

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

DANILLO OLIVEIRA DE ALVARENGA

Análise polifásica de cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana*

Piracicaba

2011

DANILLO OLIVEIRA DE ALVARENGA

Análise polifásica de cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana*

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba
2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Alvarenga, Danilo Oliveira de

Análise polifásica de cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana* / Danilo Oliveira de Alvarenga; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2011.

105 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bacteriologia 2. Biologia molecular 3. Ecossistemas de mangue
4. Filogenia 5. Microscopia eletrônica 6. RNA ribossômico 7 Sequenciamento genético
I. Título

CDU 579.81:633.876

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação, pelo apoio e por conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo pelo suporte e pela oportunidade de ingresso no curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa e pelo fornecimento das bolsas de mestrado.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo, coordenador do projeto temático da FAPESP, e sua equipe pela coleta dos materiais.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai por disponibilizar o sequenciador e a Fábio Rodrigo Sanches Duarte pelo apoio técnico.

Às Profas. Dra. Célia Leite Sant'Anna e Dra. Maria Tereza de Paiva Azevedo e ao Prof. Dr. Luiz Henrique Zanini Branco pelo auxílio nas observações do material.

A Mônica Lanzoni Rossi e à Profa. Neusa de Lima Nogueira pela orientação na microscopia eletrônica.

Aos Profs. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka e Dr. Elliot Watanabe Kitajima por possibilitarem o acesso ao microscópio eletrônico.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda e sua equipe por permitirem o acesso ao microscópio óptico.

Às(aos) colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Adriana Sturion Lorenzi, Ana Cláudia Carraro Alleoni, Ana Paula Dini Andreote, Bruna Ribeiro Gama, Caroline Hoff, Caroline Souza Pamplona da Silva, Diego Bonaldo Genuário, Elaine Crespim, Isabela Moraes Ascêncio, Janaina Rigonato, Luciana Mecatti Elias, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, Maria Estela Stenico, Mariana Garcia Leal, Marina Gumiere, Natália Juliana Nardelli Gonçalves, Paula Thaísa Moreira Acedo, Ricardo Yukio Honda e Tânia Keiko Shishido pela ajuda, pela amizade e pelo companheirismo.

A Marília Ribeiro Garcia Henyei pela revisão e correção da formatação da dissertação.

À minha família, cujo apoio me permitiu chegar até aqui.

A todas as pessoas que tiveram alguma contribuição direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Uma harmonia secreta se estabelece entre a terra e os povos que ela nutre, e quando as sociedades imprudentes se permitem levantar a mão sobre aquela que faz a beleza de seus arredores, elas terminam sempre por se arrepender.

Élisée Reclus

RESUMO

ALVARENGA, D. O. **Análise polifásica de cianobactérias da filosfera da *Avicennia schaueriana***. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

A superfície das folhas de árvores (filosfera) oferece uma grande área de habitat para os micro-organismos, mas constitui um ambiente extremo. O desenvolvimento de comunidades microbianas é dependente de fonte de carbono e de certos nutrientes essenciais inorgânicos comumente liberados pela planta para a sua superfície. No entanto, um grupo especial de bactérias, Cyanobacteria, é menos dependente da planta para sua nutrição, pois vários destes organismos são autotróficos para carbono e nitrogênio. Portanto, Cyanobacteria é particularmente interessante para se avaliar neste ambiente. Neste estudo, linhagens de cianobactérias presentes na superfície das folhas secretoras de sal da planta de manguezal *Avicennia schaueriana* foram isoladas e caracterizadas morfológica, molecular e ultraestruturalmente. O potencial desses isolados para sintetizar moléculas bioativas também foi avaliado. Para isso, folhas de *A. schaueriana* foram coletadas em um manguezal com histórico de contaminação por petróleo, localizado próximo ao Rio Iriri, em Bertioga-SP. O isolamento das cianobactérias foi realizado usando quatro meios de cultura (BG-11, SWBG-11, BG-11_o e SWBG-11_o) e dois métodos: a) esfregaço das folhas nos meios sólidos em placas de Petri; e b) submersão das folhas em frascos Erlenmeyer contendo meios líquidos. Após a obtenção de culturas puras, os isolados foram crescidos em meios líquidos, as células foram concentradas e usadas para extração de DNA genômico. O gene de RNAr 16S de cada isolado foi amplificado por PCR usando iniciadores específicos (27F/1494Rc), clonado e sequenciado. As sequências de RNAr 16S foram usadas na construção de árvore filogenética. O potencial dos isolados para sintetizar moléculas bioativas foi acessado pela amplificação de PCR usando iniciadores específicos para sequências gênicas codificadoras de peptídeo sintetase (NRPS), policetídeo sintase (PKS), cianopeptolina, aeruginosina, saxitoxina, anatoxina-a/homoanatoxina-a and microcistina. Como resultado, trinta morfotipos foram isolados em meio líquido e quatro em meio sólido. Esses morfotipos foram identificados como pertencentes a quatro ordens diferentes (12 Nostocales, 9 Pseudanabaenales, 8 Chroococcales e 5 Oscillatoriales). Dentre os isolados, alta abundância de linhagens potencialmente fixadoras de N₂ foi encontrada, indicando que elas possivelmente são uma importante fonte de nitrogênio neste habitat. As sequências do gene de RNAr 16S de vinte e quatro isolados ficaram distribuídas em onze clados distintos na árvore filogenética e mostraram baixas similaridades com gêneros já descritos. Na análise da ultraestrutura destas linhagens, destacou-se a presença de grânulos de elevado volume em uma cianobactéria unicelular e de um arranjo de tilacoides incomum em uma cianobactéria filamentosa homocitada com morfologia aparentemente simples. Sequências gênicas codificadoras de PKS foram detectadas em dezessete linhagens, de aeruginosina em sete linhagens e de cianopeptolina em dez linhagens. Entretanto, sequências gênicas codificadoras de NRPS e das cianotoxinas microcistina, saxitoxina e anatoxina-a/homoanatoxina-a não foram detectadas. A superfície das folhas de *A. schaueriana* apresenta elevado número de cianobactérias não descritas, provavelmente um resultado das condições peculiares tanto da filosfera quanto do manguezal estudado. Este é o primeiro relato de isolamento de cianobactérias da superfície de folhas de *A. schaueriana*.

Palavras-chave: Sistemática. Filogenia. Ultraestrutura. RNAr 16S. Manguezal.

ABSTRACT

ALVARENGA, D. O. **Polyphasic analysis of cyanobacteria from the phyllosphere of *Avicennia schaueriana***. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

The tree leaf surface (phyllosphere) offer a large habitat area for microorganisms but constitute an extreme environment. The development of microbial communities is dependent of carbon source and certain essential inorganic nutrients commonly released from the plant to its surface. However, a special group of bacteria, Cyanobacteria, is less dependent of the plant for their nutrition since several of these organisms are autotrophic for carbon and nitrogen. Therefore, cyanobacteria are particularly interesting to be evaluated in this environment. In this study, cyanobacterial strains present in the salt-excreting leaf surface of the mangrove *Avicennia schaueriana* were isolated and morphologically, molecularly and ultrastructurally characterized. The potential of these isolates to synthesize bioactive molecules was also evaluated. To this purpose, *A. schaueriana* leaves were collected in a mangrove with history of oil contamination located near to the Iriri river in Bertiooga-SP. The isolation of cyanobacteria was achieved using four culture media (BG-11, SWBG-11, BG-11_o and SWBG-11_o) and two methods: a) smearing of leaves into solid media in Petri dishes; and b) submersion of leaves in Erlenmeyer flasks containing liquid media. After obtaining pure cultures, the isolates were grown into liquid media, and the cells were concentrated and used for genomic DNA extraction. The gene of 16S rRNA of each isolate was amplified by PCR using specific primers (27F/1494Rc), cloned and sequenced. The 16S rRNA sequences were used for the construction of a phylogenetic tree. The potential of the isolates to synthesize bioactive molecules was assessed by PCR amplification using primers specific for gene sequences encoding non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), polyketide synthase (PKS), cyanopeptolin, aeruginosin, saxitoxin, anatoxin-a/homoanatoxin-a and microcystin. As results, thirty morphotypes were isolated in liquid media and four in solid media. These morphotypes were identified as belonging to four different orders (12 Nostocales, 9 Pseudanabaenales, 8 Chroococcales and 5 Oscillatoriales). Among the isolates, it was found a high abundance of potentially N₂-fixing strains, what indicates that they possibly are an important source of nitrogen in this habitat. The 16S rRNA gene sequences of twenty-four isolates were distributed into eleven distinct clades in the phylogenetic tree and showed low similarities with described genera. In the ultrastructural analyses of these strains, it was highlighted the presence of granules of high volume in a unicellular cyanobacterium and an unusual thylakoid arrangement in a homocytous filamentous cyanobacterium with apparently simple morphology. Gene sequences encoding for PKS were detected in seventeen strains, for aeruginosine in seven strains and cyanopeptolin in ten strains. Gene sequences encoding for NRPS and for the cyanotoxins microcystin, saxitoxin, and anatoxin-a/homoanatoxin-a were not found. The leaf surface of *A. schaueriana* presents a high number of undescribed cyanobacteria, probably as a result of the peculiar conditions of the phyllosphere and the studied mangrove. This is the first report cyanobacterial isolation from the leaf surface of *A. schaueriana*.

Keywords: Systematics. Phylogeny. Ultrastructure. 16S rRNA. Mangrove.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Biologia e história evolutiva do filo Cyanobacteria	12
2.2 Sistemática cianobacteriana	16
2.3 Ecossistemas de mangue e cianobactérias	22
2.4 Microbiologia da filosfera de <i>Avicennia</i>	25
3. HIPÓTESES	30
4. OBJETIVOS	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Isolamento de cianobactérias	31
5.1.1 Coleta de material	31
5.1.2 Preparo de meios de cultura	31
5.1.3 Inóculo e purificação	32
5.1.4 Identificação taxonômica	32
5.2 Caracterização molecular	33
5.2.1 Extração de DNA e amplificação do gene de RNAr 16S	33
5.2.2 Clonagem e transformação de produtos de PCR	34
5.2.3 Sequenciamento do gene de RNAr 16S	35
5.2.4 Processamento das amostras e análise filogenética	36
5.3 Caracterização ultraestrutural	37
5.3.1 Culturas de cianobactérias	37
5.3.2 Fixação, coloração e emblocagem das amostras	37
5.3.3 Microscopia óptica	37

5.3.4 Ultramicrotomia e microscopia eletrônica de transmissão	38
5.4 Detecção de regiões de genes de interesse biotecnológico e ecotoxicológico	38
5.4.1 Amplificação dos genes de NRPS e PKS	38
5.4.2 Amplificação de regiões dos genes de cianopeptolina e aeruginosina	39
5.4.3 Amplificação de genes de cianotoxinas	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Isolamento de cianobactérias	40
6.2 Caracterização molecular dos isolados	48
6.3 Caracterização ultraestrutural	58
6.4 Detecção de regiões de genes de interesse biotecnológico e ecotoxicológico	65
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são micro-organismos que desempenham um papel ecológico fundamental na natureza. Esse grupo de bactérias é o único capaz de realizar fotossíntese oxigênica e seu surgimento contribuiu para modificações profundas na biota, na atmosfera e no clima do planeta. Elas são encontradas em praticamente todos os ambientes terrestres atuando como produtoras primárias e fixadoras de nitrogênio atmosférico, apresentando importância ecológica em habitats oligotróficos ou que possuam condições ambientais extremas. Novos métodos para o estudo da ecologia e da evolução microbianas têm levado a um interesse crescente pela diversidade e funções ecológicas cianobacterianas de ambientes extremos. O ambiente estressante da superfície foliar de plantas de manguezal representa um nicho pouco explorado onde pode ocorrer colonização de cianobactérias, as quais possivelmente contribuiriam para a entrada de nutrientes nesse ecossistema.

Os manguezais atuam como ecossistemas de transição entre terra e mar e, como consequência, apresentam flutuações constantes em várias condições ambientais, tais como temperatura, luminosidade, salinidade, umidade, entre outras, que podem alcançar níveis extremos. Ecossistemas de mangue são caracterizados por uma vegetação típica que apresenta diversas adaptações morfológicas e fisiológicas como raízes aéreas, viviparidade, dispersão de propágulos ou capacidade de filtração e eliminação de sal marinho. Apesar da baixa diversidade vegetal neste ambiente, há uma elevada diversidade microbiana e animal. As interações entre árvores, solo e bactérias são essenciais para a ciclagem de nutrientes nos manguezais e, por conseguinte, para a manutenção da vida neste ecossistema.

As árvores pertencentes ao gênero *Avicennia* estão entre os mangues de maior tolerância à salinidade. Entre os mecanismos de adaptação ao manguezal observados nestas árvores encontram-se glândulas presentes na face abaxial de suas folhas, que secretam na superfície foliar o sal filtrado da água marinha. A alta salinidade resultante desse processo agrava a complexidade das dificuldades naturais enfrentadas pela microbiota da filosfera. A alta concentração de sal se soma à ausência de umidade, à baixa disponibilidade de nutrientes e à inconstância de luminosidade e temperatura normalmente encontradas no filoplano e torna este habitat ainda mais hostil para micro-organismos.

O cultivo de cianobactérias da superfície foliar de *Avicennia* é inédito e contribui para o avanço na sistemática desses organismos, além de propiciar isolados para pesquisas futuras em bioprospecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia e história evolutiva do filo Cyanobacteria

Dentro do domínio Bacteria, podem ser encontrados cinco filos contendo grupos de organismos capazes de realizar fotossíntese: Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, dos quais dois (Chlorobi e Cyanobacteria) são compostos exclusivamente por organismos fotossintéticos (GUPTA, 2010). O filo Cyanobacteria se destaca dentre as bactérias fotossintetizantes por sua diversidade, sua distribuição, sua complexidade morfológica e fisiológica, sua função ecológica e seu papel na história do desenvolvimento da vida no planeta.

A principal característica utilizada para a distinção das cianobactérias dos demais grupos bacterianos é o seu mecanismo de fotossíntese, que se diferencia claramente do mecanismo presente no restante das bactérias fotossintetizantes devido à presença de diferentes pigmentos e de dois centros de reação, dos quais um complexo enzimático chamado de fotossistema II possui a capacidade de utilizar a molécula de água como doadora de elétrons para a redução do dióxido de carbono, gerando oxigênio como produto final da fotossíntese (BARBER, 2008; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). Dessa forma, os organismos deste filo podem ser caracterizados como bactérias fotoautotróficas oxigênicas, ou oxifotobactérias (CASTENHOLZ, 2001).

Análises genômicas e filogenéticas apontam para uma distribuição parafilética da fotossíntese nos diferentes grupos bacterianos, indicando que os genes envolvidos no processo podem ter tido uma origem comum e se espalhado por táxons distantes por transferência lateral (RAYMOND et al., 2002). Os dois diferentes centros de reação encontrados nas bactérias (Fe-S, ou RC-1, e feofitina-quinona, ou RC-2) teriam evoluído antes do surgimento das cianobactérias e seus genes teriam se reunido de alguma forma no genoma do ancestral destas. Há duas hipóteses para explicar a reunião de genes neste ancestral: duplicação dos genes de um centro de reação e posterior divergência evolutiva, o que caracterizaria uma origem paráloga, ou transferência lateral dos genes de ambos os centros de reação, uma origem xenóloga (GUPTA, 2003).

A captação da energia solar pelo aparato fotossintético cianobacteriano é realizada principalmente por pigmentos como a clorofila *a*, a ficocianina e a ficoeritrina. São também encontrados carotenoides com a dupla função de servir como pigmentos acessórios à fotossíntese e de proteger as células contra o dano foto-oxidativo (HIRSCHBERG;

CHAMOVITZ, 1994). A variada concentração destes pigmentos nas células de diferentes espécies de cianobactérias produz uma diversidade de cores bastante ampla, variando entre verde, azulado, marrom, vermelho e amarelo. Também estão classificados neste filo organismos que possuem clorofila *b* (como os gêneros *Prochloron* e *Prochlorococcus*) ou clorofila *d* (como *Acaryochloris marina*) em adição à clorofila *a*, e isso lhes permite utilizar luz de diferentes comprimentos de onda e ocupar nichos distintos dos outros membros do grupo (KÜHL et al., 2005; TING et al., 2002).

Com a mediação de fotorreceptores, a composição de pigmentos de algumas cianobactérias pode ser alterada de acordo com as condições ambientais para proporcionar ao organismo maiores chances de sucesso adaptativo. Este processo, conhecido como adaptação cromática, é realizado por um sistema sensorial regulado por fitocromos que controla a produção de ficobiliproteínas e pode ter se originado no ambiente aquático como uma consequência da luz de diferentes comprimentos de onda resultante da estratificação na coluna d'água (KEHOE, 2010).

Além de fixarem carbono inorgânico por meio da fotossíntese, algumas cianobactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (FIORE; HONDA, 2008), sendo que cianobactérias epifíticas são os organismos com o maior percentual de contribuição à fixação de nitrogênio para algumas plantas de solos alagados (ARIOSIA et al., 2004). Acredita-se que o sistema de fixação biológica de nitrogênio possua origem no aparato fotossintético bacteriano, tendo surgido por um processo complexo que envolveu duplicação, recrutamento, fusão e, posteriormente, transferência lateral de genes, evidenciada pela distribuição parafilética dos genes envolvidos neste processo nos domínios Archaea e Bacteria (RAYMOND et al., 2004). Apesar de ser um dos processos metabólicos de maior custo energético na natureza, em que 16 moléculas de ATP são gastas para cada N₂ fixado (SIMPSON; BURRIS, 1984), a fixação biológica de nitrogênio constitui uma grande vantagem adaptativa por conferir maior autonomia às células e permitir a colonização de ambientes deficientes em nitrogênio. Acredita-se que a sensibilidade ao nitrogênio apresentada pela nitrogenase esteja relacionada à provável origem desta enzima em um período anterior à oxigenação da atmosfera terrestre, e que os mecanismos de separação espacial ou temporal utilizados pelas cianobactérias para segregar a fotossíntese e a fixação de nitrogênio tenham coevoluído com o estado de oxidação dos oceanos e da atmosfera (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003).

Algumas cianobactérias são também eficientes produtoras de vitamina B12 e possuem papel fundamental na biogeoquímica desta substância, em especial nos oceanos, onde podem

contribuir com uma concentração de cianocobalamina 50 vezes maior que a de bactérias heterotróficas (BONNET et al., 2010).

Portanto, algumas cianobactérias necessitam apenas de água, luz e alguns micronutrientes para sua sobrevivência, e desse modo podem sustentar o estabelecimento de organismos heterotróficos em locais com depleção de nutrientes. Biofilmes dominados por cianobactérias possuem alta qualidade nutricional e podem sustentar grande biomassa de consumidores primários (NAGARKAR et al., 2004; YAMAMURO, 1999).

Apesar da fotoautotrofia ser o principal modo de obtenção de energia, em determinadas condições podem ser encontradas em algumas cianobactérias outras formas de metabolismo como a foto-heterotrofia, a quimio-heterotrofia, a redução de sulfeto e a fermentação com produção de CO₂, H₂, acetato, lactato ou etanol (COHEN et al., 1986; RIPPKA, 1972; STAL; MOEZALAAR, 1997), o que dá a estes organismos grande flexibilidade metabólica e possibilita a colonização de ambientes com diferentes intensidades de luz e concentrações de oxigênio. Em alguns ambientes, a mixotrofia, ou a combinação de diferentes estratégias metabólicas, pode ser também observada (EILER, 2006). Um grupo de cianobactérias picoplanctônicas ainda não cultivadas que não apresentam ficobiliproteínas e fotossistema II possivelmente possuem um modo de vida ainda desconhecido que pode ser completamente novo para a biologia (BOTHE; TRIPP; ZEHR, 2010).

O grupo das cianobactérias provavelmente se ramificou após as bactérias verdes não sulfurosas e antes das bactérias verdes sulfurosas (GUPTA, 2003). Em sua origem, há pelo menos 2,4 bilhões de anos atrás, foi inicialmente representado por organismos unicelulares de pequeno diâmetro celular, habitantes de água doce (BLANK; SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010), adquirindo complexidade morfológica e fisiológica à medida que se espalhavam pelos mais diversos ambientes da Terra.

A evolução da fotossíntese oxigênica resultou na elevação da concentração de oxigênio na atmosfera terrestre e provocou a transição de um ambiente de temperatura elevada, dominado por metano, para uma era glacial em um período de tempo bastante curto em termos evolutivos, 1 milhão de anos, marcando o início da era paleoproterozoica (KOPP et al., 2005). A mudança de uma atmosfera anaeróbia para uma aeróbia, período em que ocorreu a transformação mais radical dos ciclos biogeoquímicos terrestres desde o próprio surgimento da vida, também promoveu a formação da camada de ozônio, a qual permitiu, devido à sua capacidade de proteger a superfície terrestre contra a radiação ultravioleta, que os organismos pudessem explorar novos habitats, em especial o ambiente terrestre (BARBER, 2008). Esta transição para uma atmosfera com predomínio de oxigênio foi essencial para o

surgimento do domínio Eukarya (DI GIULIO, 2007). Além disso, ao possibilitar uma forma mais eficiente de respiração, a respiração aeróbica, capaz de gerar 20 vezes mais energia celular que a respiração anaeróbica, a nova atmosfera propiciou a evolução dos organismos multicelulares (BARBER, 2008).

Cianobactérias também influenciaram a evolução das eucárias por meio da simbiose. Várias cianobactérias simbiontes de plantas, algas e fungos provocam diversas mudanças na morfologia do organismo hospedeiro por simbiogênese (BENSON; MARGULIS, 2002; CHAPMAN; MARGULIS, 1998). A mais notável das alterações estruturais das eucárias resultantes deste processo é representada pelos cloroplastos das algas e das plantas, que se originaram pela endossimbiose entre um eucarioto primitivo e uma cianobactéria provavelmente relacionada à subclasse Oscillatoriothycidae (GUPTA, 2009; MARGULIS, 1970). Endossimbioses como esta continuam a ocorrer (NAKAYAMA; ISHIDA, 2009).

O filo Cyanobacteria é conhecido pela produção de cianotoxinas, de maneira que florações desses micro-organismos produzem peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos, provenientes da ação de enzimas como peptídeo sintetase (NRPS, do inglês “non-ribosomal peptide synthetase”) e policetídeo sintase (PKS, do inglês “polyketide synthase”) (BÖRNER; DITTMAN, 2005; DITTMAN; NEILAN; BÖRNER, 2001). Essas substâncias podem apresentar ações hepatotóxicas, neurotóxicas ou citotóxicas sobre animais ou ter atividade contra alguns organismos do zooplâncton e fitoplâncton ou até mesmo contra outras cianobactérias (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Algumas hipóteses foram levantadas para o papel ecológico das cianotoxinas, como a alelopatia (LEÃO; VASCONCELOS; VASCONCELOS, 2009; PFLUGMACHER, 2002) e a proteção contra a predação (THACKER; MCLEOD; MCLEOD, 2005), mas as funções ecológicas e evolutivas destas substâncias ainda não são claras. Cianotoxinas podem ser utilizadas também como uma forma de conseguir fosfato inorgânico por meio da indução da liberação de fosfatases alcalinas por membros do fitoplâncton (RAVEN, 2010).

A produção de metabólitos secundários bioativos por cianobactérias é também bastante conhecida. Algumas das substâncias conhecidas têm efeito anti-inflamatório, anti-infeccioso ou ação neurológica, e outras podem combater células cancerígenas. O potencial de geração de produtos naturais a partir destes micro-organismos é superado, até o momento, apenas pelo potencial de mixobactérias e de actinobactérias do gênero *Streptomyces* (NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010).

Cianobactérias podem ainda proteger seu habitat contra a poluição e atuar na biorremediação de ambientes contaminados. Elas são úteis na biossorção de metais pesados e

na biodegradação de derivados de petróleo, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de outros xenobióticos (JUHASZ; NAIDU, 2000; RAGHUKUMAR et al., 2001).

A alta diversidade dentro desse grupo se manifesta em nível molecular. O material genético das cianobactérias é composto, assim como outras bactérias, por uma ou mais moléculas de plasmídeo, presentes em praticamente todas as cianobactérias, e por DNA cromossomal, cujo tamanho pode variar entre $1,6 \times 10^9$ a $8,6 \times 10^9$ Da e que pode possuir várias cópias idênticas dentro de uma mesma célula, o que pode favorecer a recombinação genética por possíveis interações (COHEN; GUREVITZ, 2006). Alta diversidade genética é evidenciada pela ampla distribuição e hipervariabilidade de elementos transponíveis nos genomas de cianobactérias, os quais chegam a constituir até 10,95 % do genoma total de algumas linhagens, com alto percentual destes elementos podendo ser detectado em genomas de cianobactérias que habitam ambientes extremos (LIN et al., 2010), sendo que a capacidade de adaptação de um organismo a um ambiente extremo pode ser aumentada pela presença destes elementos (KIDWELL; LISCH, 2001).

A autonomia nutricional, a plasticidade fisiológica e a tolerância a condições desfavoráveis possibilitaram que este grupo atingisse a ampla distribuição encontrada hoje. Atualmente, cianobactérias podem ser encontradas tanto em ambientes comuns como solos, água doce, água marinha e superfície de plantas e rochas quanto em ambientes considerados extremos tais como fissuras de rochas do Ártico, geleiras, desertos, solos acidificados, fontes termais, pântanos e manguezais (WHITTON; POTTS, 2000). Sua distribuição mundial é superada apenas pela dos demais grupos de bactérias (ADAMS, 2000).

Essa longa e rica história evolutiva resultou em alta diversidade morfológica entre os membros do grupo, capaz de atingir grande complexidade em alguns táxons. São encontradas desde cianobactérias unicelulares simples até cianobactérias multicelulares com diferenciação celular, especialização funcional e capacidade de produzir ramificações verdadeiras multisseriadas (WATERBURY, 2006). Essa variação de forma constituiu durante bastante tempo o eixo central da taxonomia do filo.

