCU5P91	GGTA	520
AY575935	-GTA	451

ITS

[illegible]

[illegible]

cpbA

[illegible]

tRNA (Ile)

7.6 Anexo F - Matriz de alinhamento 16S-23S-ITS rDNA *Microcystis* B continuação

HM01.7079	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTATG--AGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCATAAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	138
HM01.7109	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTG--TGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCATAAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	138
AP060952	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTATG--AGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCATAAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	138
W7.3519	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AJ330417	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AJ665181	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
FJ830620	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAA-CTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	139
AY336134	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
HM01.7095	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.8951	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AY266126	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AY266124	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AY266135	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AY266127	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AY266125	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM421557	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
BCU5P11	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
BCU5I200	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
BCU5I232	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
BCU5I298	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
BCU5I262	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.3526	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.3527	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AF.387609	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.3523	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.3532	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	140
AM77.3538	AGTAGTCGCTACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTGCGAATTTGGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCACAACAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	138
AB01.5388	AGTAGTGAACCAAGAAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTATG--TGCTTTCAAACCTAGGTTCTGGGTTTCATAAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	138
CP060806	--TAG-CCTGAACTTTGAATCAATCCCA--AGGTCGTGACAAGG-GAAA-TAG-T---GAGC-AGCTTTCAAACCTAAGAAGGGTTTG-----GGAATAAAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGTATAAGG	123

ITS

tRNA (Ile)

[illegible]

ITS

tRNA (Ile)

[illegible]

ITS