2.2 Sistemática cianobacteriana

O estudo da diversidade de cianobactérias passou por profundas alterações desde Carl von Linné, o primeiro a estudar as formas morfológicamente menos complexas do grupo, que incluiu estes micro-organismos entre os grupos descritos em seu trabalho “Species Plantarum”, de 1753 (WHITTON; POTTS, 2000). A taxonomia das cianobactérias tem um

grande histórico de conflito. Inicialmente, devido à semelhança fisiológica entre os organismos deste filo e as eucárias fotossintetizantes hoje classificados no supergrupo Archaeplastida (ADL et al., 2005), as cianobactérias foram erroneamente classificadas como “algas verde-azuladas”. Logo, seu estudo foi inicialmente contemplado pela botânica, sendo somente mais tarde abraçado pela microbiologia (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). Atualmente, apesar da confirmação de sua natureza bacteriológica já completar décadas, não somente o Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana mas também o Código Internacional de Nomenclatura Botânica são utilizados independentemente pela comunidade científica na descrição de espécies cianobacterianas, o que gera confusão (OREN, 2004a). Durante a primeira metade do século XX, as “algas verde-azuladas” foram classificadas em quatro classes botânicas distintas: Schizophyceae, Phycchromaceae, Myxophyceae e Cyanophyceae (FRITSCH, 1945), apesar das relações entre este táxon e as bactérias já terem sido supostas há pelo menos 70 anos por Cohn (1875), e desta discussão ainda permanecer em andamento naquele momento (PRINGSHEIM, 1949). A comprovação definitiva desta relação veio na década de 1960, com a elucidação das diferenças celulares entre as células bacterianas e eucariontes. Por consequência, em 1974, na oitava edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology já podia ser encontrada a palavra “Cyanobacteria” (SAPP, 2005). Entretanto, descrições de novos táxons cianobacterianos por critérios microbiológicos continuam escassas até os dias atuais (OREN, 2011).

As limitações metodológicas e a alta diversidade morfológica das cianobactérias levaram tanto os sistemas botânicos (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985; BOURRELY, 1970; GEITLER, 1932; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005) quanto os sistemas microbiológicos (CASTENHOLZ, 2001; RIPPKA et al., 1979) de classificação a apresentarem uma ênfase muito grande em caracteres morfológicos, confiando a eles o papel de critério principal para a determinação de táxons.

Todavia, apesar da morfologia ter sido eleita naquele momento pela maior parte da comunidade científica como guia para a classificação clássica destes organismos, diferenças ou semelhanças entre morfotipos não necessariamente refletem o parentesco evolutivo – estruturas semelhantes podem ter origens diferentes, e estruturas distintas podem ter derivado de uma estrutura presente em um ancestral comum. Isso foi confirmado por diversos trabalhos que apontam que muitas hipóteses taxonômicas baseadas em caracteres morfológicos utilizados tradicionalmente não apresentam coerência com as conclusões obtidas por outras análises (GUGGER; HOFFMANN, 2004; LITVAITIS, 2002). Desse modo, apesar de ter sido importante para o desenvolvimento inicial dos estudos deste grupo, a ênfase sobre a

morfologia constituía uma grande barreira para a reconstrução da verdadeira história evolutiva do filo, precisando, portanto, ser revista (SWINGLEY et al., 2008). A taxonomia polifásica, considerada hoje uma ferramenta de classificação mais robusta, permite testar estas hipóteses e pode indicar quais destes caracteres morfológicos são confiáveis para o estabelecimento de táxons e de critérios de identificação (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Atualmente, recomenda-se a caracterização fenotípica em conjunto com a caracterização genotípica para a descrição de novas bactérias (TINDALL et al., 2010).

Nas últimas décadas, novas técnicas foram introduzidas à classificação taxonômica das cianobactérias, questionando a tradicional ênfase no estudo de suas características morfológicas e levando a uma ampla revisão de seus critérios. Dentre as técnicas responsáveis por essas mudanças, destacam-se a biologia molecular e a microscopia eletrônica (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Estas novas ferramentas têm sido úteis para elucidar diversas questões relativas à história natural das cianobactérias. Atualmente, a taxonomia deste grupo é baseada na abordagem polifásica, que busca combinar informações filogenéticas com dados morfológicos, ecológicos, ecofisiológicos e ultraestruturais (KOMÁREK, 2005; VAN DAMME, 1996) (Figura 1).

Os métodos de classificação baseados na comparação das sequências do gene da subunidade menor do ribossomo (RNAr 16S) foram introduzidos por Fox, Pechman e Woese em 1977. Desde o surgimento desta técnica, o sequenciamento do gene de RNAr 16S tem sido o critério mais utilizado para o estabelecimento de táxons bacterianos e para o desenvolvimento de estudos sobre a evolução bacteriana (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; WOESE, 1987). Árvores filogenéticas baseadas no gene de RNAr 16S são muitas vezes congruentes com filogenias obtidas a partir de genomas completos para categorias taxonômicas ao nível de gênero e acima (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007), o que indica sua confiabilidade.

Dessa forma, o sequenciamento do gene de RNAr 16S é atualmente considerado o método molecular padrão para a determinação de gêneros de cianobactérias. Atualmente, para que duas linhagens sejam classificadas dentro de um mesmo gênero deve haver um percentual de similaridade igual ou maior que 95 % entre suas sequências; um percentual abaixo deste limite em conjunto com um caractere citomorfológico diacrítico constitui um marcador para a separação de gêneros (KOMÁREK, 2010). Também estão inclusas na definição de gênero as características ecológicas, ecofisiológicas, ultraestruturais e bioquímicas dos organismos. Essa estratégia de complementariedade entre técnicas e critérios se mostrou bastante valiosa para a tarefa de levantar a história evolutiva dos numerosos táxons cianobacterianos.

Gloeobacterophycidae	Gloeobacterales cocooides	Gloeobacteraceae sem tilacoides		<i>Gloeobacter</i>
	Synechococcales cocooides	Synechococcaceae		<i>Cyanobium, Synechococcus, Rhabdoderma, Rhabdogloea, Cyanonephron, Cyanodictyon, Aphanothece, Prochlorococcus</i>
Synechococophycidae		Merismopediaceae		<i>Aphanocapsa, Merismopedia, Coelosphaerium, Limnococcus, Synechocystis, Coelomoron, Snowella</i>
		Chamaesiphonaceae heteropolar		<i>Geitleribactron, Cyanophanon, Clastidium, Chamaesiphon</i>
	Pseudanabaenales filamentosas	Pseudanabaenaceae		<i>Romeria, Pseudanabaena, Limnothrix, Halomicronema, Arthronema, Leptolyngbya, Planktolyngbya, Leiblenia, Heteroleiblenia, Tapinothrix, Geitlerinema, Spirulina, Halospirulina</i>
		Schizotrichaceae		<i>Schizothrix, Inactis, Trichocoleus</i>
Oscillatoriothycidae	Chroococcales cocooides	Cyanobacteriaceae		<i>Cyanobacterium, Cyanothece, Euhalothece, Myxobaktron, Aphanothece stagnina</i>
		Microcystaceae		<i>Microcystis, Gloeocapsa, Synechocystis</i>
		Gomphosphaeriaceae		<i>Gomphosphaeria, Woronichinia</i>
		Chroococcaceae		<i>Chroococcus, Microcrocis, Glosocapsopsis, Asterocapsa, Cyanosarcina</i>
		Entophysalidaceae fissão binária		<i>Cyanoarbor, Chlorogloea, Entophysalis</i>
		Stichosiphonaceae exócitos		<i>Stichosiphon, Chamaecalyx, Godlewskia</i>
		Dermocarpellaceae beócitos		<i>Dermocarpella, Stanieria</i>
		Xenococcaceae beócitos x fissão binária		<i>Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Xenococcus</i>
		Hydrococcaceae fissão binária		<i>Hydrococcus</i>
		Hyellaceae beócitos x fissão binária		<i>Hyella, Pleurocapsa</i>
	Oscillatoriales filamentosas	Borziaceae sem necridios		<i>Komvophoron, Borzia</i>
		Phormidiaceae com necridios		<i>Phormidium, Microcoleus, Trichodesmium, Tychonema, Planktothrix, Arthrospira</i>
	Oscillatoriaceae com necridios		<i>Oscillatoria, Lyngbya, Blemothrix, Plectonema, Polychamydum</i>	
	Gomontiellaceae com necridios		<i>Gomontiella, Crinalium, Starria</i>	
Nostocophycidae	Nostocales filamentosas	Scytonemataceae isopolar, ramificação falsa		<i>Scytonema, Brasilonema</i>
		Symphyonemataceae ramificação verdadeira (Y)		<i>Symphyonema, Mastigocladopsis, Symphyonemopsis,</i>
		Nostocaceae isopolar, sem ramificação		<i>Nostoc, Nodularia, Aphanizomenon, Anabaena, Cylandrospermopsis, Cylandrospermum</i>
		Microchaetaceae heteropolar		<i>Microchaete, Tolypothrix</i>
		Rivulariaceae heteropolar, pelos		<i>Calothrix, Rivularia</i>
		Hapalosiphonaceae ramificação verdadeira (T)		<i>Fischerella, Hapalosiphon, Mastigocladus, Westiellopsis, Nostochopsis, Chlorogloeopsis</i>
	Stigonemataceae ramificação verdadeira, multiseriada		<i>Stigonema</i>	

Figura 1 – Classificação das cianobactérias, baseado em taxonomia polifásica (adaptado de KOMÁREK, 2005).

Novos métodos para a inferência das relações evolutivas entre os diferentes grupos taxonômicos continuam a ser introduzidos. O relativamente novo campo da genômica comparativa se destaca entre estes métodos e pode levar a uma nova revolução dentro da sistemática microbiana. Dentre as ferramentas moleculares genômicas atualmente disponíveis para a classificação das cianobactérias, a verificação da presença de sequências de proteínas encontradas apenas em determinados táxons e a análise de inserções ou deleções conservadas em sequências de proteínas estruturais se mostram promissoras para o esclarecimento de graus de ancestralidade não passíveis de serem inferidos por análises filogenéticas comuns. A filogenômica em conjunto com estas análises de sinapomorfia e de proteínas exclusivas vem confirmando grande parte das observações feitas por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) aos níveis de subclasse e ordem e tem dado maior robustez à classificação cianobacteriana moderna (GUPTA, 2009; GUPTA; MATHEWS, 2010).

A diversidade cianobacteriana é um reflexo da variedade e da complexidade dos habitats ocupados por estes micro-organismos. Análises da diversidade de bactérias em ambientes naturais por técnicas independentes de cultivo frequentemente apontam alto número de representantes de táxons ainda não cultivados e de baixa similaridade com clones obtidos de outros ambientes. Os recursos disponibilizados nas últimas décadas para o estudo da diversidade e da ecologia bacteriana não somente têm levado a uma revolução na sistemática dos seus diversos grupos, mas também possibilitaram a re-emergência da biogeografia bacteriana, disciplina que estuda a distribuição espacial dos táxons bacterianos nas escalas local, regional e continental, examinando suas variações genéticas, fenotípicas e fisiológicas e os processos que geram e mantêm estes padrões de distribuição, visando propor e avaliar teorias relacionadas à criação e evolução dos padrões de diversidade no ambiente (RAMETTE; TIEDJE, 2007). Pesquisas realizadas nesta década trouxeram para esta disciplina uma nova visão que desafia fortemente o paradigma vigente.

A despeito de já ser observada em alguns micro-organismos patogênicos a seres humanos há alguns séculos (HEDLUND; STALEY, 2004), há uma tradicional rejeição da hipótese de padrões geográficos e endemismo em bactérias, resultado da crença de que os aspectos geográficos são irrelevantes para a microbiologia, sintetizada na máxima “tudo está em todo lugar, mas o ambiente seleciona” de Baas Becking, cunhada sob influência dos trabalhos de Martinus Beijerinck do final do século XIX (O'MALLEY, 2007). Todavia, um número cada vez maior de pesquisas indica que micro-organismos podem apresentar não apenas variações ambientais, mas também padrões geográficos, apontando que a hipótese da ubiquidade generalizada das espécies microbianas pode não ser necessariamente aplicável a

todos os casos (MARTINY, 2006). Atualmente, há um número crescente de trabalhos propondo o reconhecimento da existência de padrões biogeográficos e de endemismo bacterianos (HEDLUND; STALEY, 2004). A biogeografia bacteriana seria explicada pela combinação de fatores como a especiação, a extinção e a dispersão (RAMETTE; TIEDJE, 2007). Análises genéticas de alta resolução apontam que, enquanto há grande número de bactérias que não apresentam especiação alopátrica, este processo de fato pode ocorrer em algumas bactérias (WHITAKER, 2006).

A distribuição cosmopolita de um novo táxon microbiano é alcançada de maneira lenta o suficiente para proporcionar o desenvolvimento de diferenças regionais. Esse pode ser o caso de micro-organismos especializados em habitats raros ou isolados, já que pode haver baixo sucesso de dispersão destes organismos a um ambiente adequado à sua especialização ecológica. Evidências de limitações da dispersão de alguns micro-organismos são encontradas em algumas morfoespécies microbianas, que podem apresentar até mesmo padrões biogeográficos clássicos como provincialismo e decaimento por distância. Ao contrário do que se pensava anteriormente, há limitações significativas da dispersão microbiana e isto influencia de maneira considerável a distribuição de um determinado micro-organismo (TELFORD; VANDVIK; BIRKS, 2006).

O filo Cyanobacteria constitui um grupo bastante atraente para estudos de biogeografia microbiana devido à sua diversidade morfológica e genética. No grupo das cianobactérias, observa-se que diferentes genótipos e fenótipos são delimitados ecologicamente e podem surgir em condições ambientais favoráveis como resultado de seleção natural. Ambientes relativamente isolados e com características singulares proporcionam alta especialização ecológica e morfológica de cianobactérias e podem induzi-las à especiação, o que explicaria a alta diversidade morfotípica nos trópicos (REJMÁNKOVÁ; KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ, 2004).

Para cianobactérias adaptadas a ambientes extremos, as condições peculiares dos habitats em que se encontram podem atuar sobre a comunidade de maneira semelhante ao isolamento geográfico, adquirindo natureza próxima à de uma ilha, e provocar divergência genética (PAPKE et al., 2003). Em determinados ambientes extremos como a Antártica, que apresenta diversos locais onde a composição da biota é predominantemente microbiana, o endemismo é encontrado de maneira bastante elevada, inclusive entre cianobactérias (VYVERMAN et al., 2010).

A hipótese de endemismo microbiano levanta a possibilidade de que espécies microbianas tanto simbiotes quanto de vida livre sejam incluídas em listas de espécies ameaçadas de extinção (STALEY, 1997). Com essa hipótese, biomas ameaçados se tornam áreas prioritárias também para o estudo e a conservação da diversidade microbiana.

Esses fatos têm levado a um crescente interesse pela avaliação da biodiversidade cianobacteriana de ambientes extremos. O reconhecimento de que nem todos os microorganismos apresentam necessariamente um comportamento cosmopolita e a hipótese de endemismo microbiano têm conduzido a um crescente interesse pelo estudo das comunidades microbianas de ambientes de condições consideradas extremas, tais como: altas ou baixas temperaturas, baixa disponibilidade de nutrientes, hipersalinidade, intemperismo intenso etc. Estes fatos tornam as florestas de mangue locais bastante atraentes para estudos ecológicos e filogenéticos das cianobactérias.

2.3 Ecossistemas de mangue e cianobactérias

Manguezais são ecossistemas caracterizados pela presença de plantas altamente adaptadas morfológica e fisiologicamente às condições extremas encontradas nestes ambientes de transição entre terra e mar. Estes ecossistemas atuam como abrigo e sítio de reprodução de crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos, aves e répteis, e seus canais apresentam grande riqueza de fitoplâncton e zooplâncton. Sua biomassa pode muitas vezes superar a encontrada em algumas florestas tropicais (ALONGI, 2002). Estão amplamente distribuídos pela região costeira de zonas tropicais e subtropicais, abrangendo 112 países e territórios (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

Florestas de mangue são a principal fonte de matéria orgânica de águas costeiras no Brasil, devido à exportação de folhas de plantas e de carbono dissolvido e microparticulado (DITTMAR; LARA; KATTNER, 2001). Além disso, sua cobertura vegetal e localização lhes permitem atuar na diminuição da amplitude e da energia de ondas violentas e na redução do impacto sobre a costa resultante de desastres naturais como inundações, tempestades, furacões e ondas gigantes produzidas por maremotos (ADGER et al., 2005; DANIELSEN et al., 2005).

O interesse sobre os manguezais vem crescendo na última década e tem produzido diversas mudanças de paradigmas sobre a ecologia destes ecossistemas. Pesquisas recentes mostraram que as taxas de produção primária deste ambiente são próximas às de florestas tropicais, e que, apesar de parecerem arquiteturalmente simples, há grande complexidade nos fatores que regulam a sucessão e a zonação dos mangues. Apesar da diversidade vegetal

ser baixa e o crescimento das árvores estar relacionado a padrões climáticos, a diversidade animal e microbiana é bastante elevada: enquanto as relações entre plantas, solo e micro-organismos ajudam a conservar nutrientes escassos, caranguejos influenciam a função e a estrutura das florestas, que também possuem papel fundamental no ciclo de vida de peixes, para os quais funcionam como berçário. As comunidades arbóreas também possuem importância nas cadeias alimentares e algas representam uma significativa fonte de alimento neste ambiente. Além disso, manguezais são quimicamente diversos e constituem uma boa fonte de recursos naturais (ALONGI, 2009).

Apesar de sua grande importância ecológica, florestas de mangue estão entre os ecossistemas tropicais mais ameaçados no mundo. Nas últimas duas décadas, pelo menos 35 % da área mundial de mangues foi perdida, percentual que supera o impacto ambiental sobre recifes de corais e florestas tropicais (VALIELA; BOWEN; YORK, 2001). A degradação dos mangues é resultado da ação humana – entre as principais ameaças a estes ecossistemas, encontram-se: desenvolvimento urbano, aquicultura, pesca e caça, mineração, exploração de madeira, contaminação por metais pesados provenientes de efluentes industriais, despejo de efluentes de esgoto e derramamentos de hidrocarbonetos do petróleo (ALONGI, 2002; CURY, 2002; FIRME, 2003; TAM; YAO, 1998). Em escala global, estima-se que aproximadamente 1 milhão de hectares de mangue são perdidos anualmente (MOSCATELLI, 1999). A desvalorização dos benefícios ecológicos a longo prazo proporcionados por estes ecossistemas frente a ganhos econômicos imediatos tem levado até mesmo à dizimação dos mangues em alguns locais (MACINTYRE, 2009).

Além da presença de solos anóxicos e lamacentos e da ação de fortes marés, manguezais apresentam constantes flutuações em parâmetros ambientais como concentração iônica, temperatura e radiação ultravioleta, o que constitui grande desafio adaptativo à biosfera local e origina nichos únicos, fatores que geram a grande diversidade de micro-organismos a despeito da baixíssima diversidade vegetal (DECHO, 2000). Bactérias são indiscutivelmente os organismos de maior abundância e diversidade em ecossistemas aquáticos e desempenham papel fundamental nos processos biogeoquímicos (OREN, 2004b), de maneira que a diversidade bacteriana e o funcionamento de ecossistemas costeiros podem apresentar correlação positiva (DANOVARO; PUSCEDDU, 2007).

A importância ecológica das bactérias é aumentada em ambientes oligotróficos e ricos em carbono orgânico como manguezais. Apesar de haver baixa disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo, essenciais para o crescimento de plantas, há uma alta produtividade vegetal nestes ecossistemas, o que somente se torna possível devido à interação

entre plantas e micro-organismos, estes últimos essenciais na ciclagem destes escassos nutrientes (BASHAN; HOLGUIN, 2002). Os solos de manguezais abrigam bactérias que trazem vários benefícios às plantas tais como a fixação de nitrogênio ou a produção de amônia, o estímulo do crescimento de mudas de forma direta, com a produção de ácido indol acético, ou indireta, pela solubilização de fosfato, e a sua proteção contra patógenos (KATHIRESAN; SELVAM, 2006). Bactérias solubilizadoras de fosfato são encontradas em grande abundância em manguezais (VAZQUEZ et al., 2000). Até 60 % do aporte de nitrogênio em manguezais pode provir da fixação biológica de nitrogênio (ZUBERER; SILVER, 1978). Essa taxa de fixação em bactérias heterotróficas é limitada pela disponibilidade de fontes de carbono e oxigênio (SAHOO; DHAL, 2009), limitação que pode potencialmente ser contornada por algumas cianobactérias. Além destes benefícios, bactérias de mangue podem ainda agir no processamento de dejetos industriais e na biodegradação de poluentes (SAHOO; DAHL, 2009).

Um dos fatores determinantes para a biodiversidade vegetal e animal é a produtividade primária de um ecossistema (ROSENZWEIG, 1995). O filo Cyanobacteria possui grande importância como produtor primário em ambientes hipersalinos (LÓPEZ-CÓRTEZ et al., 2001). Todavia, levantamentos sobre a diversidade de cianobactérias em manguezais no Brasil são escassos. Este grupo é frequentemente excluído de relatórios sobre a diversidade de ambientes marinhos (CRISPINO; SANT'ANNA, 2006). Entre os habitats de manguezal colonizados por cianobactérias encontram-se a coluna de água e sua superfície, partículas em suspensão e os meios interno e externo de plantas e animais; estes micro-organismos também colonizam superfícies submersas como raízes, galhos e sedimentos (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Geralmente, as espécies encontradas neste ecossistema possuem maior similaridade com as espécies de ambientes marinhos. Cianobactérias filamentosas não heterocitadas provavelmente são melhor adaptadas ao manguezal (BRANCO et al., 2003).

Cianobactérias diazotróficas contribuem significativamente para o aporte de nitrogênio em ecossistemas de mangue (LUGOMELLA; BERGMAN, 2002). A intensidade luminosa e a temperatura da água são dois fatores que demonstraram influenciar fortemente a taxa de fixação biológica do nitrogênio de cianobactérias associadas a árvores do gênero *Avicennia* (TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995a).

Nos manguezais brasileiros, há um predomínio de três gêneros de árvores: *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*, cada qual com adaptações específicas (DIAS et al., 2010; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1999). A fisiologia de *Avicennia* a destaca das outras.

O levantamento de cianobactérias em florestas de mangue é um assunto de grande interesse, pois além de esclarecer alguns pontos concernentes à biogeoquímica dos manguezais, ele pode também revelar táxons desconhecidos. As comunidades cianobacterianas que habitam estes ecossistemas permanecem como alvo de poucas pesquisas apesar de sua potencial diversidade e importância no funcionamento de manguezais.

2.4 Microbiologia da filosfera de *Avicennia*

Em analogia à rizosfera, Ruinem (1956) nomeou de filosfera a superfície externa das folhas das árvores habitada por micro-organismos. Alguns anos depois, reconhecendo esse como um nicho negligenciado, a mesma autora fez um levantamento de micro-organismos presentes na superfície das folhas de diversas plantas e verificou que havia colonização microbiana nas folhas de todas as plantas, encontrando também cianobactérias em todas as amostras (RUINEM, 1961).

A filosfera é um nicho bastante rico em espécies bacterianas que tem sido pouco abordado em estudos de ecologia microbiana (LINDOW; BRANDL, 2003). Mesmo geralmente apresentando comunidades que se diferenciam significativamente das comunidades da rizosfera devido às características peculiares deste habitat, fato que agrega bastante interesse à compreensão de sua ecologia, a maior parte das pesquisas envolvendo a microbiologia da filosfera até o momento se restringiu a estudos de interações planta-patógeno em culturas de interesse econômico (BELKIN; QVIT-RAZ, 2010).

Embora seja um habitat inconstante e hostil com limitação de nutrientes e variações extremas de condições ambientais, bactérias epifíticas são capazes de tolerar o estresse deste ambiente e de explorá-lo (GAU; DIETRICH; KLOPPSTECH, 2002). Folhas ricas em água e fósforo e de epiderme adaxial mais fina permitem maior colonização por bactérias (YADAV; KARAMANOLI; VOKOU, 2005). Até 10^7 células bacterianas por cm^2 podem ser encontradas na superfície das folhas de algumas plantas, e grande parte delas é proveniente de táxons ainda não estudados que possivelmente apresentam adaptações exclusivas para a sobrevivência neste habitat hostil, o que torna a filosfera um atraente objeto de estudo tanto de novos táxons quanto de genes de tolerância ao estresse (LINDOW; LEVEAU, 2002).

Anatomicamente, a folha pode ser dividida em três regiões principais: a epiderme, o mesofilo e os feixes vasculares. A cutícula, uma camada de ácidos graxos esterificados, recobre a epiderme e separa a folha do meio exterior. Estômatos e tricomas estão presentes em grande quantidade neste órgão. A superfície das folhas é um habitat dinâmico e transitório

que submete as bactérias a flutuações de temperatura, radiação ultravioleta, velocidade dos ventos e umidade relativa, que podem alternar entre extremos em escalas de segundos a horas. Ocorrem variações também devido à idade da folha, desde seu surgimento até a senescência. Desse modo, a comunidade bacteriana pode estar exposta a várias situações adversas simultâneas na filosfera (HIRANO; UPPER, 2000).

A cutícula, com a qual os micro-organismos da filosfera estão em contato direto, constitui uma barreira para a liberação de água, íons e nutrientes para o exterior da planta (SCHREIBER; KRIMM; KNOLL, 2004). Devido à escassez nutricional, a capacidade de fixar carbono e nitrogênio atmosféricos se torna uma característica importante para a colonização e a sobrevivência neste habitat por um micro-organismo e pode constituir uma importante vantagem ecológica frente a outros habitantes da filosfera, além de facilitar o estabelecimento de organismos heterotróficos e não diazotróficos. Cianobactérias podem ser os organismos com maior taxa de fixação de nitrogênio na filosfera de algumas plantas de florestas tropicais, promovendo uma entrada significativa de nitrogênio disponível nestes ambientes (FÜRNKRANZ, 2008).

Cianobactérias habitantes da filosfera oferecem benefícios em potencial às plantas de diversas maneiras, já que, além de disponibilizarem nitrogênio fixado (FREIBERG, 1998), seus biofilmes podem secretar moléculas inseticidas (BECHER; JÜTTNER, 2005) e produzir substâncias reguladoras de crescimento (SERGEEVA; LIAIMER; BERGMAN., 2002). Bactérias do filoplano são também capazes de degradar poluentes orgânicos voláteis (SANDHU; HALVERSON; BEATTIE, 2007).

De uma forma geral, a colonização do filoplano pode apresentar dois padrões: baixa riqueza e alta abundância, ou alta riqueza e baixa abundância (HIRANO; UPPER, 2000), ocorrendo grande variação no tamanho das populações entre folhas de diferentes idades, entre plantas de diferentes espécies ou mesmo de uma mesma espécie e de acordo com a estação, variação relacionada com a flutuação das condições físicas e nutricionais (BELKIN; QVITRAZ, 2010).

Análises moleculares provêm evidências de que a microbiota habitante da filosfera é muito mais complexa e diversa do que se acreditava e que este habitat abriga diversas bactérias ainda não descritas (YANG et al., 2001). Metabólitos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras podem provocar uma pressão de seleção sobre os micro-organismos associados a ela e fazer com que mesmo espécies de plantas com grande proximidade taxonômica entre si apresentem comunidades microbianas significativamente diferentes em suas folhas (KARAMANOLI et al., 2005). Todavia, a colonização da superfície das folhas é

influenciada não apenas pela espécie da planta, mas também pelo local em que ela se encontra. Em alguns casos, o local constitui o fator de maior importância na distribuição bacteriana na filosfera (KNIEF et al., 2010). Assim como em outros habitats, bactérias da filosfera podem apresentar padrões biogeográficos previsíveis (REDFORD et al., 2010).

Bactérias podem chegar à filosfera carregadas pelo ar, por animais ou em sementes, e seu estabelecimento e crescimento pode ser influenciado pela capacidade de sobreviver na superfície das folhas e por fatores climáticos como chuva e ventos. Restos de plantas podem ser também uma fonte importante de colonização. É possível ainda que bactérias da rizosfera penetrem as raízes e sejam transportados à filosfera pelo sistema vascular e que um micro-organismo alterne entre os estados endofítico e epifítico. Os pontos mais comuns de colonização da folha são as junções das paredes celulares da epiderme, os sulcos de nervuras, os estômatos e a base de tricomas (WHIPPS et al., 2008).

A heterogeneidade do habitat e a complexidade das condições ambientais podem influenciar positivamente a diversidade bacteriana (HORNER-DEVINE; CARNEY; BOHANNAN, 2004). Aproximadamente 97 % das bactérias habitantes da filosfera ainda não foram descritas, o que sugere que sejam organismos exclusivos deste habitat (LAMBAIS et al., 2006). Recentemente, foi descoberto um novo gênero de cianobactérias em folhas de bromélias e eucalipto, denominado *Brasilonema* (AGUIAR et al., 2008; FIORE et al., 2007), confirmando o potencial da filosfera em abrigar táxons exclusivos.

No gênero *Avicennia*, a filosfera adquire características ainda mais extremas que as encontradas em outras plantas. Para manter o balanço osmótico do organismo, as árvores deste gênero eliminam o sal absorvido da água marinha por meio de uma corrente de transpiração que o carrega até as folhas, em cuja superfície é liberado. Apesar de sal poder ser encontrado em ambas as faces foliares, seu sítio de secreção é encontrado na epiderme abaxial, a qual contém glândulas secretoras, que muitas vezes produzem cristais visíveis a olho nu na superfície desta face (FITZGERALD; ORLOVICH; ALLAWAY, 1992) (Figura 2). Até 90 % de todo o sal absorvido pode ser filtrado e eliminado por este processo (DRENNAN; PAMMENTER, 1982). Este método de excreção de sal pode servir também como um mecanismo de defesa contra doenças (GILBERT; MEJÍA-CHANG; ROJAS, 2002). É possível ainda que ocorra acréscimo de sal na superfície das folhas por deposição a partir de aerossóis da água marinha (SMITH et al., 1989). Entre os principais íons presentes na filosfera de *Avicennia*, podem ser encontrados Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- e SO_4^{2-} (SUÁREZ; MEDINA, 2009).

A taxa de excreção de sais pelas glândulas foliares aumenta conforme a salinidade do meio aumenta: em culturas de *A. marina*, a concentração salina na superfície das folhas pode ir de 2 % (em mudas cultivadas em água doce) a 5 % (em meios com sal a 35 ppt). As plântulas podem até mesmo ter seu crescimento estimulado por níveis moderados de salinidade. Dentre os mangues capazes de secretar sal, a maior tolerância à salinidade é apresentada por espécies do gênero *Avicennia* como resultado não somente da eficiência de seu processo de eliminação de sais, mas também da sua capacidade de acumular osmólitos como betaína e prolina no citoplasma de suas células e de sua baixíssima taxa de transpiração (YE et al., 2005).



Figura 2 – Cristais de sal em folha de árvore do gênero *Avicennia*. (Foto: Ulf Mehlig)

A complexidade das condições da superfície das folhas das árvores do gênero *Avicennia* é ainda elevada pela liberação de substâncias bioativas pelas folhas e por outros locais da parte aérea que apresentam atividade contra diversos tipos de bactérias (BOBBARALA; VADLAPUDI; NAIDU, 2009; SANTOS et al., 2010).

A despeito da hostilidade e da instabilidade das condições ambientais encontradas neste nicho, populações microbianas podem ser encontradas na filosfera de diversas espécies de árvores de manguezais, com diferenças entre zonas de salinidade (GUPTA; MISHRA; BASAK, 2009).

Células expostas a ambientes de elevada concentração salina estão sujeitas ao aumento da pressão osmótica e da concentração iônica, que levam à perda de água intracelular e ao grande influxo de íons no citoplasma, especialmente quando cloreto de sódio é a causa do estresse. A regulação do potencial osmótico pode ser realizada tanto pela acumulação de substâncias orgânicas atóxicas no citoplasma quanto pela exportação ativa de íons do interior para fora das células. (JOSET; JEANJEAN; HAGEMANN, 1996). A principal estratégia utilizada por células bacterianas para a manutenção do equilíbrio osmótico em ambientes hipersalinos consiste na conservação de um citoplasma com baixa concentração de sais, mas com elevados níveis intracelulares de alguns solutos orgânicos como glicilbetaína e ectoína, que proporcionam balanço osmótico ao mesmo tempo em que permitem a ação de enzimas não adaptadas à salinidade, conferindo alta flexibilidade e adaptabilidade às células (MADIGAN; OREN, 1999).

De forma semelhante, solutos produzidos pela própria cianobactéria ou adquiridos do ambiente como sacarose, trealose, glicosilglicerol, glutamato e glicilbetaína contribuem para o equilíbrio da osmolaridade e mantêm tanto a integridade de membranas quanto a estabilidade de proteínas estruturais e de proteínas relacionadas ao estresse (JOSET; JEANJEAN; HAGEMANN, 1996; PANDHAL; WRIGHT; BIGGS, 2008). É provável que mecanismos semelhantes também ocorram em cianobactérias que habitem a filosfera de *Avicennia* spp. As cianobactérias podem ser divididas em três grupos de acordo com sua capacidade de resistência à salinidade: sensíveis ao sal, moderadamente halotolerantes e halotolerantes extremas (REED; STEWART, 1988). Os gêneros *Anabaena*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Fischerella*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Plectonema* e *Stigonema* são os táxons que contêm linhagens de cianobactérias mais frequentemente relatadas como resistentes à dessecação prolongada (DEVI et al., 2010). A acumulação de sacarose no citoplasma é a principal forma de osmorregulação observada em células de cianobactérias que habitam ambientes de alta salinidade. Este processo é crítico para sua sobrevivência na fase estacionária e provavelmente foi repassado aos eucariotos fotossintetizantes durante o processo de endossimbiose envolvendo o hospedeiro eucarioto primitivo que lhes daria origem e a cianobactéria ancestral do cloroplasto (ROBERTS, 2005).

Até o momento, foram estudadas a filosfera de outras duas árvores que secretam sais nas superfícies das folhas, *Atriplex halimus* (SIMON; ABELIOVICH; BELKIN, 1994) e *Tamarix* sp. (QVIT-RAZ; JURKEVITCH; BELKIN, 2008). Todavia, devido a esses trabalhos apresentarem enfoque em outros táxons, nenhum desses dois trabalhos detectou a presença de cianobactérias nas amostras avaliadas.

3. HIPÓTESES

O ambiente extremo da superfície foliar de árvores de manguezal pode abrigar cianobactérias filogeneticamente distintas das encontradas em condições de não estresse, inclusive linhagens ainda não descritas. As cianobactérias que habitam esse ambiente apresentam maior potencial para síntese de produtos naturais bioativos de interesse biotecnológico.

4. OBJETIVOS

- Isolar e identificar morfológicamente cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman;
- Caracterizar por meio do sequenciamento do gene de RNAr 16S as cianobactérias isoladas;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre os isolados e entre outros provenientes de diferentes ambientes;
- Caracterizar ultraestruturadamente isolados com baixa similaridade de sequência do gene de RNAr 16S;
- Investigar a ocorrência de genes envolvidos na produção de metabólitos bioativos e cianotoxinas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolamento de cianobactérias

5.1.1 Coleta de material

Folhas de *A. schaueriana* foram coletadas em março de 2008 em um ponto próximo ao Rio Iriri, no canal de Bertioga-SP (23° 53' 50,4" S e 46° 12' 30,6" W), uma área de manguezal com histórico de derramamento de petróleo (Figura 3). As amostras obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos, armazenadas em câmara fria (4 °C), sendo logo em seguida iniciado o processo de isolamento das cianobactérias.

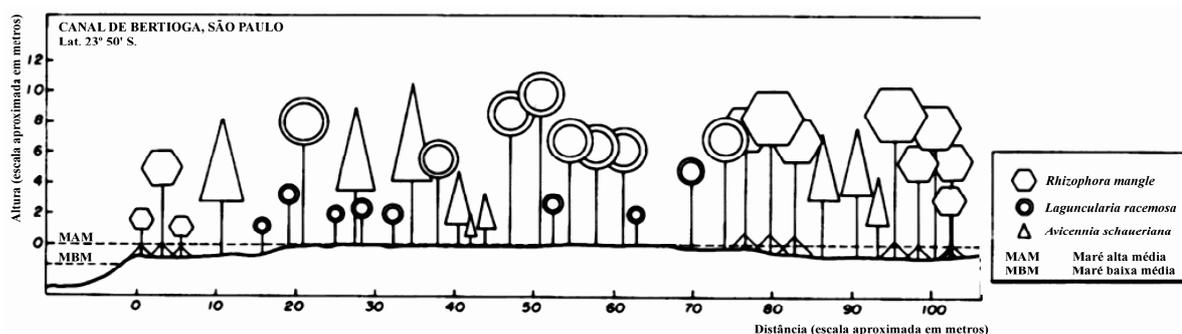


Figura 3 – Perfil da vegetação do canal de Bertioga-SP (adaptado de SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990).

5.1.2 Preparo de meios de cultura

O isolamento das cianobactérias das amostras de folhas coletadas foi realizado utilizando o meio de cultura BG-11 (ALLEN, 1968) e três modificações deste meio, BG-11₀, SWBG-11 e SWBG-11₀. O meio BG-11 é constituído por nitrato de sódio 1,5 g.L⁻¹, fosfato de potássio dibásico 0,04 g.L⁻¹, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,075 g.L⁻¹, cloreto de cálcio di-hidratado 0,036 g.L⁻¹, ácido cítrico 0,006 g.L⁻¹, citrato de amônio férrico 0,006 g.L⁻¹, EDTA sódico 0,001 g.L⁻¹, carbonato de sódio 0,02 g.L⁻¹, ácido bórico 0,00286 g.L⁻¹, cloreto de magnésio tetra-hidratado 0,00181 g.L⁻¹, sulfato de zinco 0,0002 g.L⁻¹, molibdato de sódio dihidratado 0,00039 g.L⁻¹, sulfato de cobre penta-hidratado 0,000079 g.L⁻¹ e nitrato de cobalto hexa-hidratado 0,000049 g.L⁻¹. No preparo de SWBG-11, água salgada artificial foi produzida pela adição de cloreto de sódio 12,5 g.L⁻¹, cloreto de magnésio hexa-hidratado 1,0 g.L⁻¹ e

cloreto de potássio $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ ao meio BG-11 (CASTENHOLZ, 1988). Para BG-11₀ e SWBG-11₀ (sem fonte de nitrogênio), foi adotada a mesma composição descrita anteriormente para BG-11 e SWBG-11, respectivamente, mas com a omissão de nitrato de sódio. Meios sólidos foram produzidos pela adição de ágar à concentração final de 1,5 %. Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos.

5.1.3 Inóculo e purificação

As folhas coletadas foram inoculadas nos meios de cultura por meio de esfregação em placas de Petri contendo 20 mL de meio sólido ou por submersão em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido. A incubação das amostras se deu em câmara de crescimento a 25 ± 1 °C sob iluminação fluorescente de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoper\u00edodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

Avalia\u00e7\u00f5es constantes foram realizadas em microsc\u00f3pio \u00f3ptico Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) para verificar o crescimento de col\u00f4nias. Ap\u00f3s ter sido confirmada a presen\u00e7a de cianobact\u00e9rias nos meios, as col\u00f4nias foram transferidas para uma nova placa contendo meio s\u00f3lido esterilizado. Para separar as cianobact\u00e9rias de algas, fungos e outras bact\u00e9rias, foram realizadas repicagens sucessivas por meio de estriamento em novas placas de Petri contendo meio de cultura esterilizado, as quais foram posteriormente incubadas sob as mesmas condi\u00e7\u00f5es descritas anteriormente.

5.1.4 Identifica\u00e7\u00e3o taxon\u00f4mica

A identifica\u00e7\u00e3o taxon\u00f4mica dos isolados foi realizada tendo como base caracteres morfol\u00f3gicos, seguindo as chaves de identifica\u00e7\u00e3o descritas por Kom\u00e1rek e Anagnostidis (1999, 2005) com o aux\u00edlio de microsc\u00f3pio \u00f3ptico. Como sistema de classifica\u00e7\u00e3o, foi adotada a revis\u00e3o de Hoffmann, Kom\u00e1rek e Ka\u0161tovsk\u00fd (2005). Constatada a purifica\u00e7\u00e3o dos isolados, um in\u00f3culo foi transferido para frascos contendo meio l\u00edquido, visando a extra\u00e7\u00e3o de DNA ap\u00f3s o crescimento das c\u00e9lulas. As culturas foram fotografadas em microsc\u00f3pio \u00f3ptico Axioskop 40 equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE 4.6 (Carl Zeiss) no Laborat\u00f3rio de Carbono 14 do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de S\u00e3o Paulo, Piracicaba-SP.

5.2 Caracterização molecular

5.2.1 Extração de DNA e amplificação do gene de RNAr 16S

A extração de DNA das cianobactérias foi realizada de acordo com o protocolo de Fiore et al. (2000) descrito a seguir: 3 mL de culturas na fase exponencial de crescimento crescidas em meio líquido foram concentradas em centrífuga Hettich Universal Mikro320R (Hettich, Tuttlingen, Alemanha) durante 5 minutos a 7392 x g. As células concentradas foram lavadas com água ultrapura esterilizada (Millipore, Bedford, MA, EUA), submetidas a choque térmico com nitrogênio líquido e banho-maria a 55 °C e lavadas com 1 mL da solução I (EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 50 mM). O pélete foi posteriormente ressuscitado em 200 µL da solução II (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 50 mM) com a adição de 2 µL de proteinase K 200 µg.mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 55° por 10 minutos. Após este período de tempo, ocorreu a adição de 600 µL de tampão de extração pré-aquecido (CTAB 3%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, Sarkosyl 1 % e β-mercaptoetanol 1%) e a incubação em banho-maria a 55 °C por 30 minutos, com a inversão dos tubos a cada 5 minutos. Em seguida, 800 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v) foram adicionados aos tubos, os quais foram invertidos 30 vezes e submetidos a centrifugação por 5 minutos a 7392 x g. Um volume de 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 1000 µL de NaCl 4 M e 50 µL de uma suspensão de sílica, seguido da incubação a 55 °C por 10 minutos. Após a centrifugação por 30 segundos a 7392 x g, o sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado duas vezes com 250 µL da solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 2,5 mM e etanol 50 %). Seguiu-se a secagem do pélete em bloco de aquecimento (LabLine Instruments, Illinois, IL, EUA), sua reidratação com 30 µL de água ultrapura esterilizada, sua ressuspensão e a centrifugação a 7392 x g por 30 segundos. Após a incubação em banho-maria a 45 °C durante 10 minutos e a centrifugação a 7392 x g durante 1 minuto, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo esterilizado. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até a próxima etapa.

Para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene de RNAr 16S dos isolados de cianobactérias, foi utilizado o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (NEILAN et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo tampão PCR 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, 1 U de Platinum[®]

Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 10 ng de DNA, 5 μ mol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, totalizando um volume final de 25 μ L. A reação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra) nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de 94 °C por 10 s, 50 °C por 20 s e 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C durante 7 min.

Cinco microlitros dos produtos de PCR foram acrescidos de tampão de carregamento (sacarose 40 % e azul de bromofenol 0,25 %) contendo o corante SYBR[®] Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) à concentração de 1 μ L.mL⁻¹. A integridade do DNA amplificado foi verificada em gel de agarose 1 % após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 X (22 mM Tris-borato, 0,5 mM EDTA pH 8,0). O reconhecimento do tamanho dos fragmentos e a quantificação da concentração de DNA amplificado foram realizados pela comparação com o marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). O registro do gel foi realizado por meio do fotodocumentador Gel Logic 212 Imaging System (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, EUA). A verificação do tamanho dos produtos da PCR se deu pela sua comparação com o padrão de DNA 100 bp (Promega, Madison, WI, EUA). O material foi armazenado a -20 °C até o momento da próxima análise.

5.2.2 Clonagem e transformação de produtos de PCR

Após a amplificação via PCR das sequências de DNA, foi realizada a clonagem e transformação com 10 μ L dos produtos da amplificação em 50 μ L de células de *Escherichia coli* DH5 α utilizando o kit de clonagem pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega) por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A presença dos insertos nas células transformadas foi checada através de PCR das colônias com os iniciadores CYA359F (5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3'), CYA781Ra (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3') e CYA781Rb (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTT-3'), específicos para sequências de genes de RNAr de cianobactérias (NÜBEL; GARCIA-PICHEL; MUYZER, 1997). As colônias positivas foram conduzidas ao sequenciamento pelo método de Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

5.2.3 Sequenciamento do gene de RNAr 16S

Os plasmídios das colônias positivas foram extraídos pelo método de hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979) modificado de acordo com o protocolo descrito a seguir: 3 mL da cultura foram concentrados por centrifugação a 1848 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 100 µL da solução I (Tris-HCl pH 8,0 25 mM, EDTA 20 mM e glicose 9 mg.mL⁻¹) foram adicionados. Após a ressuspensão das células, foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1%). Os tubos foram invertidos e incubados em gelo por 10 minutos. Em seguida, 150 µL da solução III (acetato de potássio 3 M e ácido acético glacial 11,5 %) foram adicionados. Os tubos foram novamente invertidos e incubados em gelo por 10 minutos. Após a incubação, ocorreu a centrifugação a 14488 x g à temperatura de 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e, após a adição de 1,5 µL de RNase 10mg.mL⁻¹ e a incubação a 37 °C por 20 minutos, 1 mL de etanol 100 % gelado foi adicionado ao tubo, o qual foi posteriormente submetido a centrifugação a 14488 x g à temperatura de 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e 750 µL de etanol 70 % gelado foram adicionados ao tubo, o qual foi novamente submetido a centrifugação a 14488 x g à temperatura de 4 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi secado em bloco aquecedor a 40 °C. O pélete foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura esterilizada, a integridade do plasmídio extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % de acordo com o protocolo descrito anteriormente. O DNA extraído foi quantificado pela comparação com o marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen).

Após a extração dos plasmídios, os produtos da PCR clonados foram reamplificados por PCR com o conjunto DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). Para a reação de amplificação foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial contendo o inserto e 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'). Também foram utilizados os iniciadores 341-357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 357-341R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'), 685-704F (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3'), 704-685R (5'-TCTACGSATTTCAACCSCTAC-3'), 1099-1114F (5'-GCAACGAGCGMRACCC-3') e 1114-1099R (5'-GGGTYKCGCTCGTTGC-3'), visando completar internamente a sequência do gene de RNAr 16S (modificado de LANE, 1991).

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme instruções do kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing. Posteriormente, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA, as reações precipitadas foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, em corrida de aproximadamente 2,5 h. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis Software versão 3.7 (Applied Biosystems).

5.2.4 Processamento das amostras e análise filogenética

As sequências geradas foram analisadas quanto à qualidade do sequenciamento de suas bases usando o pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON, ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux. As regiões que continham bases de índice de qualidade menor que 20 foram novamente submetidas ao sequenciamento. Essas sequências foram comparadas com as depositadas em bancos públicos como o Ribosomal Database Project II (RDP) (MAIDAK et al., 1999) e o GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando, para tal propósito, a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Na análise filogenética, as sequências obtidas, junto com as retiradas dos bancos de dados públicos, foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994). O ajuste das extremidades foi realizado para que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas por meio do programa BioEdit (HALL, 2001). No cálculo da significância estatística da similaridade entre as sequências foi usada a análise de reamostragem (SWOFFORD et al., 2002) para 1000 replicações. O método de distância (agrupamento de vizinhos, ou “*Neighbour Joining*”) foi usado na construção da árvore filogenética (SAITOU; NEI, 1987). A visualização gráfica das árvores construídas foi obtida por meio do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

5.3 Caracterização ultraestrutural

5.3.1 Culturas de cianobactérias

A caracterização ultraestrutural foi realizada para dez linhagens que nas análises moleculares apresentaram baixa similaridade genética ribossomal com cianobactérias de gêneros já conhecidos e representavam grupos que divergiam de cianobactérias já descritas na árvore filogenética (CENA315, CENA319, CENA320, CENA321, CENA327, CENA333, CENA338, CENA341, CENA345 e CENA348). Essas linhagens foram inoculadas em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura SWBG-11 líquido e incubadas sem agitação em câmara de crescimento a 25 ± 1 °C sob iluminação fluorescente de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com um fotoper\u00edodo de 14 h. Ap\u00f3s a verifica\u00e7\u00e3o de seu crescimento, suspens\u00f5es das c\u00e9lulas foram coletadas por centrifuga\u00e7\u00e3o a $7392 \times g$ por 5 minutos e processadas para as an\u00e1lises de microscopia eletr\u00f4nica.

5.3.2 Fixa\u00e7\u00e3o, colora\u00e7\u00e3o e emblocagem das amostras

As c\u00e9lulas das linhagens foram inicialmente fixadas com 1 mL de solu\u00e7\u00e3o de Karnovsky (1965), modificada, durante 64 h a 4 °C. Depois de duas lavagens de 10 min com tamp\u00e3o cacodilato de s\u00f3dio 0,1 M, as c\u00e9lulas foram p\u00f3s-fixadas com tetr\u00f3xido de \u00f3smio 1 % por 1 h \u00e0 temperatura ambiente. Em seguida, as c\u00e9lulas foram lavadas com cloreto de s\u00f3dio 0,9 % e submetidas \u00e0 pr\u00e9-colora\u00e7\u00e3o com acetato de uranila 2,5 % por 18 h a 4 °C. Ap\u00f3s o descarte do acetato de uranila, as amostras foram desidratadas por uma s\u00e9rie de solu\u00e7\u00f5es com concentra\u00e7\u00f5es crescentes de acetona, descrita a seguir: 25 %, 50 % e 75 % por uma vez durante 5 min cada; duas vezes a 90 % por 10 min; e tr\u00eas vezes a 100 % por 20 min.

A desidrata\u00e7\u00e3o foi seguida de pr\u00e9-infiltra\u00e7\u00e3o com solu\u00e7\u00f5es contendo resina de Spurr e acetona \u00e0s propor\u00e7\u00f5es de 1:3, 1:1 e 2:1, respectivamente, com dura\u00e7\u00e3o de 3 h cada, seguindo-se a infiltra\u00e7\u00e3o com resina pura. Ap\u00f3s 24 h, as amostras foram embebidas em resina e deixadas para polimerizar a 70 °C por 48 h.

5.3.3 Microscopia \u00f3ptica

Ap\u00f3s a trimagem dos blocos de resina para a microscopia eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o relatada no item anterior, sec\u00e7\u00f5es semifinas contendo entre 0,5 e 1 μm de espessura foram

coletadas com o auxílio de uma alça de platina e transferidos para lâminas de vidro. Após secagem a aproximadamente 50 °C, a lâmina foi corada com azul de toluidina 2 % e aquecida por 2 min. Os cortes foram visualizados e fotografados em microscópio óptico invertido sob aumento de 1000 x.

5.3.4 Ultramicrotomia e microscopia eletrônica de transmissão

Após a trimagem dos blocos de resina, secções ultrafinas com espessura entre 600 e 1000 µm foram preparadas em ultramicrotomo Porter Blum MT-2 (Sorvall Instruments, St. Louis, MO, EUA) e coletadas em grades de cobre de 200 mesh cobertas com colódio 5 %. As secções foram coradas com acetato de uranila por 20 min, lavadas com água, tratadas com citrato de chumbo por 15 min e, então, lavadas novamente. O material foi visualizado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Carl Zeiss) no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

5.4 Detecção de regiões de genes de interesse biotecnológico e ecotoxicológico

5.4.1 Amplificação dos genes de NRPS e PKS

A extração de DNA genômico das linhagens de cianobactérias isoladas das folhas foi feita conforme descrito anteriormente. A amplificação por PCR de sequências de genes codificadores de NRPS e PKS foi realizada utilizando os seguintes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores degenerados: MTF (5'-GCNNGGYGGYGCNTAYGTNCC-3') e MTR (5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3') (NEILAN et al., 1999); e KSF (5'-MGIGARGCIGWISMIATGGAYCCICARCAIMG-3') e KSR (5'-GGRTCICCIARISWIGTICCICTICCRTG-3') (BEYER et al., 1999), respectivamente. Esses iniciadores têm como alvo sequências conservadas de sintetases de peptídeos não ribossômicos e sintases de policetídeos.

A amplificação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra) e seguiu as condições de amplificação descritas por Rabello (2003): desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 5 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min e 72 °C por 4 min; e extensão final a 72 °C por 15 min. Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose

1 % e os fragmentos foram comparados com o marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen).

5.4.2 Amplificação de regiões dos genes de cianopeptolina e aeruginosina

A reação de amplificação da região *aerA-aerB* dos genes de cianopeptolina sintetase foi realizada com a utilização os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores *mcnC_F* (5'-TAAGGATAATTTCTTTGAATTGGGAG-3') e *mcnE_R* (5'-GGGAATAATCTCTAAATCAACAGC-3'). Para a região *aerA-aerB* de aeruginosina sintetase, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *aerA_F* (5'-GATAGCACCCAGAACGGAAGC-3') e *aerB_R* (5'-CGTTAAACGGATGGTTAGAGC-3') (CADEL-SIX et al., 2008). A amplificação de ambas as regiões gênicas foi realizada de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 40 ciclos de 95 °C por 45 s, 50 °C por 45 s e 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

5.4.3 Amplificação de genes de cianotoxinas

A presença de genes envolvidos na síntese de saxitoxina (*sxtI*), anatoxina-a/homoanatoxina-a (*anaC*) e microcistina (*mcyE*) foi checada em todas as cianobactérias isoladas. Na detecção do gene *sxtI*, foram utilizados os iniciadores *OCT_F* (5'-TGCCGTTTTGTGCTTAGATG-3') e *OCT_R* (5'-TATCGTGAGTCCTTCCGTCC-3') e as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 61 °C por 1min e 30 s e 72 °C por 1 min; 72 ° por 7 min (CRESPIM; FIORE, não publicado). O gene *anaC* foi procurado utilizando-se os iniciadores *ALM_F* (5'-CTGGGGGCACAATTATTTACTCTCACCTG-3') e *ALM_R* (5'-ACGCAAAGCTCACCCACCTCACCTCTAACT-3') e as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 4 min; 30 ciclos de 94 °C por 20 s, 45 por 20 s e 72 °C por 1 min; e 72 ° por 7 min (MÉJEAN et al., 2009). Os iniciadores *mcyE_F2* (5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3') e *mcyE_R4* (5'-AATTCTAAAGCCCAAAGACG-3') foram utilizados na busca do gene *mcyE* usando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 ° por 10 min (RANTALA et al., 2004).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento de cianobactérias

A metodologia empregada no isolamento de cianobactérias possibilitou a obtenção de trinta e quatro linhagens. Houve maior eficácia de isolamento utilizando meios líquidos, com os quais puderam ser obtidos trinta isolados. Apenas quatro linhagens foram isoladas a partir de meios sólidos. Em relação à composição dos meios, dez linhagens foram isoladas em meio BG-11, nove em SWBG-11, seis em BG-11₀ e nove em SWBG-11₀. Dentre os isolados cuja procedência foi possível ser identificada, onze foram provenientes da face adaxial e oito da face abaxial. Os isolados receberam códigos da coleção de culturas de cianobactérias do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP com numeração entre CENA315 e CENA348 (Tabela 1).

Tabela 1 – Linhagens isoladas da superfície das folhas de *A. schaueriana*.

Código	Família	Meio de isolamento	Face
CENA315	Xenococcaceae	SWBG-11 líquido	adaxial
CENA316	Phormidiaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA317	Phormidiaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA318	Phormidiaceae	SWBG-11 líquido	adaxial
CENA319	Pseudanabaenaceae	SWBG-11 líquido	adaxial
CENA320	Pseudanabaenaceae	BG-11 líquido	adaxial
CENA321	Pseudanabaenaceae	BG-11 líquido	abaxial
CENA322	Pseudanabaenaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA323	Pseudanabaenaceae	SWBG-11 ₀ líquido	abaxial
CENA324	Rivulariaceae	BG-11 líquido	não identificada
CENA325	Rivulariaceae	BG-11 ₀ sólido	abaxial
CENA326	Rivulariaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA327	Xenococcaceae	SWBG-11 ₀ líquido	abaxial
CENA328	Rivulariaceae	BG-11 líquido	abaxial
CENA329	Microchaetaceae	BG-11 líquido	não identificada
CENA330	Rivulariaceae	SWBG-11 líquido	adaxial
CENA331	Xenococcaceae	BG-11 líquido	abaxial

(continua)

Tabela 1 (conclusão)

Código	Família	Meio de isolamento	Face
CENA332	Pseudanabaenaceae	SWBG-11 sólido	adaxial
CENA333	Xenococcaceae	SWBG-11 sólido	adaxial
CENA334	Microchaetaceae	BG-11 líquido	não identificada
CENA335	Phormidiaceae	SWBG-11 líquido	não identificada
CENA336	Microchaetaceae	BG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA337	Xenococcaceae	SWBG-11 ₀ líquido	abaxial
CENA338	Microchaetaceae	BG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA339	Phormidiaceae	SWBG-11 líquido	não identificada
CENA340	Pseudanabaenaceae	BG-11 ₀ líquido	adaxial
CENA341	Rivulariaceae	BG-11 ₀ sólido	abaxial
CENA342	Pseudanabaenaceae	BG-11 líquido	não identificada
CENA343	Microchaetaceae	BG-11 líquido	não identificada
CENA344	Phormidiaceae	SWBG-11 líquido	adaxial
CENA345	Xenococcaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA346	Xenococcaceae	SWBG-11 ₀ líquido	não identificada
CENA347	Scytonemataceae	BG-11 ₀ líquido	adaxial
CENA348	Xenococcaceae	BG-11 líquido	adaxial

Devido à forte pressão de seleção no ambiente foliar, era esperado que houvesse maior número de espécies adaptadas a condições de alta salinidade e, conseqüentemente, maior sucesso de isolamento com meios de cultura acrescidos de sal. Todavia, foram obtidos dezoito isolados a partir de meio salino e dezesseis em meio sem acréscimo de sal, uma diferença pouco significativa.

De acordo com a literatura, de uma maneira geral, maior abundância de bactérias na filosfera pode ser encontrada em contato com a superfície abaxial das folhas devido a uma maior densidade de estômatos ou tricomas e à presença de uma camada cuticular mais fina nesta face foliar (WHIPPS et al., 2008). A despeito das glândulas de sal nas folhas de *A. schaueriana* serem encontradas na face abaxial, o isolamento mostrou que a distribuição das cianobactérias na folha desta árvore não necessariamente se relaciona à concentração de sal: nesta face, foram obtidos cinco isolados com meio sem adição de sal e três com meio salino, em contraposição a quatro isolamentos com meio sem adição de sal e sete com meio salino na face adaxial. Todavia, este dado não pode ser considerado determinante devido ao grande

número de isolamentos de procedência indeterminada.

Com base em critérios morfológicos, as linhagens isoladas foram identificadas como pertencentes a quatro ordens cianobacterianas diferentes: doze Nostocales, sete Pseudanabaenales, oito Chroococcales e sete Oscillatoriales (Figura 4). Dentro destas ordens, as linhagens foram distribuídas entre seis famílias diferentes. Algumas características morfológicas observadas estão resumidas na Tabela 2.

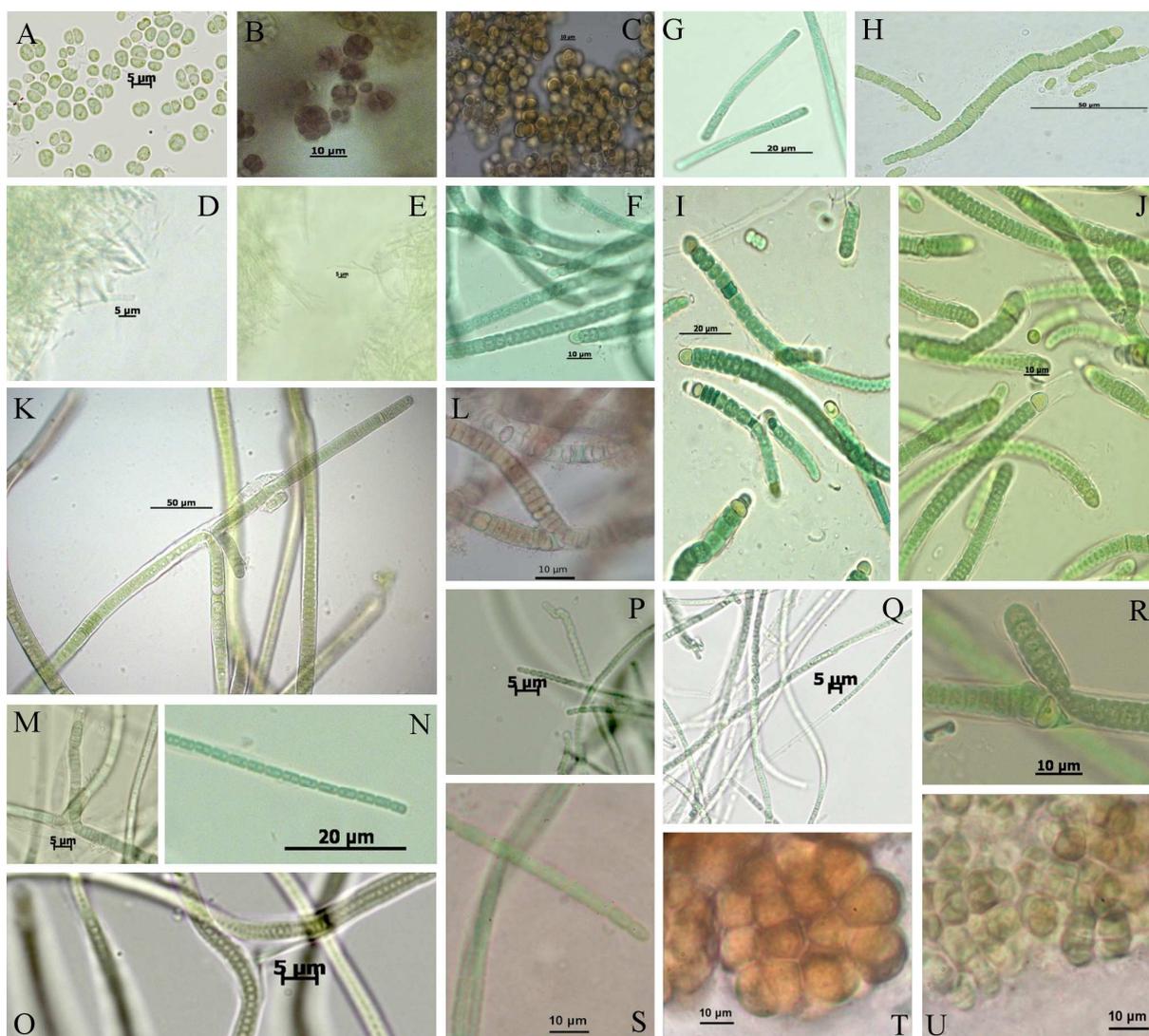


Figura 4 – Diversidade morfológica de cianobactérias isoladas da superfície das folhas de *A. schaueriana*. A: CENA327; B: CENA331; C: CENA315; D e E: *Leptolyngbya* sp. CENA322; F: CENA338; G: *Microcoleus* sp. CENA344; H: CENA325; I: CENA341; J e R: CENA343; K e L: *Brasilonema* sp. CENA347; M: CENA321; N: CENA319; O: *Pseudophormidium* sp. CENA335; P: *Leptolyngbya* sp. CENA323; Q: *Leptolyngbya* sp. CENA340; S: CENA320; T: CENA345; U: CENA348.

Tabela 2 – Principais características morfológicas das linhagens isoladas.

Linhagem	Arranjo celular	Planos de divisão	Ramificação	Fissão múltipla	Presença de heterócitos	Formato das células
CENA315	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA316	filamentosa	1	falsa dupla	ausente	não	subquadrático
CENA317	filamentosa	1	falsa dupla	ausente	não	subquadrático
CENA318	filamentosa	1	falsa dupla	ausente	não	subquadrático
CENA319	filamentosa	1	ausente	ausente	não	sobrequadrático
CENA320	filamentosa	1	ausente	ausente	não	sobrequadrático
CENA321	filamentosa	1	falsa dupla	ausente	não	sobrequadrático
CENA322	filamentosa	1	ausente	ausente	não	sobrequadrático
CENA323	filamentosa	1	ausente	ausente	não	sobrequadrático
CENA324	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA325	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA326	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA327	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA328	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA329	filamentosa	1	falsa simples/dupla	ausente	não	quadrático
CENA330	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA331	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA332	filamentosa	1	ausente	ausente	não	sobrequadrático
CENA333	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA334	filamentosa	1	falsa simples	ausente	não	quadrático
CENA335	filamentosa	1	ausente	ausente	não	subquadrático
CENA336	filamentosa	1	falsa simples/dupla	ausente	sim	quadrático
CENA337	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA338	filamentosa	1	falsa simples/dupla	ausente	sim	quadrático
CENA339	filamentosa	1	falsa simples	ausente	não	sobrequadrático
CENA340	filamentosa	1	falsa simples	ausente	não	sobrequadrático
CENA341	filamentosa	1	falsa simples	ausente	sim	quadrático
CENA342	filamentosa	1	falsa dupla	ausente	não	sobrequadrático
CENA343	filamentosa	1	falsa simples/dupla	ausente	sim	quadrático
CENA344	filamentosa	1	ausente	ausente	não	quadrático
CENA345	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico

(continua)

Tabela 2 (conclusão)

Linhagem	Arranjo celular	Planos de divisão	Ramificação	Fissão múltipla	Presença de heterócitos	Formato das células
CENA346	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico
CENA347	filamentosa	1	falsa simples/dupla	ausente	sim	quadrático
CENA348	unicelular	+ de 3	ausente	presente	não	esférico

No isolamento de cianobactérias de ambientes extremos, é recomendado o uso de pelo menos dois meios diferentes: um com características que simulem as condições encontradas naturalmente no ambiente estudado, e outro de características mais moderadas (WATERBURY, 2006). Neste trabalho, a principal condição ambiental testada foi a salinidade, e se verificou uma variação considerável entre os isolamentos com e sem a adição de sódio, magnésio e potássio em relação aos gêneros obtidos em cada meio de cultivo. Isto é um indício de que cada táxon apresenta uma resposta metabólica distinta à salinidade, ou seja, possivelmente se encontra nos isolados desde a halotolerância até a halofilia, ocorrendo, portanto, diferença de afinidade das cianobactérias isoladas a estes fatores.

Quinze linhagens foram isoladas a partir de meio de cultura sem fonte de nitrogênio, das quais seis possuíam células especializadas para a fixação de nitrogênio atmosférico, e seis linhagens heterocitadas a partir de meio com nitrogênio, possivelmente um indicativo de que este grupo de micro-organismos pode apresentar importância na disponibilização de nitrogênio assimilável na superfície das folhas de *A. schaueriana*. Este alto número de cianobactérias potencialmente diazotróficas não é surpreendente, visto a importância deste grupo no ciclo biogeoquímico deste elemento em ambientes oligotróficos. Em ambientes marinhos, há elevada contribuição de cianobactérias à fixação biológica de nitrogênio, como gênero *Trichodesmium*, por exemplo, responsável por pelo menos 50 % de todo o nitrogênio fixado nos oceanos (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). De fato, as cianobactérias não apenas contribuem para a disponibilização de nitrogênio assimilável na filosfera, mas, em alguns ecossistemas, suprem a maior parte do nitrogênio fixado neste nicho. Freiberg (1998) demonstrou que em algumas árvores de uma floresta tropical na Costa Rica as taxas de fixação de nitrogênio na filosfera podem estar correlacionadas com a área foliar coberta por representantes de duas espécies do gênero *Scytonema* (ordem Nostocales) e que esta capacidade está diretamente relacionada com a disponibilidade de água, introduzida na filosfera por meio de precipitação atmosférica.

A disponibilização de nitrogênio fixado por cianobactérias para o meio é conhecida desde 1963, quando Stewart apontou a correlação entre crescimento e liberação extracelular de aminoácidos em culturas de *Calothrix* sp. e *Nostoc* sp. crescidas em meio sem fonte de nitrogênio. Em 1984, Bentley e Carpenter demonstraram que ocorre transferência direta de parte do nitrogênio fixado por micro-organismos da filosfera para a planta hospedeira. No caso do ambiente estudado, como a dificuldade de obtenção deste elemento essencial ocorre não apenas na filosfera desta árvore, mas também em todo o manguezal, portanto seria possível que o nitrogênio fixado fosse utilizado não apenas pela população microbiana da filosfera, mas também pela planta.

As cianobactérias associadas às árvores do gênero *Avicennia* e a sua contribuição para a fixação de nitrogênio foram estudadas por diversos trabalhos, os quais são unânimes no reconhecimento da importância deste grupo taxonômico. Toledo, Bashan e Soeldner (1995a) avaliaram a presença de cianobactérias em pneumatóforos de *A. germinans* em um manguezal no norte do México, encontrando ao longo dos mesmos uma produção massiva de biofilme com cianobactérias semelhantes aos membros dos gêneros *Lyngbya* e *Oscillatoria* na parte mais próxima ao sedimento, a *Microcoleus* spp. na zona central e cocoides semelhantes a *Aphanothece* spp. em conjunto com cianobactérias filamentosas não reconhecidas na parte superior das raízes aéreas. *Anabaena* sp. também foi isolada e sua presença foi constatada no sedimento circundante. A fixação de nitrogênio no local foi apontada como sendo baixa no inverno e tendo seu pico no meio do verão. Mann e Steinke (1993) verificaram que a capacidade de fixação de nitrogênio por cianobactérias isoladas a partir de pneumatóforos de uma árvore do gênero *Avicennia* em uma reserva na África do Sul correspondia a 24,3 % dos requerimentos de nitrogênio deste manguezal, atingindo seu pico durante o meio do verão. Lugomella, Bergman e Waterbury (2001) encontraram alta diversidade de cianobactérias unicelulares e filamentosas heterocitadas e não heterocitadas em mangues de Zanzibar, na Tanzânia. Este trabalho destacou linhagens dos gêneros *Aphanocapsa*, *Lyngbya*, *Nodularia* e *Scytonema*, com potencial diazotrófico, bem como a alta frequência em pneumatóforos do também diazotrófico gênero *Rivularia*. Posteriormente, Lugomella e Bergman (2002) testaram a taxa de redução de acetileno em pneumatóforos *in situ* e verificaram atividade de nitrogenase bastante elevada nas raízes aéreas em que havia crescimento conspícuo de *Rivularia* sp. No presente trabalho, apesar deste gênero não ter sido encontrado, foram isolados outros membros da família Rivulariaceae, fato que leva a crer que esta atividade possa não ocorrer apenas nos pneumatóforos, mas também nas folhas.

Estudos de comunidades cianobacterianas de manguezais brasileiros foram realizados por meio de observação direta de amostras ambientais e de identificações morfológicas. Em 1992, Neves e Tribuzi estudaram as cianobactérias do manguezal de Cabo Frio, no Rio de Janeiro, encontrando crescimento conspícuo de cianobactérias na superfície de sedimentos e em pneumatóforos de *A. schaueriana*. Além dos gêneros *Brachytrichya*, *Calothrix*, *Chroococcus*, *Oscillatoria*, *Xenococcus*, as autoras visualizaram maior abundância de espécies dos gêneros *Cyanocystis*, *Lyngbya*, *Microcoleus* e *Phormidium*. No ano anterior, Branco (1991) havia realizado um levantamento das cianobactérias bentônicas em um manguezal da Ilha do Cardoso, em Cananeia, litoral do estado de São Paulo. Os resultados deste levantamento foram publicados em dois trabalhos, um tratando das cianobactérias então classificadas na ordem Chroococcales (BRANCO et al., 1996), e o outro, daquelas então na ordem Oscillatoriales (BRANCO et al., 1997). Esses autores relataram a observação dos gêneros *Aphanothece*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Cyanocystis*, *Gloeothece*, *Heteroleibleinia*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Merismopedia*, *Microcoleus*, *Myxohyella*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Porphyrosiphon*, *Spirulina*, *Leibleinia*, *Schizothrix*, *Stichosiphon*, *Xenococcus* e *Yonedaella*. Para o Maranhão, Nogueira e Ferreira-Correia (2001) reportaram os gêneros *Aphanothece*, *Gloeocapsopsis*, *Leibleinia*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Pleurocapsa*, *Phormidium*, *Porphyrosiphon*, *Scytonema* e *Xenococcus* nos troncos e nas raízes de *Rhizophora mangle*. Branco et al. (2003) observaram em um manguezal de Pernambuco os gêneros *Aphanothece*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Myxohyella*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Porphyrosiphon*, *Spirulina*, *Xenococcus* e *Yonedella*, todos já encontrados anteriormente na Ilha do Cardoso.

Trabalhos mais recentes estudaram o perfil das comunidades de cianobactérias em manguezais do litoral do estado de São Paulo por técnicas de cultivo ou por técnicas independentes de cultivo. Silva (2010) obteve 42 sequências de genes de RNAr a partir de cianobactérias isoladas de solo, água e perifíton coletados nos manguezais da Ilha do Cardoso e de Bertoga. Os isolados foram identificados morfológicamente como pertencentes aos gêneros *Aphanothece*, *Chlorogloea*, *Cyanothece*, *Leptolyngbya*, *Microchaete*, *Nostoc*, *Phormidium* e *Synechococcus*. Dentre as sequências de nucleotídeos obtidas, cinco (*Chlorogloea* sp. CENA150, *Chlorogloea* sp. CENA152, *Cyanothece* sp. CENA169, *Leptolyngbya* sp. CENA155 e *Phormidium* sp. CENA135) apresentaram percentual de similaridade menor que 95 % quando comparadas com sequências pertencentes a gêneros já descritos depositadas em bancos de dados públicos. A maior parte dos isolados apresentou semelhança com sequências do gênero *Synechococcus*, principalmente aqueles obtidos de

amostras coletadas próximas ao mar. Das amostras coletadas no manguezal de Bertioga, foi possível a obtenção de apenas quatro isolados (*Chlorogloea* sp. CENA150, *Microchaete* sp. CENA176, *Nostoc* sp. CENA175 e *Synechococcus* sp. CENA185), fato que a autora atribuiu às consequências do derramamento de petróleo ocorrido em 1983. Apesar do grande número de sequências desse trabalho relacionadas a táxons para os quais há relatos de capacidade de fixação biológica do nitrogênio, Genuário (2010) obteve resultado positivo para apenas seis dentre elas ao analisar 27 destas linhagens quanto à capacidade de reduzir acetileno. Todavia, o autor relata problemas metodológicos com a condução de sua análise, não sendo possível, portanto, afirmar se estas linhagens de fato são capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Foi realizada também a comparação entre os manguezais de Bertioga e da Ilha do Cardoso através de técnicas de ecologia microbiana independentes de cultivo (RIGONATO, 2010). A análise das sequências obtidas por meio de bibliotecas gênicas demonstrou que as comunidades cianobacterianas presentes em solos e folhas de pontos próximos ao mar na Ilha do Cardoso se distinguem claramente: enquanto nos solos foi observada a predominância dos gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus*, ambos de alta abundância em ambientes marinhos, a filosfera apresentava maior número de sequências relacionadas ao gênero *Symphyonemopsis*, de rara ocorrência em outros locais. Considerando que tanto *Synechococcus* quanto *Symphyonemopsis* podem atuar na fixação biológica do nitrogênio, sua abundância seria mais um indicativo de que estas cianobactérias possuam importância na biogeoquímica deste elemento em seus respectivos habitats. Os fragmentos dos genes de RNAr 16s sequenciados foram relacionados aos gêneros *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Arthronema*, *Cyanobium*, *Gloeotheca*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Tolypothrix*, *Tychonema* e *Xenococcus*, obtidas de solos, e *Acaryochloris*, *Anabaena*, *Brasilonema*, *Cyanobacterium*, *Fischerella*, *Hidrocoleum*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Prochlorococcus*, *Raphidiopsis*, *Rivularia*, *Scytonema*, *Symphyonemopsis*, *Synechococcus* e *Xenococcus*, obtidas de folhas. Como é frequente em estudos de ecologia microbiana que utilizam técnicas independentes de cultivo, maior abundância foi encontrada para sequências de cianobactérias não cultivadas.

Comparando as descrições dos trabalhos citados com os táxons obtidos no presente trabalho, a despeito da grande variedade de gêneros observada anteriormente, foi obtida coincidência apenas dos gêneros *Brasilonema*, *Leptolyngbya* e de *Microcoleus*, como será visto a seguir.

6.2 Caracterização molecular dos isolados

O gene de RNAr 16S foi sequenciado para as trinta e quatro linhagens (Anexo). Destas, dezessete (CENA316, CENA317, CENA318, CENA321, CENA322, CENA323, CENA329, CENA332, CENA334, CENA335, CENA336, CENA338, CENA339, CENA340, CENA343, CENA344 e CENA347) apresentaram alta similaridade com sequências de gênero já conhecido depositadas no GenBank (NCBI). As dezessete restantes (CENA315, CENA319, CENA320, CENA324, CENA325, CENA326, CENA327, CENA328, CENA330, CENA331, CENA333, CENA337, CENA341, CENA342, CENA345, CENA346 e CENA348) exibiram percentual de similaridade menor que 95 % com cianobactérias já descritas. CENA319, CENA320, CENA323, CENA329, CENA334, CENA336, CENA338 e CENA343 se mostraram mais próximas de organismos não cultivados (Tabela 3).

Tabela 3 – Similaridade entre as sequências de DNAr 16S obtidas e sequências disponíveis no GenBank (NCBI) pela ferramenta de busca de alinhamento básico local (BLAST).

Linhagem	Tamanho do fragmento (pb)	Organismo mais próximo (Número de acesso)	Identidade (%)	Cobertura (%)
CENA315	1392	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7307 (AB074510)	89	94
CENA316	1412	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA317	1412	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA318	1410	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA319	1410	Clone não cultivado (FJ517069)	98	100
CENA320	1415	Clone não cultivado (GU117953)	95	99
CENA321	1416	Oscillatoriales JSC-1 (FJ788926)	96	99
CENA322	1413	<i>Leptolyngbya</i> sp. OBB24S04 (AJ639893)	98	100
CENA323	1451	Clone não cultivado (GQ441263)	97	98
CENA324	1414	<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1 (EF150855)	93	100

(continua)

Tabela 3 (continuação)

Linhagem	Tamanho do fragmento (pb)	Organismo mais próximo (Número de acesso)	Identidade (%)	Cobertura (%)
CENA325	1415	<i>Tolypothrix</i> sp. IAM M-259 (AB093486)	93	100
CENA326	1414	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507 (AM230678)	93	100
CENA327	1413	Chroococcales LEGE 060123 (FJ589716)	99	97
CENA328	1401	<i>Tolypothrix</i> sp. IAM M-259 (AB093486)	94	95
CENA329	1416	Clone não cultivado (GQ397073)	98	100
CENA330	1414	<i>Calothrix</i> sp. PCC7507 (AM230678)	93	100
CENA331	1416	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	94	100
CENA332	1412	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA333	1418	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	94	100
CENA334	1416	Clone não cultivado (GQ397073)	98	100
CENA335	1415	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA336	1413	Clone não cultivado (GQ397073)	97	100
CENA337	1418	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	94	100
CENA338	1413	Clone não cultivado (GQ397073)	97	100
CENA339	1412	<i>Leptolyngbya</i> sp. ANT.LH52.1 (AY493584)	98	100
CENA340	1410	<i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.LH70.1 (AY493574)	95	100
CENA341	1414	<i>Calothrix</i> sp. PCC7507 (AM230678)	93	100
CENA342	1414	Oscillatoriales JSC-1 (FJ788926)	94	99

(continua)

Tabela 3 (conclusão)

Linhagem	Tamanho do fragmento	Organismo mais próximo (Número de acesso)	Identidade	Cobertura
CENA343	1416	Clone não cultivado (GQ397073)	98	100
CENA344	1413	<i>Microcoleus</i> sp. DAI (EF654029)	97	100
CENA345	1418	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	94	100
CENA346	1418	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	94	100
CENA347	1415	<i>Brasilonema octagenarum</i> (EF150855)	99	100
CENA348	1415	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	92	95

A análise filogenética, com o apoio de descrições morfológicas, de informações ecológicas e das taxas de similaridade ribossomal entre as sequências, permitiu determinar que as trinta e quatro cianobactérias isoladas neste trabalho agrupam-se de forma a constituírem o que poderia ser interpretado como quinze diferentes gêneros (Figura 5).

Embora a comparação das sequências de CENA316, CENA317, CENA318, CENA332, CENA335 e CENA339 com as depositadas nos bancos de dados tenham apontado maior similaridade com uma sequência pertencente ao gênero *Leptolyngbya*, as características morfológicas observadas em microscopia óptica correspondem às descritas para o gênero *Pseudophormidium*, tais como filamentos emaranhados, variavelmente curvados, formados por células subquadráticas e fortemente constrictas, com ramificações falsas duplas. As seis sequências também apresentaram 97 % de similaridade com *Pseudophormidium* sp. ANT.PENDANT.3 (número de acesso AY493587). A análise filogenética confirmou esta proximidade pela formação de um clado de alto valor de reamostragem. Estes dados conduziram a identificação destas linhagens para *Pseudophormidium* sp. Como *Leptolyngbya* sp. ANT.LH52.1 apresenta alta similaridade com as linhagens isoladas neste trabalho e se localiza dentro de um clado formado por membros da família Phormidiaceae, distante de membros do gênero *Leptolyngbya*, acredita-se que sua identificação deve ser revista.

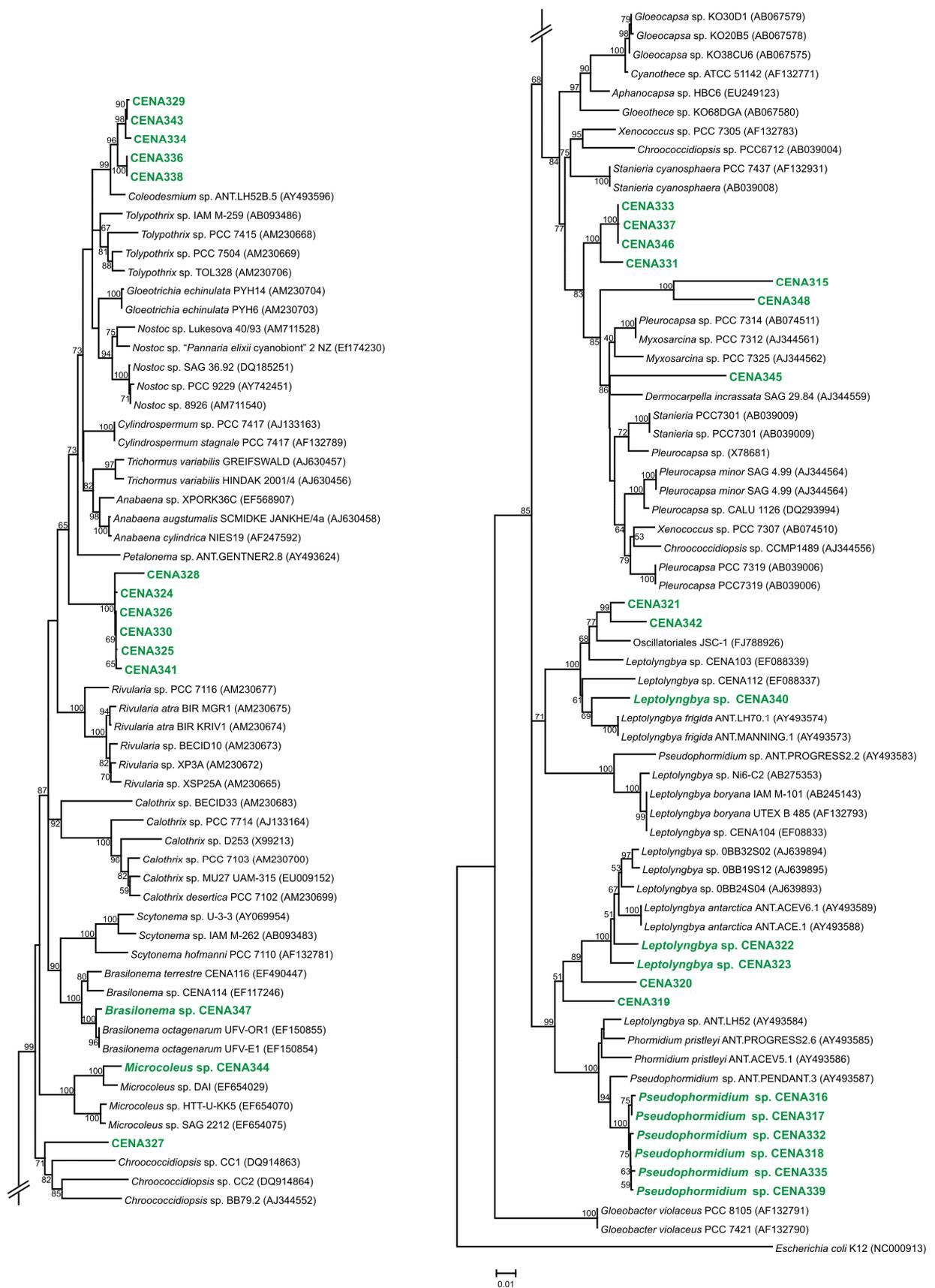


Figura 5 – Árvore filogenética obtida pelo método de agrupamento de vizinhos. Os valores de reamostragem maiores que 50 se encontram nos nós da árvore. Em verde se encontram as linhagens isoladas neste estudo.

A comparação da sequência do gene de RNAr 16S de CENA323 com os bancos de dados do NCBI resultou em maior similaridade com o clone de um organismo não cultivado. Apesar disso, esta linhagem apresentou características morfológicas descritas para o gênero *Leptolyngbya*, entre elas tricomas cilíndricos com bainhas firmes e hialinas, células menores que 3,5 µm de largura e reprodução por hormogônios com formação de necrídios, e sua sequência possui 97% de similaridade com *Leptolyngbya* sp. 0BB24S04 (número de acesso no NCBI AJ639893). Desta forma, essas informações levaram à identificação de CENA323 como representante do gênero *Leptolyngbya*. CENA322 apresentou tanto características morfológicas quanto similaridade gênica para o RNAr 16S com o gênero *Leptolyngbya*. As linhagens CENA 322 e CENA 323 se agruparam com membros deste gênero na árvore filogenética, fato que confirma a identificação. Contudo, os organismos deste clado não se agruparam com a espécie-tipo do gênero, *L. boryana*. O mesmo caso ocorre com CENA340, próxima a *L. frigida*, de maneira que estas linhagens deverão ser reclassificadas posteriormente juntamente com os demais isolados. Próximos a este clado estão CENA319 e CENA320, que diferem o suficiente molecularmente para serem classificados como dois gêneros novos.

A linhagem CENA321 se mostrou mais próxima filogeneticamente de *Leptolyngbya* sp. CENA103 e *Leptolyngbya* sp. CENA112, depositadas por Furtado et al. (2009), e *L. frigida* ANT.LH70, depositada por Taton et al. (2006). Apesar de estas três linhagens terem sido identificadas como pertencentes ao gênero *Leptolyngbya* nos trabalhos originais, foi demonstrado neste trabalho que elas se agrupam em um clado afastado dos outros representantes deste táxon. Além disso, a comparação das sequências das quatro linhagens (CENA321, CENA103, CENA112 e ANT.LH70) com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI resulta em uma similaridade de apenas 94 % com o membro mais próximo do gênero *Leptolyngbya*, uma porcentagem abaixo do critério atualmente adotado para que seja feito o agrupamento taxonômico de dois organismos em um mesmo gênero (KOMÁREK, 2010). A sequência mais próxima de CENA321, a linhagem CENA342, com a qual se agrupa na árvore filogenética, também apresenta menos de 95 % de similaridade do gene de RNAr 16S com as linhagens citadas. Esta separação também se manifesta morfológicamente: não somente CENA321 e CENA342 apresentam ramificação falsa dupla, mas também CENA103 e CENA112 (dados não publicados), uma característica raramente encontrada no gênero ao qual foram identificadas – dentre as 143 espécies do gênero *Leptolyngbya*, a presença de ramificação falsa dupla é relatada para apenas 8 morfoespécies (*L. battersii*, *L. boryana*, *L. calotrichoides*, *L. carnea*, *L. dangeardii*, *L. edaphica*, *L.*

nostocorum e *L. novergica*) (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), das quais apenas *L. boryana* possui sequências de DNAr 16S depositadas. As mais próximas dessas sequências (*L. boryana* IAM M-101 e *L. boryana* UTEX B485) apresentam apenas 90 % de similaridade com CENA321. Embora não tenham relatado a observação de ramificação dupla em *Leptolyngbya* sp. ANT.LH70.1, Taton et al. (2006) afirmam que esta linhagem não apresentou características claras de nenhuma morfoespécie deste gênero.

As sequências de *L. boryana* disponíveis em bancos de dados públicos não se agrupam com nenhuma das linhagens deste trabalho e com grande parte das sequências de espécies classificadas no mesmo gênero. Diversos trabalhos apontam que *Leptolyngbya* é um gênero polifilético que necessita de revisão (ALBERTANO; KOVÁČIK, 1994; JOHANSEN et al., 2008; WILMOTTE, STAM; DEMOULIN, 1997).

As cianobactérias formadoras de baeócitos isoladas neste estudo (CENA315, CENA327, CENA331, CENA333, CENA337, CENA345, CENA346 e CENA348) não formaram um clado único, resultado consistente com estudos anteriores que apontaram que a capacidade de formação de baeócitos é uma característica polifilética (ISHIDA et al., 2001). CENA327 se mostrou próximo de alguns isolados do gênero *Chroococcidiopsis*, também constituído por cianobactérias unicelulares coloniais com mais de três planos de divisão e formadoras de baeócitos. No entanto, pela análise filogenética, esse agrupamento se encontra dentro de um clado formado majoritariamente por cianobactérias da ordem Nostocales. Fewer, Friedl e Büdel (2002) confirmaram a proximidade filogenética entre estes organismos, afirmando que em *Chroococcidiopsis* estão classificados os parentes vivos mais próximos das cianobactérias filamentosas heterocitadas. Contudo, a árvore filogenética obtida no presente trabalho não corrobora com esta afirmação, mostrando que, apesar de realmente haver relação filogenética entre estes micro-organismos, há maior proximidade entre as cianobactérias heterocitadas e algumas cianobactérias atualmente classificadas no gênero *Microcoleus*.

Interações planta-bactéria possuem grande importância durante o crescimento e o desenvolvimento vegetal e podem ser utilizadas para melhorar a produtividade vegetal de um determinado ambiente (WEYENS, 2009), e existem relatos de que cianobactérias possuem potencial para auxiliar a recuperação de manguezais degradados por estimular o crescimento de mangues (BASHAN; HOLGUIN, 2002). Árvores do gênero *Avicennia* inoculadas com *Microcoleus chthonoplastes* apresentaram alta taxa de colonização de raízes com um aumento na taxa de nitrogênio fixado e com acúmulo de nitrogênio em mudas (BASHAN et al., 1998; TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995b). Neste trabalho foi isolada uma cianobactéria identificada como *Microcoleus* sp., que recebeu o código CENA344. Todavia, este gênero é

polifilético, e se divide em pelo menos dois grupos bem definidos: um pertencente à família Phormidiaceae, que agrupa organismos marinhos próximos ao novo gênero *Coleofasciculus*, e outro pertencente à família Oscillatoriaceae, que contém a espécie-tipo do gênero e compreende organismos terrestres, os quais apresentam diferenças morfológicas claras relacionadas ao tipo de divisão celular, ao comprimento celular relativo, à motilidade e à presença ou à ausência de caliptra (SIEGISMUND et al., 2008). CENA344 também deverá ser reclassificada posteriormente juntamente com o restante das cianobactérias marinhas atualmente classificadas no gênero *Microcoleus*.

Os isolados CENA329, CENA334, CENA336, CENA338 e CENA343 apresentaram 97 % de similaridade de DNAr 16S com *Coleodesmium* sp. ANT.LH52B.5. Todavia, o gênero *Coleodesmium* possui como principal característica a presença de vários tricomas dentro de uma mesma bainha, o que não foi observado nos isolados deste trabalho. Os isolados também apresentam ramificação falsa dupla, não descrita para *Coleodesmium* spp. As cianobactérias da ordem Nostocales geralmente apresentam percentual de similaridade de sequências de genes de RNAr 16S muito alto entre si, dificultando a separação de gêneros por esse gene (CASAMATTA; GOMEZ; JOHANSEN, 2006). Ademais, por constituírem um grupo monofilético que divergiu muito cedo dos demais grupos do filo, as cianobactérias heterocitadas podem apresentar uma posição instável nas árvores filogenéticas devido à sua alta distância evolutiva em relação às cianobactérias de outras ordens, a qual, em alguns casos, pode gerar uma atração entre sequências não relacionadas, indicando uma similaridade falsa (KORELUSOVÁ, 2008). Todavia, é possível distinguir claramente entre cianobactérias desta ordem que apresentem grande similaridade morfológica e ribossomal entre si e que sejam proximamente relacionadas filogeneticamente por meio do sequenciamento de genes funcionais (HENSON; WATSON; BARNUM, 2002). Casamatta et al. (2006) também obtiveram similaridade de 97 % entre *Coleodesmium* sp. ANT.LH52B.5 e sua linhagem CAT 1M, a qual, a despeito desta alta similaridade, foi classificada no novo gênero *Rexia* tomando por critérios as diferenças morfológicas entre as linhagens. Portanto, a despeito da alta similaridade molecular, diferenças morfológicas e filogenéticas indicam que este clado deve também ser classificado como representante de um novo gênero.

CENA315 e CENA348 apresentaram um número de nucleotídeos significativamente diferente nas sequências do gene de RNAr 16S obtidas neste trabalho (1392 e 1415, respectivamente), o que pode resultar de eventos mutacionais como inserções e/ou deleções, além de haver apenas 89 % de similaridade entre si, e de ambas apresentarem o mesmo percentual de similaridade com CENA345, a linhagem mais próxima a elas. Portanto, o

agrupamento em um clado único destas sequências não proximamente relacionadas é provavelmente um artefato ocasionado por atração de ramos longos devido a estas sequências constituírem exemplares únicos dos táxons que representam. Novos isolamentos devem ser realizados para melhor esclarecer o relacionamento entre elas. Além destes, há o indicativo para outros dois novos gêneros unicelulares: um representado pelo clado que compreende CENA331, CENA333, CENA337 e CENA346, e outro por CENA345.

Os isolados CENA324, CENA325, CENA326, CENA328, CENA330 e CENA341 formaram um clado bem definido amparado por um percentual de reamostragem de 100 % que se separa de maneira clara dos grupos de cianobactérias já descritas, podendo ser também classificadas dentro de um novo gênero.

Não foi possível aprofundar as identificações dos isolados para além do nível de gênero com os dados levantados devido ao alto número de novos táxons e à limitação das técnicas utilizadas. Em 1994, Stackebrandt e Goebel determinaram que, para duas linhagens serem classificadas como pertencentes à mesma espécie, devem apresentar um percentual de similaridade entre suas sequências do gene de RNAr 16S igual a ou maior que 97 %. Entretanto, algumas linhagens classificadas em espécies diferentes também podem apresentar este percentual de similaridade. De acordo com Komárek (2010, p. 254, tradução nossa), o conceito de espécie atualmente considerado o mais adequado para as cianobactérias pode ser resumido no seguinte:

Grupo de populações (+linhagens) que pertencem ao mesmo genótipo (gênero), caracterizado por aspectos fenotípicos estáveis (definíveis e reconhecíveis, com limites distintos de variação) e com o mesmo critério ecológico. Elas ocorrem repetitivamente (com o tempo) em uma variedade de locais ecologicamente similares.

Para a identificação ou a caracterização de novas linhagens, Casamatta e Johansen (2004) propõem uma abordagem composta por três passos: 1) a determinação da família pelo arranjo dos tilacoides e pelo tipo de divisão celular; 2) a determinação do gênero através do sequenciamento do gene de RNAr 16S; 3) a determinação da espécie por meio do sequenciamento do espaço intergênico 16S-23S e com o auxílio de caracteres morfológicos. Portanto, com os dados levantados neste trabalho, a menor categoria taxonômica possível de ser determinada é a de gênero (quando este já está descrito), já que as técnicas utilizadas não possuem resolução adequada para a identificação para além deste nível. Para que a identificação das linhagens seja realizada até o nível de espécie, mais estudos são necessários.

No manguezal de Bertioga, o solo do ponto próximo ao mar foi caracterizado como um entisol, um solo que sofreu pouca alteração, com os seguintes atributos químicos: pH 2,8; condutividade elétrica de 7,41 dS.m⁻¹; 7,39 de carbono; 0,46 de nitrogênio; 7,51 mg.Kg⁻¹ de amônio; 10,13 mg.Kg⁻¹ de nitrito; 0,00 mg.Kg⁻¹ de nitrato; 349,54 mg.Kg⁻¹ de fósforo; 6,70 mmolc.Kg⁻¹ de cálcio; 4,22 mmolc.Kg⁻¹ de magnésio; 10,19 mmol.Kg⁻¹ de potássio; 61,45 mmolc.Kg⁻¹ de sódio; e 61,97 mmolc.Kg⁻¹ de alumínio, valores que indicam que este solo apresenta ultra-acidez, alta concentração de sódio e alumínio e deficiência de compostos nitrogenados (RIGONATO, 2010). Apesar das condições na superfície das folhas de *A. schaueriana* no local não terem sido analisadas, é provável que as condições do solo tenham influenciado significativamente as condições da filosfera das árvores do local, especialmente no tocante ao pH e à concentração de íons, constituindo de fato um fator de isolamento. Rigonato (2010) avaliou a diversidade cianobacteriana do solo do manguezal de Bertioga e do solo e da filosfera das árvores do manguezal da Ilha do Cardoso, encontrando menores valores de riqueza (38,33 e 42,58 para os índices Chao1 e ACE, respectivamente) e diversidade (2,23 para o índice de diversidade de Shannon) nos solos coletados em pontos próximos ao mar no manguezal de Bertioga em comparação com os valores obtidos para outros pontos do mangue, como no local próximo à floresta. Na Ilha do Cardoso, a região próxima do mar também apresentou os menores índices de riqueza (valores de 63 para ACE e 85 para Chao1), apesar do maior índice de diversidade (2,52 para Shannon), e também a filosfera de *A. schaueriana* em relação às outras árvores apresentou menor riqueza e diversidade (ACE=13,8, Chao1=5,0 e Shannon=1,31). Contudo, a localização da árvore dentro do manguezal foi apontada como possuindo ainda maior influência sobre a comunidade cianobacteriana que a espécie da árvore. A filosfera de *A. schaueriana* na região mais próxima ao mar apresenta menor riqueza e abundância de cianobactérias que todos os outros habitats estudados, fato que sugere que este seja o habitat mais extremo dentro do manguezal da Ilha do Cardoso. Entre essas amostras, foi encontrado baixo número de unidades taxonômicas operacionais ubíquas. Foram observadas UTOs que apresentavam uma aparente preferência a determinados locais dos manguezais e um elevado número de sequências raras, com apenas um ou dois representantes, que, em sua maioria, se agrupou em um grande clado separado de todo o restante das cianobactérias conhecidas. Foram recuperadas duas UTOS exclusivas para o manguezal da Ilha do Cardoso e uma para o de Bertioga. Esses dados mostram que de fato há uma forte influência do intemperismo, da inundação e da salinidade sobre a composição, a riqueza e a abundância da microbiota dos ecossistemas de mangue. O conjunto destes fatores sugere que as condições da superfície das

folhas de *A. schaueriana* coletadas em Bertioga, em especial sua alta salinidade, de fato podem constituir uma elevada pressão de seleção.

Quando comparadas filogeneticamente com sequências representantes das UTOs de cianobactérias obtidas por Rigonato (2010) em bibliotecas gênicas da filosfera das árvores do manguezal da Ilha do Cardoso, a grande maioria das sequências dos isolados obtidos neste trabalho se apresentou distante não somente das sequências da filosfera de *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*, mas também daquelas provenientes da superfície das folhas de *A. schaueriana* (dados não apresentados). Logo, já que técnicas independentes de cultivo possuem maior resolução que técnicas baseadas em cultura, pode-se dizer que, com exceção de membros dos gêneros *Brasilonema*, *Leptolyngbya* e *Microcoleus*, os táxons isolados neste trabalho provavelmente não habitam a filosfera dos mangues da Ilha do Cardoso. Estas diferenças, é claro, podem ser decorrentes do uso de diferentes métodos de análise ou serem resultantes do impacto do petróleo em Bertioga. Todavia, em vista dos dados coletados e das informações mais recentes a respeito da biogeografia microbiana, há um indicativo de que isto seja fruto de um padrão biogeográfico verdadeiro.

No grupo das cianobactérias, a hipótese de cosmopolitismo generalizado vem sendo questionada por Komárek desde 1985, quando este pesquisador demonstrou que apenas 15 % das espécies de água doce em Cuba eram cosmopolitas e que o restante possuía uma distribuição geográfica bem definida. Trabalhos recentes mostram que a filosfera é um habitat propício para o desenvolvimento de padrões biogeográficos: são relatadas diferenças entre comunidades microbianas de locais distintos como decorrência de variações nas condições ecológicas, das espécies das árvores, da localização geográfica e de fatores temporais. Ruiz (2010) comparou comunidades de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* presentes em duas áreas de Mata Atlântica geograficamente distintas e verificou diferenças significativas entre as comunidades, inclusive encontrando diversos táxons únicos, e concluiu que o conjunto de seus dados sugeria a existência de endemismo, de baixa dispersão e de alto nível de especiação nas bactérias que habitam a superfície das folhas de *M. Robusta*. O padrão biogeográfico de um micro-organismo pode estar relacionado à sua biologia e ao seu habitat, que juntos determinarão quão facilmente é disperso, se permanecerá viável durante o transporte e se é provável que encontre um ambiente favorável (HEDLUND; STALEY, 2004). O isolamento físico é um dos mecanismos que agem sobre a divergência microbiana, conseqüentemente influenciando a evolução dos micro-organismos, e pode ser mais comum do que se acredita hoje, tanto para organismos simbiotes quanto de vida livre. Contudo, a separação física de populações deve ser vista não em termos absolutos, mas como um

gradiente de diferentes frequências de dispersão em que endossimbiontes se encontram em um extremo e cosmopolitas no outro (PAPKE; WARD, 2004). Ramette e Tiedje (2007) afirmam que a dispersão de uma bactéria pode ser limitada por barreiras físicas como a topografia de um local, por requerimentos fisiológicos como estreita faixa de tolerância a variações de temperatura, salinidade ou pH, por fatores ecológicos como alta competição ou por limitação de recursos. A maior parte destes fatores é encontrada na filosfera de espécies de *Avicennia*.

Contudo, não é possível determinar se os candidatos a novos gêneros obtidos neste trabalho são exclusivos do manguezal antropizado de Bertioga, se podem ser encontrados em outros mangues, se possuem *A. schaueriana* como hospedeira exclusiva ou se podem ser encontrados na filosfera de outras árvores e em outros ambientes, já que ainda não há estudos semelhantes, o que impede que seja determinado com certeza qual o fator de maior importância para o estabelecimento destes táxons. Este é provavelmente um resultado da combinação de todas as características extremas a que o ambiente e os microambientes estudados estão submetidos. As informações atualmente disponíveis conduzem à conclusão de que, excetuando-se CENA319, filogeneticamente próxima de cianobactérias não cultivadas de uma zona úmida do semiárido espanhol, CENA320, próxima de sequências ambientais de corais ameaçados, CENA327, relacionada a cianobactérias não cultivadas de fontes termais e de rochas entremarés e o clado formado por CENA329, CENA334, CENA336, CENA338 e CENA343, é possível que os candidatos a seis novos gêneros isolados no presente trabalho representem táxons endêmicos.

6.3 Caracterização ultraestrutural

A análise de secções semifinas por microscopia óptica permitiu visualizar o conteúdo citoplasmático, revelando uma informação que não foi possível ser levantada por microscopia óptica de células íntegras. Mesmo nesta limitada modalidade de microscopia, puderam ser observados grânulos no citoplasma de grande parte das células da cultura de CENA315. Em algumas células, estes grânulos adquiriam um volume bastante elevado. A microscopia óptica dos cortes semifinos das culturas das outras linhagens também acusou a presença de grânulos no citoplasma de algumas das células, porém de menor volume e abundância quando comparados com os grânulos de CENA315 (Figura 6).

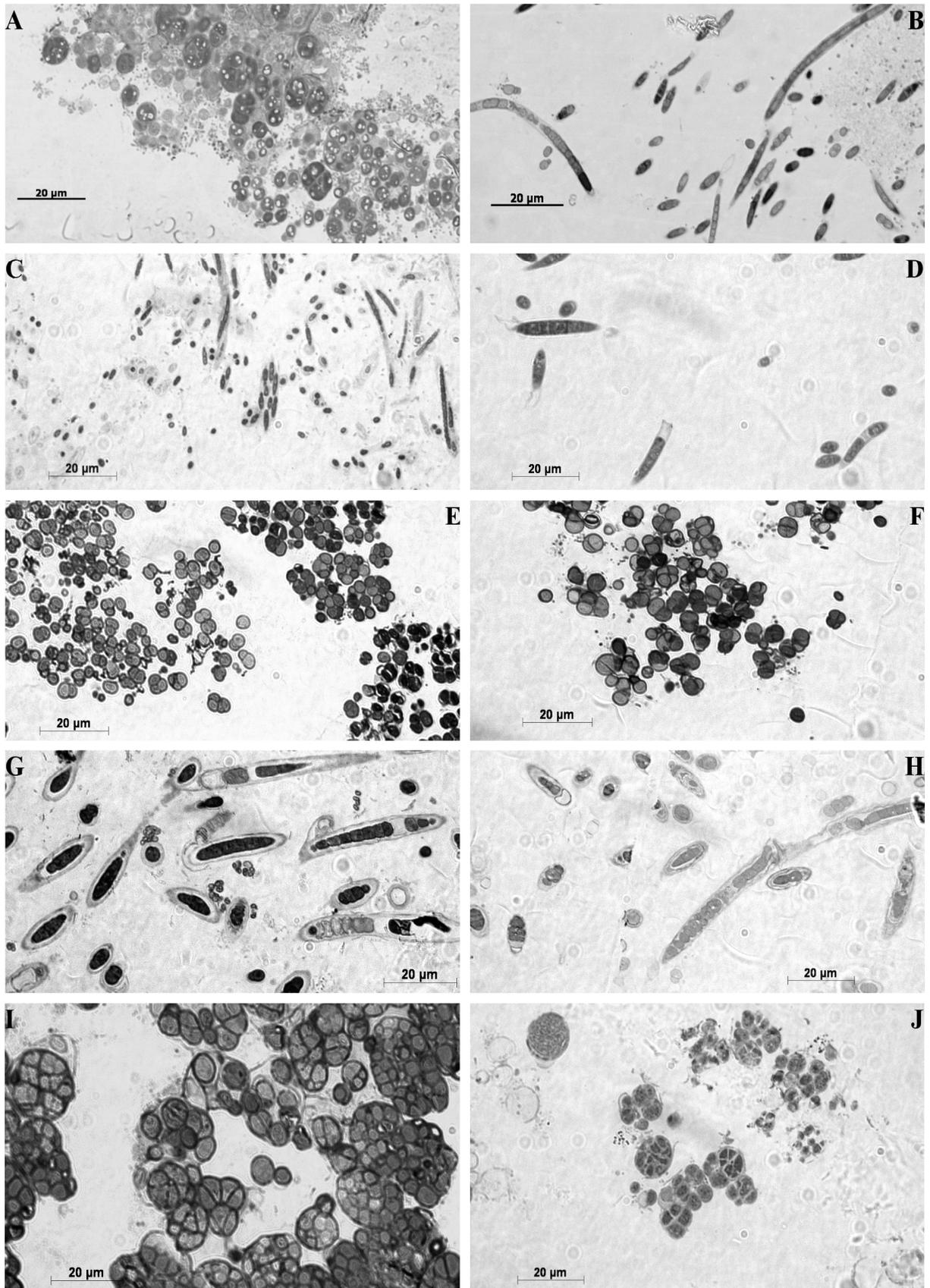


Figura 6 – Micrografias ópticas de secções semifinas de culturas de cianobactérias de possíveis gêneros não descritos. A: CENA315; B: CENA319; C: CENA320; D: CENA321; E: CENA327; F: CENA333; G: CENA338; H: CENA341; I: CENA345; J: CENA348.

Em microscopia eletrônica de transmissão, os grânulos vistos em microscopia óptica puderam ser visualizados com melhor resolução. Os tilacoides das amostras avaliadas se mostraram bastante conspícuos e, de uma maneira geral, sua disposição no citoplasma das células analisadas não divergiu do descrito na literatura para as famílias a que os isolaram foram identificados. Em cianobactérias, os tilacoides costumam ocupar grande parte do citoplasma e suas membranas são geralmente vistas em microscopia eletrônica de transmissão na forma de faixas de coloração clara, como pode ser constatado na Figura 7 e na Figura 8.

Em CENA315, o arranjo dos tilacoides é bastante irregular, com membranas dispersas por todo o citoplasma. CENA327, também unicelular, apresentou tilacoides dispersos em um arranjo irregular por todo o citoplasma, como comumente encontrado em cianobactérias da ordem Chroococcales, porém menos compactos que os de CENA315. Pode-se observar que nos tilacoides destas cianobactérias, segundo Lang (1968, p. 22, tradução nossa), “sua permeação em forma de rede ao longo da célula apresenta um labirinto de placas entrelaçadas”. CENA333, CENA345 e CENA348 possuem um arranjo de tilacoides mais ordenado, com várias camadas sobrepostas que se dobram e se espalham pelo citoplasma. Nesta análise, observou-se em todos esses isolados uma bainha espessa, em conformidade com o observado em outras modalidades de microscopia, e bastante lamelada.

A linhagem CENA319 apresentou tilacoides na periferia da célula, paralelos ao envelope celular, podendo ser vistos pontos de contato entre os tilacoides e a membrana plasmática. Acredita-se que a biogênese de alguns componentes dos tilacoides possa ocorrer nestes sítios de convergência (NICKELSEN et al., 2011). Em adição a estes tilacoides parietais, verificou-se tanto longitudinalmente como transversalmente uma faixa de 4 a 9 membranas atravessando a região central da célula, padrão que se manteve entre as diferentes células desta cultura.

CENA319 possui bastante semelhança morfológica com o gênero *Leptolyngbya*, um dos gêneros cianobacterianos de maior dispersão mundial. A família Pseudanabaenaceae foi recentemente separada das famílias Phormidiaceae e Oscillatoriaceae, pois se mostrou mais próxima evolutivamente de cianobactérias unicelulares. Células quadráticas (de largura de tamanho próximo ao do comprimento) como as encontradas em CENA319 são incomuns nesta ordem, sendo mais características de Phormidiaceae, tendo sido inclusive utilizada como caráter diacrítico em sistemas anteriores (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Por pertencerem à mesma família, membros do gênero *Leptolyngbya* também possuem tilacoides parietais dispostos na periferia da célula (KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2003).

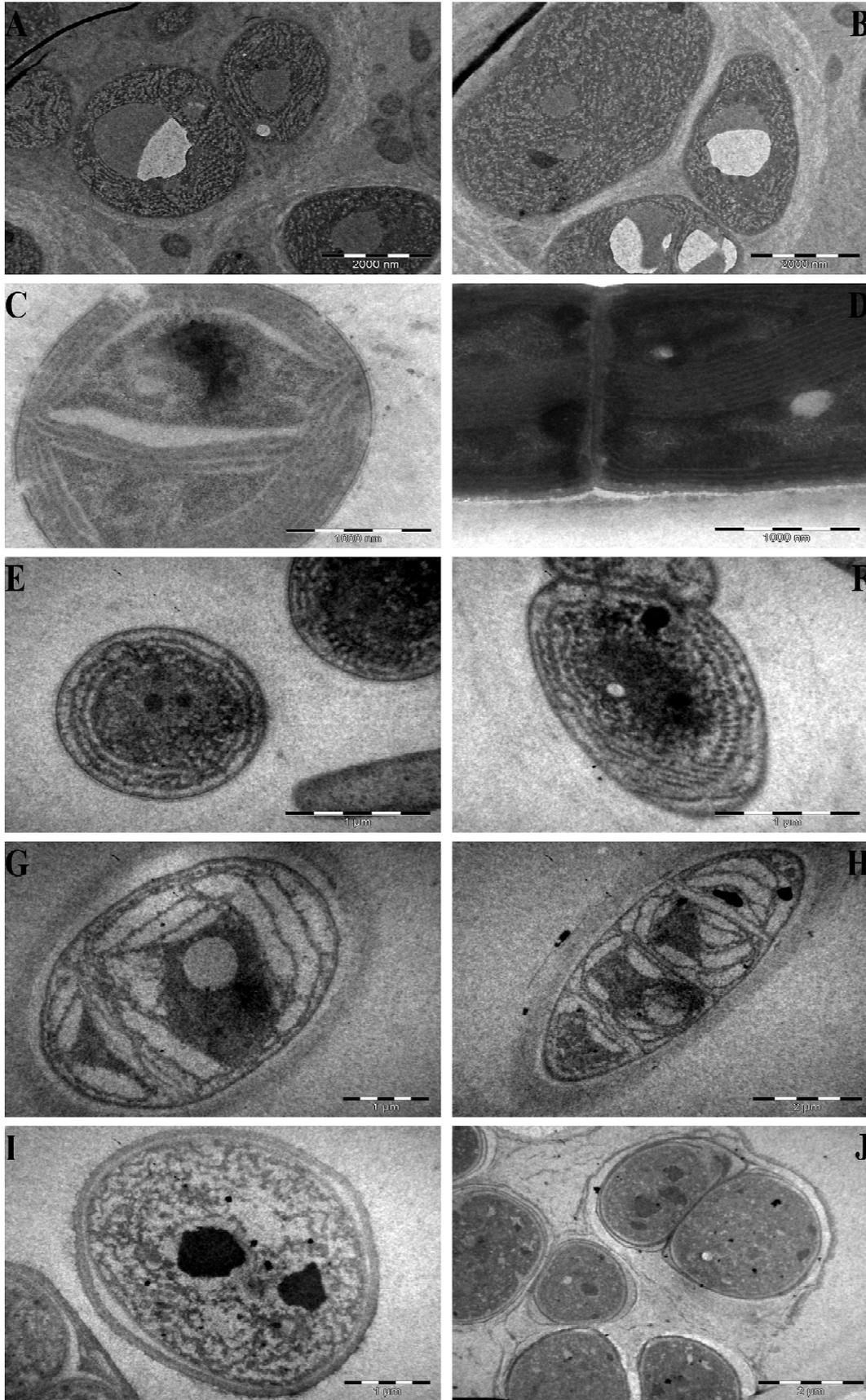


Figura 7 – Micrografias eletrônicas de transmissão de culturas de cianobactérias da filicysta de *A. schaueriana*. A e B: CENA315; C e D: CENA319; E e F: CENA320; G e H: CENA321; I e J: CENA327.

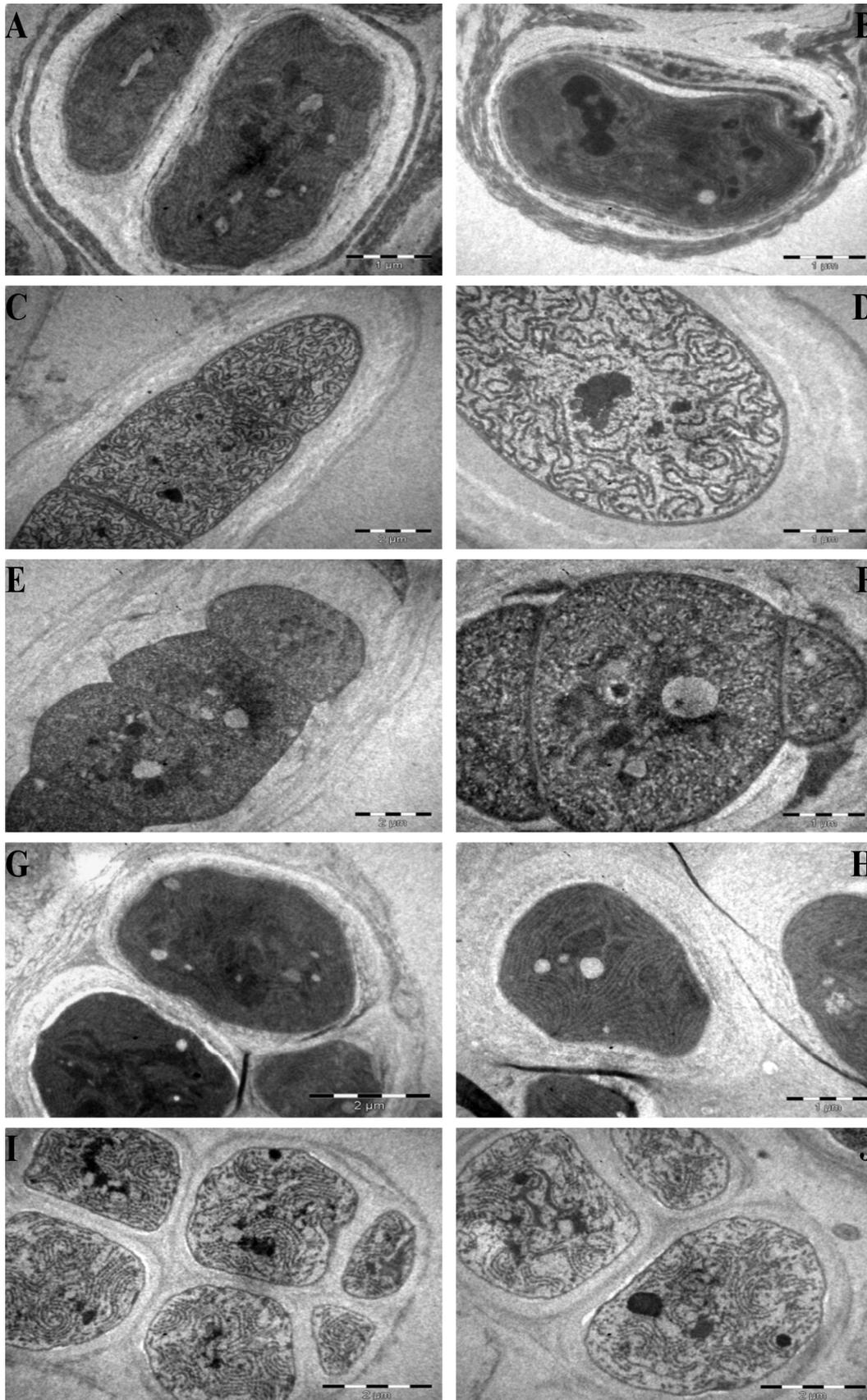


Figura 8 – Micrografias eletrônicas de transmissão de culturas de cianobactérias da filosfera de *A. schaueriana*. A e B: CENA333; C e D: CENA338; E e F: CENA341; G e H: CENA345; I e J: CENA348.

Apesar de a princípio parecer que estas cianobactérias só podem ser diferenciadas por biologia molecular, CENA319 apresenta uma faixa de tilacoides que atravessa o centro da célula longitudinalmente. Esta característica, em conjunto com a predominância de células quadráticas, talvez possa ser adotada como caráter diacrítico. Por sua peculiaridade, a ultraestrutura de CENA319 também auxilia na sua diferenciação de outros táxons como o representado por CENA320. Apesar da pouca diferença morfológica, qualquer dúvida a respeito da divergência taxonômica entre CENA319 e CENA320 é eliminada frente à comparação da ultraestrutura dos tilacoides destas cianobactérias. Enquanto os tilacoides de CENA320 também estão arranjados parietalmente, este isolado possui uma média de 3 a 4 membranas tilacoidais de maior volume, dispostas exclusivamente na periferia da célula.

A alta variabilidade genética encontrada em cianobactérias morfológicamente similares que seriam classificadas dentro da mesma espécie por critérios taxonômicos morfológicos levou à conclusão de que há ocorrência de espécies crípticas dentro deste filo (CASAMATTA; VIS; SHEATH, 2003). Como verificado neste trabalho, outros métodos de caracterização como a microscopia eletrônica e a análise filogenética se tornam fundamentais para uma correta identificação ou classificação de linhagens em casos como o de CENA319, o que mostra novamente a necessidade de uma abordagem polifásica.

O maior volume foi verificado para os tilacoides de CENA321, em cujo citoplasma puderam ser visualizadas 3 a 4 membranas que ocupavam a maior parte deste, se diferenciando significativamente dos tilacoides normalmente encontrados no gênero *Leptolyngbya*, com o qual, até que este gênero seja revisto, possui maior proximidade filogenética, e no restante da ordem Pseudanabaenales.

O arranjo dos tilacoides dos isolados CENA338 e CENA341, cianobactérias identificadas como pertencentes à ordem Nostocales, estão dispostos de maneira irregular por todo o citoplasma. Este arranjo não destoa do esperado para os membros desta ordem, que de fato não costumam apresentar grande variação (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005).

No envelope celular das cianobactérias pode-se distinguir uma membrana externa, uma membrana interna e uma camada de peptidoglicanos de tamanho intermediário entre as encontradas em bactérias gram-negativas e em gram-positivas (HOICZYK; HANSEL, 2000). Dentro do domínio Bacteria, os tilacoides são estruturas exclusivas do grupo das cianobactérias (ZAK et al., 2001). Neles estão contidos o aparato fotossintético e algumas enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons (STEVENS; NIERZWICKI-BAUER, 1991). Em algumas cianobactérias, os tilacoides não possuem ligação com a membrana

plasmática, o que torna este grupo o único táxon bacteriano em que podem ser encontradas organelas verdadeiras (LIBERTON et al., 2006). As cianobactérias que não apresentam tilacoides, representadas pelo gênero *Gloeobacter*, são classificadas em uma ordem própria, Gloeobacterales (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005; RIPPKA; WATERBURY; COHEN-BAZIRE, 1974).

Por desempenharem papel central no metabolismo cianobacteriano, os tilacoides são uma característica confiável devido a, em termos evolutivos, serem bastante conservados, havendo correlação entre as análises moleculares e a ultraestrutura dos tilacoides. Estudos mostraram uma congruência entre esses dois dados e apontaram que há pelo menos duas linhas evolutivas distintas de cianobactérias não heterocitadas, ambas compostas de organismos unicelulares e filamentosos, enquanto cianobactérias com heterócitos, células especializadas para a fixação de N₂, possuem um arranjo mais homogêneo e podem ser consideradas monofiléticas (KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2003). Esta observação foi confirmada no presente trabalho, tendo sido obtida correspondência entre o arranjo de tilacoides e as outras análises.

De uma forma geral, a estrutura celular das cianobactérias e dos cloroplastos das plantas são semelhantes. Um dos aspectos em que os tilacoides das cianobactérias se distinguem dos cloroplastos é, além da não disposição em granos, a associação de ficobilissomos, estruturas captadoras de luz constituídas por grandes agregados de ficobiliproteínas, as proteínas de maior abundância em cianobactérias e que, por serem hidrofílicas, estão em contato com o citoplasma (MULLINEAUX, 1999). Os ficobilissomos podem ser visualizados como pontos pretos na região elétron-densa presente entre as membranas tilacoidais em microscopia eletrônica de transmissão.

Outro aspecto que se destaca no material analisado é a presença de inclusões citoplasmáticas. Em CENA315, como pôde ser constatado anteriormente na microscopia de secções semifinas, estas inclusões celulares adquirem elevado volume, ocupando em algumas células a maior porção do citoplasma. A microscopia eletrônica mostrou que diversos grânulos desta linhagem se apresentam bicolores, fato que sugere que eles possam ser formados tanto por material elétron-denso quanto por de baixa densidade, agrupando, portanto, substâncias de diferente composição química, característica não vista em nenhuma das outras linhagens.

A diversidade das cianobactérias se reflete na diversidade de suas estruturas subcelulares, havendo mais de vinte elementos estruturais subcelulares visualizados em microscopia eletrônica de transmissão já diagramados (STEVENS; NIERZWICKI-BAUER,

1991). Em bactérias, inclusões celulares podem ser inorgânicas ou orgânicas, sendo um resultado de desbalanços nutricionais durante o ciclo de vida do micro-organismo ou constituindo parte fundamental do metabolismo celular (SHIVELY, 2006). Entre as inclusões celulares que podem ser encontradas no citoplasma de cianobactérias podemos citar grânulos de cianoficina (que atuam como reserva de nitrogênio), grânulos de polifosfato (reserva de fósforo), corpos de glicogênio e poli- β -hidroxibutirato (reservas de carbono), carboxissomos (contêm a enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, que está relacionada com a capacidade de assimilação de carbono inorgânico pela cianobactéria) e vacúolos gasosos (que auxiliam a flutuação da cianobactéria na coluna d'água) (ALLEN, 1984). Logo, grande parte dos grânulos cianobacterianos estão relacionados ao armazenamento de nutrientes. Tendo em vista que tanto o mangue quanto a filosfera são habitats nutricionalmente deficientes, é provável que os grânulos observados sejam reservas nutricionais de importância para a colonização e para a sobrevivência das cianobactérias na superfície das folhas de *A. schaueriana*, possibilitando, ainda, uma vantagem competitiva. Como os gêneros analisados são provavelmente desconhecidos até o momento e os isolados são provenientes de um ambiente sobre o qual não há muitas informações, são necessários mais estudos para determinar a composição química exata destas inclusões. O emprego de métodos citoquímicos associados à microscopia eletrônica de transmissão podem contribuir para um melhor esclarecimento desta questão.

O desenvolvimento da microscopia eletrônica provocou uma das maiores mudanças na biologia das cianobactérias. Esta técnica foi a responsável por apontar definitivamente que as “algas verde-azuladas” eram na verdade bactérias (ECHLIN; MORRIS, 1965). Como verificado neste trabalho, a microscopia eletrônica de transmissão continua sendo importante para as análises sistemáticas deste táxon devido a ser capaz de levantar informações citológicas que podem esclarecer enganos cometidos por inferências feitas com base em morfologia ou possibilitar a diferenciação de cianobactérias morfologicamente simples.

6.4 Detecção de regiões de genes de interesse biotecnológico e ecotoxicológico

Os resultados da detecção por PCR dos genes avaliados estão resumidos na Tabela 4. Na avaliação da presença dos genes de policetídeo sintase (PKS) e peptídeo sintetase (NRPS), envolvidos com a síntese de metabólitos secundários, múltiplas bandas puderam ser visualizadas em gel de agarose em adição às bandas esperadas de 700 pb para o gene de PKS, o que provavelmente se deve às baixas temperaturas de anelamento empregadas na reação e

ao elevado número de bases degeneradas nos iniciadores utilizados. Resultado positivo para a presença do gene que codifica para uma PKS foi obtido para dezessete das linhagens testadas (CENA315, CENA316, CENA317, CENA319, CENA320, CENA323, CENA324, CENA325, CENA327, CENA333, CENA337, CENA340, CENA342, CENA344, CENA345, CENA347 e CENA348). Entretanto, para a enzima NRPS, apesar da presença de múltiplas bandas em algumas linhagens, não foram visualizadas bandas próximas ao tamanho esperado (1000 pb) para nenhum dos isolados.

Na amplificação por PCR da região *aerA-aerB* do agrupamento de genes da aeruginosina, todas as linhagens apresentaram bandas, mas somente sete (CENA315, CENA316, CENA317, CENA332, CENA335, CENA337 e CENA344) apresentaram a banda do tamanho esperado (991 pb ou, caso estejam associados a genes de halogenase, 2855 pb). A região *mcnC-mcnE* do agrupamento gênico de cianopeptolina (585 pb ou 2298 pb), foi encontrado em nove das linhagens (CENA315, CENA324, CENA326, CENA338, CENA344, CENA345, CENA346, CENA347 e CENA348).

Na eletroforese em agarose, em nenhuma das ampliações do DNA das linhagens isoladas neste trabalho foram visualizadas bandas do tamanho esperado para os genes com envolvimento na biossíntese de cianotoxinas dos grupos da saxitoxina (*sxtI* - 900 pb), da microcistina (*mcyE* - 810 pb) e da anatoxina-a/homoanatoxina-a (*anaC* - 421 pb) testados.

Tabela 4 – Distribuição de regiões de genes de policetídeo sintase (PKS), peptídeo sintetase (NRPS), aeruginosina (AER), cianopeptolina (MCN), saxitoxina (SXTI), microcistina (MCYE) e anatoxina-a/homoanatoxina-a (ANAC) em cianobactérias isoladas da filofera de *A. schaueria*.

Linhagem	PKS	NRPS	AER	MCN	SXTI	MCYE	ANAC
CENA315	+	-	+	+	-	-	-
CENA316	+	-	+	-	-	-	-
CENA317	+	-	+	-	-	-	-
CENA318	-	-	-	-	-	-	-
CENA319	+	-	-	-	-	-	-
CENA320	+	-	-	-	-	-	-
CENA321	-	-	-	-	-	-	-
CENA322	-	-	-	-	-	-	-
CENA323	+	-	-	-	-	-	-

(continua)

Tabela 4 (conclusão)

Linagem	PKS	NRPS	AER	MCN	SXTI	MCYE	ANAC
CENA324	+	-	-	+	-	-	-
CENA325	+	-	-	-	-	-	-
CENA326	-	-	-	+	-	-	-
CENA327	+	-	-	-	-	-	-
CENA328	-	-	-	-	-	-	-
CENA329	-	-	-	-	-	-	-
CENA330	-	-	-	-	-	-	-
CENA331	-	-	-	-	-	-	-
CENA332	-	-	+	-	-	-	-
CENA333	+	-	-	-	-	-	-
CENA334	-	-	-	-	-	-	-
CENA335	-	-	+	-	-	-	-
CENA336	-	-	-	-	-	-	-
CENA337	+	-	+	-	-	-	-
CENA338	-	-	-	+	-	-	-
CENA339	-	-	-	-	-	-	-
CENA340	+	-	-	-	-	-	-
CENA341	-	-	-	-	-	-	-
CENA342	+	-	-	-	-	-	-
CENA343	-	-	-	-	-	-	-
CENA344	+	-	+	+	-	-	-
CENA345	+	-	-	+	-	-	-
CENA346	-	-	-	+	-	-	-
CENA347	+	-	-	+	-	-	-
CENA348	+	-	-	+	-	-	-

Grande parte dos metabólitos secundários peptídicos de cianobactérias é produzida por vias não ribossomais. Alguns desses metabólitos são encontrados em todos os grandes grupos de cianobactérias, por isso acredita-se que sua origem seja bastante antiga e que constituam uma parte essencial da evolução e da fisiologia cianobacteriana. Visto que a produção destas substâncias tem alto custo energético para a célula, algumas funções como alelopatia, competição, proteção contra a predação e até mesmo mecanismos de comunicação celular do

tipo sensor de quórum, apontadas como possíveis funções ecológicas destas moléculas, podem ser fundamentais para a sobrevivência destes micro-organismos em determinados ambientes. Contudo, a distribuição específica da maioria dos peptídeos pelos táxons cianobacterianos ainda é desconhecida e, apesar dos escassos dados disponíveis apontarem para a ausência de restrição geográfica sobre a distribuição, esta possibilidade ainda não foi descartada (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

Dessa forma, os genes que codificam para as enzimas do grupo das peptídeo sintetases, de uma maneira geral, são amplamente distribuídos entre representantes dos diferentes grupos de cianobactérias, com poucas exceções. Christiansen et al. (2001) verificaram a presença de genes de NRPS em 76 % de 146 linhagens pertencentes a táxons cianobacterianos diversos, apontando que grande número de membros da ordem Chroococcales de fato não possui este gene. Talvez com exceção dos isolados pertencentes a essa ordem, a não amplificação dos genes de NRPS pode estar relacionada com condições indevidas da reação ou com o alto nível de degeneração das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para a reação e sua consequente elevada inespecificidade. Logo, esse resultado não necessariamente é decorrente da inexistência destes genes no genoma das linhagens estudadas. É possível ainda que genes para um sistema híbrido NRPS/PKS sejam predominantes em comparação com genes não híbridos nos isolados testados. Novos iniciadores e condições de amplificação devem ser testados para melhor estudar a aparente ausência deste gene nas cianobactérias isoladas.

Em contrapartida, foi acusada a presença de genes codificantes para policetídeo sintases em metade dos isolados do trabalho presente. Esses genes foram encontrados em ao menos um representante de cada clado encontrado na árvore filogenética, com exceção do clado formado por CENA329, CENA334, CENA336, CENA338 e CENA343, nos quais não se encontrou amplificação de bandas do tamanho esperado. Silva (2010) encontrou resultado positivo para a presença de genes de PKS em todas as suas linhagens, também isoladas de ecossistemas de mangue, com sequências filogeneticamente próximas de linhagens produtoras de substâncias como sideróforos, algicidas, microginina, oscilaginina B, hectoclorina e citonemina.

Cianopeptídeos dos grupos da cianopeptolina e da aeruginosina são também produzidos por peptídeo sintetases não ribossomais, e apresentam grande diversidade estrutural, com suas moléculas podendo receber ainda halogenação adicional. A presença de cianopeptolinas e de aeruginosinas já foi constatada em diversos táxons cianobacterianos, geralmente com uma distribuição congruente com análises filogenéticas, mas, assim como

para as cianotoxinas, apesar de se saber que diversas variantes atuam como inibidoras de serina proteases, a função celular destas substâncias ainda não pôde ser completamente esclarecida (CADEL-SIX et al., 2008). Dentre as sete linhagens positivas para aeruginosina, quatro (CENA316, CENA317, CENA332 e CENA335) apresentavam proximidade filogenética bastante alta para o gene de RNAr 16S. Foi constatada a presença de aeruginosina em duas linhagens pertencentes à ordem Chroococcales, CENA315 e CENA337, e de cianopeptolina em três, CENA345, CENA346 e CENA348. A maior parte dos resultados positivos para cianopeptolina foi observada em membros da ordem Nostocales (CENA324, CENA326, CENA338, CENA344 e CENA347). Apenas CENA315 e CENA344 tiveram resultado positivo para ambos os genes.

As ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales se destacam na produção de cianotoxinas, e a antibiose por citotoxicidade é encontrada principalmente na ordem Nostocales (BURJA et al., 2001). O estudo da presença dos genes de cianotoxinas pode elucidar várias questões concernentes à interação das cianobactérias da filosfera de *A. schauermana* com outros micro-organismos neste habitat. Neste trabalho, foi encontrado alto número de representantes da ordem Nostocales, porém para nenhuma das linhagens se obteve amplificação de genes envolvidos na biossíntese de cianotoxinas.

O gene *mcyE*, junto com os genes *mcyD* e *mcyG*, está envolvido na construção do precursor ADDA-D-Glutamato, responsável pela toxicidade da microcistina, e codifica uma enzima híbrida NRPS-PKS (DITTMAN; NEILAN; BÖRNER, 2001); houve coevolução de genes de microcistina sintetase e de genes estruturais, uma evidência de que a microcistina é um peptídeo cíclico hepatotóxico de origem antiga e que houve repetidas perdas dos genes desta cianotoxina nos grupos de cianobactérias (RANTALA et al., 2004). Já em relação à distribuição dos genes envolvidos na biossíntese da saxitoxina, um alcaloide neurotóxico, análises filogenômicas têm indicado origem por transferência lateral (MOUSTAFA et al., 2009). Os genes *anaC*, *anaE*, *anaF* e *anaG* estão sempre presentes no genoma de linhagens produtoras dos alcaloides neurotóxicos anatoxina-a e homoanatoxina-a (MÉJEAN et al., 2009). Apesar de ainda serem necessários mais estudos para confirmar a ausência de toxicidade nas linhagens obtidas neste trabalho, a não amplificação dos genes é um indício de que, qualquer que seja a função ecológica destas cianotoxinas, elas podem não ser tão necessárias para as cianobactérias no habitat estudado quanto seriam em outros ambientes, ou seja, é provável que o custo energético para a produção destas moléculas não seja compensado por quaisquer benefícios celulares, ecológicos ou evolutivos que poderiam porvir de sua produção.

As cianobactérias que apresentam reprodução por fissão múltipla em adição à fissão binária simples, devido à dificuldade de seu isolamento e à sua menor abundância natural, ainda não foram alvo de muitos estudos (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Neste trabalho foram encontrados candidatos a cinco novos gêneros capazes de fissão múltipla, o que aumenta o interesse sobre as substâncias produzidas por estas linhagens.

Alguns metabólitos secundários isolados de cianobactérias podem apresentar atividade citotóxica, hepatotóxica, neurotóxica ou antimicrobiana. As cianobactérias estão entre os organismos mais promissores para o estudo de substâncias bioativas, especialmente as provenientes de zonas tropicais marinhas (DITTMAN; NEILAN; BÖRNER, 2001). A descrição de novos gêneros pode possibilitar também a descoberta de novas moléculas bioativas.

7. CONCLUSÕES

A superfície das folhas de *A. schaueriana* no manguezal de Bertioga é colonizada por cianobactérias que podem ser isoladas, cultivadas e caracterizadas em laboratório. Dentre as cianobactérias isoladas, algumas possuem potencial para fixação de nitrogênio atmosférico, característica de importância em ambientes oligotróficos. Acredita-se que tenham sido isoladas linhagens representantes de um total de dez novos gêneros, possivelmente um resultado das condições extremas e inconstantes encontradas na filosfera e no manguezal. Filogeneticamente, grande parte dos isolados se distingue de sequências provenientes de folhas de *A. schaueriana* obtidas de um manguezal geograficamente próximo, sugerindo a existência de um padrão biogeográfico nestes micro-organismos. Ultraestruturalmente, destacou-se a presença de grânulos de elevado volume em uma cianobactéria unicelular e de um arranjo de tilacoides incomum em uma cianobactéria filamentosa homocitada de morfologia aparentemente simples. No genoma das cianobactérias, foram encontradas sequências de nucleotídeos relacionadas a genes envolvidos na síntese de substâncias bioativas, gerando maior interesse sobre os produtos naturais potencialmente produzidos pelos isolados. Este é o primeiro relato de isolamento de cianobactérias da superfície de folhas de *A. schaueriana*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.G. Cyanobacterial phylogeny and development: questions and challenges. In: BRUN, Y.V.; SHIMKETS, L.J. **Prokaryotic development**. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 51-81.
- ADGER, W.N.; HUGHES, T.P.; FOLKE, C.; CARPENTER, S.R.; ROCKSTRÖM, J. Social-ecological resilience to coastal disasters. **Science**, Washington, v. 309, p. 1036-1039, 2005.
- ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KRUGENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.Y.; SPIEGEL, TAYLOR, M.J.F.R. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.
- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, n.5, p. 1322-1334, 2008.
- ALBERTANO, P.; KOVÁČIK, L. Is the genus *Leptolyngbya* a homogeneous taxon? **Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 37-51, 1994.
- ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 4, p. 1-4, 1968.
- ALLEN, M.M. Cyanobacterial Cell Inclusions. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 38, p. 1-25, 1984.
- ALONGI, D.M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, Lausanne, v. 29, n. 3, p. 331-349, 2002.
- ALONGI, D.M. Paradigm shifts in mangrove biology. In: PERILLO, G.M.E.; WOLANSKI, E.; CAHOON, D.R.; BRINSON, M.M. **Coastal wetlands: An integrated ecosystem approach**. Amsterdam: Elsevier, 2009. p. 615-640.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1: Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38, p. 291-302, 1985.
- ARIOSIA, Y.; QUESADA, A.; ABURTO, J.; CARRASCO, D.; CARRERES, R.; LEGANÉS, F.; VALIENTE, E.F. Epiphytic cyanobacteria on *Chara vulgaris* are the main contributors to N₂ fixation in rice fields. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 9, p. 5391-5397, 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, Montpellier, v. 16, p. 159-166, 2002.

BASHAN, Y.; PUENTE, M.W.; MYROLD, D.D.; TOLEDO, G. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 165-170, 1998.

BARBER, J. Photosynthetic Generation of Oxygen. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 363, p. 2665-2674, 2008.

BECHER, P.G.; JÜTNER, F. Insecticidal compounds of the biofilm-forming cyanobacterium *Fischerella* sp. (ATCC 43239). **Environmental Toxicology**, Malden, v. 20, p. 363-372, 2005.

BELKIN, S.; QVIT-RAZ, N. Life on a leaf: bacterial epiphytes of a salt-excreting desert tree. In: SECKBACH, J.; GRUBE, M. (Ed.). **Symbioses and stress: Joint ventures in biology, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology**. Dordrecht: Springer, 2010. v. 17, p. 393-406.

BENSON, J.; MARGULIS, L. The *Gunnera manicata-Nostoc* symbiosis: is the red stipulate tissue symbiogenetic? **Proceedings of the Royal Irish Academy**, Dublin, v. 102B, n. 1, p. 45-48, 2002.

BENTLEY, B.L.; CARPENTER, E.J. Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plant. **Oecologia**, Berlin, v. 63, p. 109-113, 1984.

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

BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B.; MULLER, R. Metabolic diversity in myxobacteria: Identification of the myxalamid and stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg A15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* SoCe90. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1445, p. 185-195, 1999.

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

BLANK, C.E.; SÁNCHEZ-BARACALDO, P. Timing of morphological and ecological innovations on the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. **Geobiology**, Malden, v. 8, p. 1-23, 2010.

BOBBARALA, V.; VADLAPUDI, V.R.; NAIDU, K.C. Antimicrobial properties of mangrove plant *Avicennia marina*. **Journal of Pharmacy Research**, Mandasaur, v. 2, n. 6, p. 1019-1021, 2009.

BONNET, S.; WEBB, E.A.; PANZECA, C.; KARL, D.M.; CAPONE, D.G.; SAÑUDO-WILHELMY, S.A. Vitamin B₁₂ excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocospaera* and *Synechococcus*. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 55, n. 5, p. 1959-1964, 2010.

BÖRNER, T.; DITTMAN, E. Molecular biology of cyanobacterial toxins. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P.; VISSER, P.M. (Ed.). **Harmful cyanobacteria**. Dordrecht: Springer, 2005.

BOTHE, H.; TRIPP, H.J.; ZEHR, J.P. Unicellular cyanobacteria with a new mode of life: the lack of photosynthetic oxygen evolution allows nitrogen fixation to proceed. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 192, 783-790, 2010.

BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce III**. Paris: N. Boubée; Cie., 1970.

BRANCO, L.H.Z. **Cyanophyceae de comunidades bentônicas do manguezal da Ilha do Cardoso, Município de Cananéia, SP**. 1991. 153 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1991.

BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo state, Brazil. 1. Chroococcales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 99-111, 1996.

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

BRANCO, L.H.Z.; MOURA, A.N.; SILVA, A.C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das Cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 585-596, 2003.

BURJA, A.M.; BANAIKS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, London, v. 57, p. 9347-9377, 2001.

CADEL-SIX, S.; DAUGA, C.; CASTETS, A.M.; RIPPKA, R.; BOUCHIER, C.; MARSAC, N.T.; WELKER, M. Halogenase genes in nonribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (Cyanobacteria): sporadic distribution and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 9, p. 2031-2041, 2008.

CASAMATTA, D.A.; JOHANSEN, J.R. Morphology, 16S rRNA Gene Sequences, and Internally Transcribed (ITS) Regions: Towards a Meaningful Systematic Framework for the Cyanobacteria. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 7, 2004.

CASAMATTA, D.A.; GOMEZ, S.R.; JOHANSEN, J.R. *Rexia erecta* gen. nov. et sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 561, p. 13-26, 2006.

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**, Amsterdam, v. 77, p. 295-309, 2003.

CASTENHOLZ, R.W. Culturing methods for cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, New York, v. 167, p. 68-95, 1988.

CASTENHOLZ, R.W. Oxygenic photosynthetic bacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 473-600.

CHAPMAN, M.J.; MARGULIS, L. Morphogenesis by symbiogenesis. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 319-326, 1998.

COHEN, Y.; GUREVITZ, M. The cyanobacteria – ecology, physiology and molecular genetics. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2006. v. 4. p. 1074-1098.

COHEN, Y.; JØRGENSEN, B.B.; REVSBECH, N.P.; POPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 398-407, 1986.

COHN, F. Untersuchungen über Bakterien. In: _____. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, Berlin: J.U. Kern's Verlag, 1875. v. 1, p. 127-222.

CRISPINO, L.M.B.; SANT'ANNA, C.L. Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 639-656, 2006.

CHRISTIANSEN, G.; DITTMAN, E.; ORDORIKA, L.V.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 178, p. 452-458, 2001.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

DANIELSEN, F.; SORENSEN, M.K.; OLWIG, M.F.; SELVAM, V.; PARISH, F.; BURGESS, N.D.; HIRAIISHI, T.; KARUNAGARAM, V.M.; RASMUSSEN, M.S.; HANSEN, L.B.; QUARTO, A.; SURYADIPUTRA, N. The Asian tsunami: a protective role for coastal vegetation. **Science**, Washington, DC, v. 310, p. 643, 2005.

DANOVARO, R.; PUSCEDDU, A. Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: does microbial diversity play any role? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 75, p. 4-12, 2007.

DECHO, A.W. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. **Continental Shelf Research**, Oxford, v. 20, p. 1257-1273, 2000.

DEVI, D.; OINAM, S.G.; DEVI, I.; OINAM, T.; SINGH, A.; TIWARI, O.N.; SHARMA, G.D. Ecology and biodiversity analysis of cyanobacteria. **Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental**, Silchar, India, v. 5, n. 1, p. 6-13, 2010.

DI GIULIO, M. The universal ancestor and the ancestor of Archaea and Bacteria were anaerobes whereas the ancestor of the Eukarya domain was an aerobe. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 20, p. 543-548, 2007.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, p. 541–551, 2010.

DITTMAN, E.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T. Molecular biology of the peptide and polyketide biosynthesis in bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 467-473, 2001.

DITTMAR, T.; LARA, R.J.; KATTNER, G. River or mangrove? Tracing major organic matter sources in tropical brazilian coastal waters. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 73, p. 253-271, 2001.

DRENNAN, P.; PAMMENTER, N.W. Physiology of salt excretion in the mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **New Phytologist**, London, v. 91, p. 597-606, 1982.

ECHLIN, P.; MORRIS, I. The relationship between blue-green algae and bacteria. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 143-184, 1965.

EILER, A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, n. 12, p. 7431-7437, 2006.

EL-BESTAWY, E.; EL-SALAM, A.Z.A.; MANSY, A.E.H. Potential use of environmental cyanobacteria species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 59, p. 180-192, 2007.

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

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

FEWER, D.; FRIEDL, T.; BÜDEL, B. *Chroococidiopsis* and heterocyst-differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 23, n. 1, p. 82-90, 2002.

FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por Cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e biodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: AgroLivros, 2008. p. 65-91.

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

FIGLIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 43, n. 4, p. 789-798, 2007.

FIRME, L.P. **Caracterização físico-química de solos de mangue e avaliação de sua contaminação por esgoto doméstico via traçadores fecais**. 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FITZGERALD, M.A.; ORLOVICH, D.A.; ALLAWAY, W.G. Evidence that abaxial leaf glands are the sites of salt secretion in leaves of the mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **New Phytologist**, London, v. 120, p. 1-7, 1992.

FOX, G.E.; PECHMAN, K.R.; WOESE, C.R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 27, p. 44-57, 1977.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a costa rican premontane rain forest. **Oecologia**, Berlin, v. 17, p. 9-18, 1998.

FRITSCH, F.E. **The structure and reproduction of the algae**. Cambridge: University Press, 1945. v. 1.

FÜRNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F.; SESSITSCH, A. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **ISME Journal**, Oxon, v. 2, p. 561-570, 2008.

FURTADO, A.L.; CALIJURI, M.C.; LORENZI, A.S.; HONDA, R.Y.; GENUARIO, D.B.; FIGLIORE, M.F. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative stabilization pond and evaluation of microcystin production. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 627, n. 1, p. 195-209, 2009.

GAU, A.E.; DIETRICH, C.; KLOPPSTECH, K. Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 744-752, 2002.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: **Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland: Österreich und der Schweiz**. Vol. 14. Leipzig: Akademische Verlag, 1932. p. 1-1196.

GENUÁRIO, D.B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GILBERT, G.S.; MEJÍA-CHANG, M.; ROJAS, E. Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. **Oecologia**, Berlin, v. 132, n. 2, p. 278-285, 2002.

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

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

GUPTA, N.; MISHRA, S.; BASAK, U.C. Microbial population in phyllosphere of mangroves grow in different salinity zones of Bhitarkanika (India). **Acta Botanica Malacitana**, Málaga, v. 34, p. 33-37, 2009.

GUPTA, R.S. Evolutionary relationships among photosynthetic bacteria. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 76, p. 173-183, 2003.

GUPTA, R.S. Protein signatures (molecular synapomorphies) that are distinctive characteristics of the major cyanobacterial clades. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2510-2526, 2009.

GUPTA, R.S. Molecular signatures for the main phyla of photosynthetic bacteria and their subgroups. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 104, p. 357-372, 2010.

GUPTA, R.S.; MATHEWS, D.W. Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, p. 24, 2010.

HALL, T. **BioEdit** – Version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, 2001.

HEDLUND, B.P.; STALEY, J.T. Microbial endemism and biogeography. In: BULL, A.T. (Ed.). **Microbial diversity and bioprospecting**. Washington: ASM Press, 2004.

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

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*, a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.

HIRSCHBERG, J.; CHAMOVITZ, D. Carotenoids in cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 559-579.

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

HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: news from a unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, n. 5, p. 1191-1199, 2000.

HORNER-DEVINE, M.C.; CARNEY, K.M.; BOHANNAN, B.J.M. An ecological perspective on bacterial diversity. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 271, p. 113-122, 2004.

ISHIDA, T.; WATANABE, M.M.; SUGIYAMA, J.; YOKOTA, A. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of oscillatoriales and pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 201, p. 79-82, 2001.

JOHANSEN, J.R.; OLSEN, C.R.; LOWE, R.L.; FUČIKOVA, K.; CASAMATTA, D.A. *Leptolyngbya* species from selected seep walls in the Great Smoky Mountains National Park. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 126, p. 21-36, 2008.

JOSET, F.; JEANJEAN, R.; HAGEMANN, M. Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 96, n. 4, p. 738-744, 1996.

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 45, p. 57-88, 2000.

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

KARAMANOLI, K.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; BOSABALIDIS, A.M.; VOKOU, D.; CONSTANTINIDOU, H.A. Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. **Chemoecology**, Basel, v. 15, p. 59-67, 2005.

KATHIRESAN, K.; SELVAM, M. Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. **Botanica Marina**, Hamburg, v. 49, p. 86-88, 2006.

KARNOVSKY, M.J. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137, 1965.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, London, v. 40, p. 81-251, 2001.

KEHOE, D.M. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 20, p. 9029-9030, 2010.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA and genome evolution. **Evolution**, Lancaster, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2001.

KNIEF, C.; RAMETTE, A.; FRANCES, L.; ALONSO-BLANCO, C.; VORHOLT, J.A. Site and plant species are important determinants of the methylobacterium community composition in the plant phyllosphere. **ISME Journal**, Oxon, v. 4, p. 719-728, 2010.

KOMÁREK, J. Do all cyanophytes have a cosmopolitan distribution? Survey of the freshwater cyanophyte flora from Cuba. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38-39, p. 359-386, 1985.

KOMÁREK, J. The modern classification of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). **Oceanological and Hydrobiological Studies**, Gdansk, v. 34, n. 3, p. 5-17, 2005.

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

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota - 1. Teil/ 1nd Part: Chroococcales. In: ETTL, H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1**. Jena: Gustav Fischer, 1999.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota - 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: BUDEL, B., KRIENITZ, L., GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2**. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines in cyanobacteria. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 109, p. 305-326, 2003.

KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, Kidlington, v. 10, p. 504-509, 2007.

KOPP, R.E.; KIRSCHVINK, J.L.; HILBURN, I.A.; NASH, C.Z. The Paleoproterozoic snowball Earth: A climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, n. 32, p. 11131-11136, 2005.

KORELUSOVÁ, J. **Phylogeny of heterocytous cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales)**. 2008. 33 p. Dissertação (Mestrado em Botany) - Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, 2008.

KÜHL, M.; CHEN, M.; RALPH, P.J.; SCHREIBER, U.; LARKUM, A.W.D. A niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*. **Nature**, London, v. 433, p. 820, 2005.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, DC, v. 312, p. 1917, 2006.

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

LANG, N.J. The fine structure of blue-green algae. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 22, p. 15-46, 1968.

LEÃO, P.N.; VASCONCELOS, M.T.S.D.; VASCONCELOS, V.M. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, New York, v. 35, n. 4, p. 271-282, 2009.

LIBERTON, M.; BERG, R.H.; HEUSER, J.; ROTH, R.; PAKRASI, H.B. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. **Protoplasma**, Lipzig, v. 227, p. 129-138, 2006.

LIN, S.; HASS, S.; ZEMOJTEL, T.; XIAO, P.; VINGRON, M.; LI, R. Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. **Gene**, Amsterdam, 2010. Doi 10.1016/j.gene.2010.11.011. Disponível em: <http://precedings.nature.com/documents/4923/version/1/html>.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 13, p. 238-243, 2002.

LITVAITIS, M.K. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 468, p. 135-145, 2002.

LÓPEZ-CÓRTEZ, A.; GARCÍA-PICHEL, F.; NÜBEL, U.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Cyanobacterial diversity in extreme environments in baja california, mexico: a polyphasic study. **International Microbiology**, Barcelona, v. 4, p. 227-236, 2001.

LUGOMELLA, C.; BERGMAN, B. Biological N₂-fixation on mangrove pneumatophores: preliminary observations and perspectives. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 7-8, p. 612-613, 2002.

LUGOMELLA, C.; BERGMAN, B.; WATERBURY, J. Cyanobacterial diversity and nitrogen fixation in coastal areas around Zanzibar, Tanzania. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 103, p. 95-115, 2001.

MACINTYRE, I.G.; TOSCANO, M.A.; FELLER, I.C.; FAUST, M.A. Decimating mangrove forests for commercial development in the Pelican Bays, Belize: long-term ecological loss for short-term gain. **Smithsonian Contributions to the Marine Sciences**, Washington, DC, v. 38, p. 281-290, 2009.

MADIGAN, M.T.; OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 2, p. 265-269, 1999.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; PARKER JUNIOR, C.T.; GARRITY, G.M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T.G.; MCCAUGHEY, M.J.; OLSEN, G.J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHIMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M.; WOESE, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 171-173, 1999.

MANN, F.D.; STEINKE, T.D. Biological nitrogen-fixation (acetylene reduction) associated with blue-green algal (cyanobacterial) communities in the Beachwood Mangrove Nature Reserve: II. Seasonal variation in acetylene reduction activity. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 59, n. 1, p. 1-8, 1993.

MARGULIS, L. **Origin of eukaryotic cells**. New Haven: Yale University Press, 1970.

MARINÉ, M.H.; CLAVERO, E.; ROLDÁN, M. Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. **Limnetica**, Valencia, v. 23, n. 1-2, p. 179-186, 2004.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.L.; SMITH, V.H.; STALEY, J. Microbial biogeography: putting microorganisms in the map. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, 102-112, 2006.

MÉJEAN, A.; MANN, S.; MALDINEY, T.; VASSILIADIS, G.; LEQUIN, O.; LOUX, O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 131, n. 22, p. 7512-7513, 2009.

MOSCATELLI, M. Salvando o manguezal. **Revista ECO 21**, Rio de Janeiro, n. 41, p. 41-42, 1999.

MOUSTAFA, A.; LORAM, J.E.; HACKETT, J.D.; ANDERSON, D.M.; PLUMLEY, F.G.; BHATTACHARYA, D. Origin of saxitoxin genes in Cyanobacteria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2009.

MULLINEAUX, C.W. The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, p. 671-677, 1999.

NAGARKAR, S.; WILLIAMS, G.A.; SUBRAMANIAN, G.; SAHA, S.K. Cyanobacteria-dominated biofilms: a high quality food resource for intertidal grazers. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 512, p. 89-95, 2004.

NAKAYAMA, T.; ISHIDA, K.I. Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in *Paulinella chromatophora*. **Current Biology**, London, v. 19, n. 7, p. 284-285, 2009.

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

NEILAN, B.A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R.A.; SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v.181, p.4089-4097, 1999.

NEVES, M.H.B.; TRIBUZI, D. Les Cyanophycées de la mangrove de la “Ponta do Pai Vitório” de la região de Cabo Frio (RJ, Brésil). **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 14, n. 2, p. 29-52, 1992.

NICKELSEN, J.; RENGSTL, B.; STENGEL, A.; SCHOTTKOWSKI, M.; SOLL, J.; ANKELE, E. Biogenesis of the cyanobacterial thylakoid membrane system – an update. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 315, p. 1-5, 2011.

NOGUEIRA, N.M.C.; FERREIRA-CORREIA, M.M. Cyanophyceae/Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 6, n. 31, p. 347-356, 2001.

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

NUNNERY, J.K.; MEVERS, E.; GERWICK, W.H. Biologically Active Secondary Metabolites from Marine Cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 21, p. 787-793, 2010.

O'MALLEY, M.A. The nineteenth century roots of "everything is everywhere". **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 647-651, 2007.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1895-1902, 2004a.

OREN, A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 359, p. 623-638, 2004b.

OREN, A. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / International Journal of Systematic Bacteriology / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 10-15, 2011.

PANDHAL, J.; WRIGHT, P.C.; BIGGS, C.A. Proteomics with a pinch of salt: a cyanobacterial perspective. **Saline Systems**, London, v. 4, p. 1, 2008.

PAPKE, T.; WARD, D.W. The importance of physical isolation to microbial diversification. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 293-303, 2004.

PAPKE, R.T.; RAMSING, N.B.; BATESON, M.M.; WARD, D.W. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 650-659, 2003.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**, Malden, v. 17, p. 407-413, 2002.

PRINGSHEIM, E.G. The relationship between bacteria and Myxophyceae. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 13, p. 47-98, 1949.

QVIT-RAZ, N.; JURKEVITCH, E.; BELKIN, E. Drop-size soda lakes: transient microbial habitats on a salt-secreting desert tree. **Genetics**, Bethesda, v. 178, p. 1615-1622, 2008.

RABELLO, E. **Biossíntese e caracterização de inibidores de fotossíntese produzidos pela cianobactéria *Fischerella* sp.** CENA 19. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAGHUKUMAR, C.; VIPPARTY, V.; DAVID, J.J.; CHANDRAMOHAN, D. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 433-436, 2001.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology and evolution. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 197-207, 2007.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VALTOMAA, J.; BÖRNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 2, p. 568-573, 2004.

RAVEN, J.A. Cyanotoxins: a poison that frees phosphate. **Current Biology**, London, v. 20, n. 19, p. 850-852, 2010.

RAYMOND, J.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; GERDES, S.Y.; BLANKENSHIP, R.E. Whole-genome analysis of photosynthetic prokaryotes. **Science**, Washington, DC, v. 298, p. 1616-1620, 2002.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REDFORD, A.J.; BOWERS, R.M.; KNIGHT, R.; LINHART, Y.; FIERER, N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 11, 2885-2893, 2010.

REED, R.H.; STEWART, W.D.P. The responses of cyanobacteria to salt stress. In: ROGERS, J.R.G. (Ed.). **Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria**. Oxford: Oxford Science Publisher, 1988. p. 217-231.

REJMÁNKOVÁ, E.; KOMARÉK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Cyanobacteria: a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of Northern Belize (Central America). **Diversity and Distributions**, London, v. 10, p. 189-199, 2004.

RIGONATO, J. **Diversidade de cianobactérias em manguezais do estado de São Paulo**. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIPPKA, R. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 87, p. 93-98, 1972.

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

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.; COHEN-BAZIRE, G. A cyanobacterium which lacks thylakoids. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 100, n. 1, p. 419-436, 1974.

ROBERTS, M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline Systems**, London, v. 1, 5, 2005.

ROSENZWEIG, M.L. **Species diversity in space and time**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

RUINEM, J. Occurrence of *Beijerinckia* in the “phyllosphere”. **Nature**, London, v. 177, p. 220, 1956.

RUINEM, J. The phyllosphere: I. An ecologically neglected milieu. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 15, n. 2, 1961.

RUIZ, W.F.R. **Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SAHOO, K.; DHAL, N.K. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review. **Indian Journal of Marine Sciences**, New Delhi, v. 38, n. 2, p. 249-256, 2009.

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

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

SANDHU, A.; HALVERSON, L.J.; BEATTIE, G.A. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 383-392, 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; DAMIÃO, A.O.; DAMIÃO, A.O.; BARROS, T.F.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, p.124-129, 2010.

SAPP, J. The Prokaryote-Eukaryote dichotomy: meanings and mythology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 69, n. 2, p. 292-305, 2005.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. **Estuaries and Coasts**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 204-218, 1990.

SCHREIBER, L.; KRIMM, U.; KNOLL, D. Interactions between epiphyllic microorganisms and leaf cuticles. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNER, D.; HAMPP, R. (Ed.). **Plant surface microbiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 229-238, 2002.

SHIVELY, J.M. Prokaryote inclusions: descriptions and discoveries. In: _____. **Microbiology Monographs**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. v. 1, p. 3-20.

SIEGESMUND, M.A.; JOHANSEN, J.R.; KARSTEN, U.; FRIEDL, T. *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, n. 6, p. 1572-1585, 2008.

SILVA, C.S.P. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. 2010. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SIMON, R.D.; ABELIOVICH, A.; BELKIN, S. A novel terrestrial halophilic environment: the phylloplane of *Atriplex halimus*, a salt-excreting plant. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 14, p. 99-110, 1994.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington, DC, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SMITH, J.A.C.; POPP, M.; LÜTTGE, U.; CRAM, W.J.; DIAZ, M.; GRIFFITHS, H.; LEE, H.S.J.; MEDINA, E.; SCHÄFER, C.; STIMMEL, K.H.; THONKE, B. Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in northern Venezuela. **New Phytologist**, London, v. 111, n. 2, p. 293-307, 1989.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STAL, L.J.; MOEZALAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 179-211, 1997.

STALEY, J.T. Biodiversity: are microbial species threatened? **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 340-345, 1997.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, n. 225-274, 1977.

STEVENS, S.E.; NIERZWICKI-BAUER, S.A. The cyanobacteria. In: STOLZ, J.F. **Structure of phototrophic prokaryotes**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 15-47.

STEWART, W.D.P. Liberation of extracellular nitrogen by two nitrogen-fixing blue-green algae. **Nature**, London, v. 200, p. 1020-1021, 1963.

SUÁREZ, N.; MEDINA, E. Salinity effects on leaf ion composition and salt secretion rate in *Avicennia germinans* (L.) L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 131-140, 2008.

SWINGLEY, W.D.; BLANKENSHIP, R.E.; RAYMOND, J. Insights into cyanobacterial evolution from comparative genomics. In: HERRERO, A.; FLORES, E. (Ed.). **The cyanobacteria: molecular biology, genetics and evolution**. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. p. 21-43.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**. Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

THACKER, R.W.; MCLEOD, A.M.; MCLEOD, S.W. Herbivore-induced saxitoxin production in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei*. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, n. 1, p. 415-425, 2005.

TAM, N.F.Y.; YAO, M.W.Y. Normalisation and heavy metal contamination in mangrove sediments. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 216, p. 33-39, 1998.

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

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, D.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 46, n. 2, p. 1257-1270, 2006.

TELFORD, R.J.; VANDIK, V.; BIRKS, H.J.B. Dispersal limitations matter for microbial morphospecies. **Science**, Washington, DC, v. 312, p. 1015, 2006.

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

TINDALL, B.J.; ROSSELÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H.J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 249-266, 2010.

TING, C.; ROCAP, G.; KING, J.; CHISHOLM, S.W. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 134-142, 2002.

TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. Cyanobacteria and black mangroves in Northeastern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 11, p. 999-1011, 1995a.

TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. In vitro colonization and increase in nitrogen-fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 1, n. 11, p. 1012-1020, 1995b.

VALIELA, I.; BOWEN, J.L.; YORK, J. K. Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments. **Bioscience**, Washington, DC, v. 51, n. 10, 807-815, 2001.

VAN DAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing micro-organisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.

VYVERMAN, W.; VERLEYEN, E.; WILMOTTE, A.; HODGSON, D.A.; WILLEMS, A.; PEETERS, K.; VIJVER, B.V.; DE WEVER, A.; LELIAERT, F.; SABBE, K. Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms. **Polar Science**, Amsterdam, v. 4, p. 103-113, 2010.

WATERBURY, J.B. The cyanobacteria – isolation, purification and identification. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2006. v. 4, p. 1074-1098.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 530-563, 2006.

WEYENS, N.; LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 27, n. 10, p. 591-598, 2009.

WHITAKER, R.J. Allopatric origins of bacterial species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 361, p. 1975-1984, 2006.

WHIPPS, J.M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G.D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, p. 1744-1755, 2008.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to cyanobacteria. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.

WILMOTTE, A.; STAM, W.R.; DEMOULIN, V. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusions. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 87, p. 1-18, 1997.

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

YADAV, R.K.P.; KARAMANOLI, K.; VOKOU, D. Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 185-196, 2005.

YAMAMURO, M. Importance of epiphytic cyanobacteria as food sources for heterotrophs in a tropical seagrass bed. **Coral Reefs**, Berlin, v. 18, p. 263-271, 1999.

YANG, C.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, n. 7, p. 3889-3894, 2001.

YE, Y.; TAM, N.F.Y.; LU, C.Y.; WONG, Y.S. Effects of salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-excreting mangrove species. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 193-205, 2005.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAITRA, R.; HUANG, F.; ANDERSSON, B.; PAKRASI, H.B.; The Initial Steps of Biogenesis of Cyanobacterial Photosystems Occur in Plasma Membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, p. 13443-13448, 2001.

ZUBERER, D.A.; SILVER, W.S. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 35, p. 567-575, 1978.

ANEXO – Sequências do gene de RNAr 16S

>CENA315 1392 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTTTTTCGGACACAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCATTTGGATGGGGATAACAGAAGGAACTTCTGC
TAATACCCAATATGCAGGAATGTGAAATAAATTTTGCCAAATGAGGAGCTCGCGTCCGATTA
GTTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGC
AGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTTGGGTTGTAAA
CCTCTTTTATTAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTAATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTTAATCGTGTCTGCTGTTAAAGACAGAAGCTCAACTTCTGATCGGCAGTGGGA
AACTGGTTAACTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAAGTACACTCAGGGAC
GAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGAACAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTCGGACCGTCCC
AGAGATGGGTCTTCTCGTAAGAGACCGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCAGCAGT
TCGGCTGGGCACTCTAGGGAAACTGCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGTGACAATGGGTTAA
TCCCAAAAAGCTATCTCAGTTCGGATTGTCGTCTGCAACTCGACGGCATGAAGTCCGAATCG
CTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGTGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTTGGGTTACCCGAAGGCCGTGCGCAACCTTTCGAGGGGGCAGCGGA
CCACGGTGAGCTCAGCGACTGGGGTGAA

>CENA316 1412 pb

GATGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTGTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTAACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTATAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AACTATATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCAAGTATCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACTTCT
GTGAAAGCAGTTGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTAGTTGCCATCAT
TGAGTTGGGCACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGC
CAACTAGCGATAGTGCGCAAATCCATAAACCGTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCC
AACCTTAGGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA317 1413 pb

GATGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG

CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTGTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTATAAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AACTATATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGTCAGTACCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACTTCT
GTGAAAGCAGTTGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG
TGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTAGTTGCCATCAT
TGAGTTGGGCACTTTAAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGC
CAACTAGCGATAGTGCGCAAATCCCATAAACCGTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCC
AACCTTAGGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA318 1410 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTGTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTATAAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AACTGTATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGTCAGTATCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACTTCT
GTGAAAGCAGTGGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTAGTTGCCATCATT
CAGTTGGGCACTTTAAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGCCA
ACTAGCGATAGTGCGCAAATCCCATAAACCGTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCG
CCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCCAA
CCTTAGGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA319 1410 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGACTCTTCGGAGTTAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGATGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGC
TAATACCCAATGTGCCGAGAGGTGAAAGCTTTAGCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTA
GCTAGTTGGTAGTGTAAATGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAAGACGGCCTGTGGGTTGTAAA
CCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAGTACTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTG

CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTC
CGTAGGCGGTTTTTCAAGTCTGCTGTTAAAGCGTGCAGCTCAACTGCATATCGGCAGTGGAA
ACTGAGAGACTAGAGTGTAGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATTGGGAAGAACACCCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGGCTACAACCTGACGCTGATGGACG
AAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACT
AGGTGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCCAACCGCTTAAGTGTCCCGCTGGGG
AGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTAT
GTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTGCAGAATCTCCCT
GAAAGGGGAGAGTGCCTTCGGGAACTGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCATCATT
AGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTGCGGACAAAGGGCAGCCA
ACCAGCAATGGCGCGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCG
CCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAA
CCTTAGGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA320 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGGCCTTAGGAGGGGGACAACCTTTTGGAAACGGAAGC
TAAGACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGGGTTTTTCTGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGCGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGT
AAACCGCTTTTTCTCTGGGAAGAAGACCTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GTCCGCAGGCGGCTAATTAAGTCTGCTGTCAAAGTTCAGGGCTTAACTCTGAATCGGCAGTG
GAAACTGATTAGCTAGAGAGCGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGG
ACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGAC
ACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTTTACGTACCGAAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTG
GGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
TATGTGGTTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATCCC
TTTGAAGAGGGGAGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCATCA
TTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAGAGGGCAG
CGACCTCGCGAGAGCAAGCAAATCCATAAACCGTGGCACAGTTCAGATTGCAGGCTGCAAC
TCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTACGATACGGCGGTGAATACGTTT
CCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTC
TAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA321 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTGCTTCGGCACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGGATAACGACTGGAAACGGTC
GCTAATACCGCATATGCCGAGAGGTGAAATGATTTATTGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGA
TTAGCTAGTTGGAGTGGTAATGGCACACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGT
AAACCTCTTTTTGATAGGGAAGAACAATGACGGTACCTATCGAATCAGCCTCGGCTAACTC
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGTCCGTAGGTGGTTTTATCAAGTCAGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAGGGCAAT
TGAAACTGATAGGCTAGAGTGCATAGGGGCAAGGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAGCGCCTTGTGGGTCTGCACTGACACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGA
TACTAGGCGTTGTTTCGTATCGACCCGGACAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCT

GGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCT
CGGCGAAAGTTGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTGAAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAATGCTGCGGACAAAGGGCA
GCTAACTCGCGAGAGCAAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCGGTTAGATTGCAGGCTGCAA
CTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGTAGTAATCGCAGGTCCGCATACTGCCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACC
CCAACCCTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA322 1413 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGAACAACAGTTGGAAACGACTGC
TAATGCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGTTTTTTTCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTC
CGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCCTAGGGTTGTAA
ACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGAACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGTTGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGA
GACTGGGAGACTAGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACGACTGACGCTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATA
TAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGACGTAACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGGA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATTTCCCT
TGAAAGAGGAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCATCATT
CAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAG
TCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACAGACAGAGGGCAGCG
AGCGCGGAGTGCAAGCAAATCCCATAAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTC
GCCTGCATGAAGGCGGAATCGTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTA
ACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA323 1452 pb

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAT
CTGCCCTTAGGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAACCCCATATGCCGAGAGGTG
AAACGATTTTTTCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGATGAGGTAAAGGCTT
ACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCCTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGAT
CTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG
GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGT
TGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTGGTAG
GGGTAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACGACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGAT
TAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGT
GCAGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG
AGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTCGGAATCTTCCCTGAAAGGGGAGAGTGCCTTCGGGA
ACCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGGGAGACTG
CCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGG

CTACACACGTCCTACAATGCTACAGACAGAGGGCAGCGAGCGCGGAGTGCAAGCAAATCCC
ATAAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTA
GTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGA
AGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA324 1414 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATAACCGGATATGCCGAAAGGTAAGGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGGA
AACTGCATCACTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGACAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCCG
AGAAATTGGAGTGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATT
TAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCGATGGACAAAGGGCAGC
TAACCAGCGATGGCAAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCT
AACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA325 1415 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATAACCGGATATGCCGAATAGGTGAAAGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGT
AAACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG
TCCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGG
AACTGCATCACTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATA
CTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCC
GAGAAATTGGAGTGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGCTGCCAGCAT
TTAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCGATGGACAAAGGGCAG
CTAACAGCGATGGCAAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAAC
TCGCCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCT
TAACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGGCTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA326 1415 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGGATATGCCGAAAGGTAAAAGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGGA
AACTGCATCACTAGAGTACGTTCCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACCGATGGATAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCCG
AGAAATTTGGAGTGTGCCTTCCGGGAGCCGGACCACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCAT
TTAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGATGGACAAAGGGCAG
CTAACCAGCGATGGCAAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAAC
TCGCCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCC
TAACCGTTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA327 1413 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCG
GACGGGTGAGTAAACGCGTGAGAATCTGGCTTTAGGACGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGC
TAAGACCCGATATGCCGAGAGGTGAAAGTAATTTAGCCTAGAGGGGAGCTCGCGTCTGATTA
GCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
GCAATGGGCGAGAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAA
ACTCCTTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTTGGGCGTAAAGCG
TCCGCAGGTGGCATTTCAGTCTGTCTCAAAGGTCCGGGCTTAACTCCGAACAGGCAGTGG
AACTGAGAAGCTAGAGTGCAGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTCAGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATA
CTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCAAGCAGTGCCGGAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCCGGAATCCTG
GGGAAACTCAGGAGTGCCTACGGGAACCGGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTCCGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTLAGTTGCCAGCAT
TAAGTTGGGCACTCTAGAAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCAGCATGCCCTTACGCTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTATGGACAAAGGGCAGC
AGAATGCGAATTCAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCATAACGGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCC
TAACCGCAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA328 1401 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGGATATGCCGAAAGGTAAAAGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA

TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCATAACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGGA
AACTGCATCACTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGAAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGGTTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACCGCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCCG
AGAAATTGGAGTGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATT
TAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGATGGACAAAGGGCAGC
TAACCAGCGATGGCAAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGTGACCTGAAGTCGGCAGGTT
CAGTGCCGATAAGGGTAAAACCGGTGACTGGGGCTAA

>CENA329 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTCCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATAACCGAATGTGCAGAAATGTGAAATATTAATAGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTAGGCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGC
GTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAATAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGGCAGTG
GAAACTACATATGCTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGA
TACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGCGTTAAGCATCCCGCCT
GGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCTCGCAATTC
AGGTGAAAGCTTGAAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCT
CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCA
GCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAA
CTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAATTCGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACC
CCAACCTGCAAGGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAA

>CENA330 1414 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTCCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATAACCGGATATGCCGAAAGGTAAGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGGA
AACTGCATCACTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCCG
AGAAATTGGAGTGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCTTAGTTGCCAGCATT
TAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGATGGACAAAGGGCAGC
TAACCAGCGATGGCAAGCAAATCCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCCCGCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCT
AACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA331 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTTCGAACGAACTCTTTCGAGAGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGACAACAGTTGGAAACGACT
GCTAATAACCAATATGCCTAAGGGTCAAATAAATTTTGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCTTACCAAGGCAGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
GCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGCAAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GTCCGCAGGTGGCCTATCAAGTCTGCTGTCAAAGACTAGAGCTCAACTCTGGAAAGGCAGTG
GAAACTGGGAGGCTAGAGTACGGTAGGGTTGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAACCTGACACTCAGGG
ACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGAT
ACTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTG
GGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
TATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGTCCGGAACCTG
CTGGAAACAGTGGGGTGCCTTCGGGAGCCGAAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTC
GTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCTTAGTTGCCAGCA
GTAAGATGGGCACTTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTGGGACAAAGGGCAG
CTAACTCGCAAGAGCAAGCGAATCTCAGCAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAA
CTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATTCGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCCCGCCGTCACACCATGGAAGTCGGCCACGCCCGAAGTCGTTACC
CTAACCTTTTCGAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA332 1412 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTCAAATAATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCAGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCGATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCTGTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTATAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AAACTGTATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGTCAGTATCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACTTCT
GTGAAAGCAGTGGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG

TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCAT
TCAGTTGGGCACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGC
CAACTAGCGATAGTGCGCAAATCCCATAAACCGTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCC
AACCTTAGGGAGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA333 1418 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACTCATTTATGAGAGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGACAACAGTTGGAAACGACT
GCTAATACCCAATATGCCTTTAGGGGTGAACTTATATGGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTTGGGTTG
TAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGCAAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACT
CCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGTCCGCAGGTGGCGTATCAAGTCTGCTGTCAAAGACTAGAGCTCAACTCTGGAAAGGCGG
TGAAACTGGTAGGCTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAAGTACTGACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGG
ATACTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCC
TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCCGGAACT
AAAGTGAAAGCTTTAGGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATCCTTAGTTGCCAG
CATTAGGTTGGGCACTTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTGGGACAAAGGGC
AGCCAACTCGCAAGAGTGAGCGAATCTCATCAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATTTCG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTCGGCCACGCCCGAAGTCGTTA
CCCTAACCTTTCGAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTACTGGGGTGAA

>CENA334 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTCCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGAATGTGCAGAAATGTGAAAAATTTATTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTAGGCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATTCCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAAGATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGC
GTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTAAATAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGGCAGTG
GAAACTACATATGCTAGAGTACGTTCCGGGCGAGAGGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAAGTACTGACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTTAGCCGTAACGATGGA
TACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCT
GGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCTCGGAATTC
AGGTGAAAGCTTGAAGTGCCTTCGGGAGTGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCT
CGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTGCGGACAAAGGGCA
GCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCCTAGTCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAA
CTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGACGTGAATTTCGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACC

CCAACCTGCAAGGGAGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA335 1412 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTGTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTATAAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AAACTGTATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGTCAGTATCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACTTCT
GTGAAAGCAGTGGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTAGTTGCCATCAT
TCAGTCGGGCACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGC
CAACTAGCGATAGTGCGCAAATCCCATAAACCCTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CAGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCC
AACCTTAGGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA336 1413 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATAACCGAATGTGCAGAGATGTGAAATATTAATAGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTAGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTA
AACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAATCTTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG
TCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTTAAATAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGGCAGTGG
AAACTACATGGCTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATA
CTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCTCGGAACTTAG
GTGAAAGCCAAAGGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTLAGTTGCCAGCAT
TAAGTTGGGCACCTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGC
TAACCAGCGATGGCATGCTAATCTCATAAACCCTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGTGAGCATACTGCAAGTGAATTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACCC
AACCTTGTGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA337 1418 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTTCGAACGAACCTCATTATGAGAGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGACAACAGTTGGAACGACT

GCTAATACCCAATATGCCTTTAGGGGTGAAACTTATATGGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGGCATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTTGGGTTG
TAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGCAAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACT
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGTCCGCAGGTGGCGTATCAAGTCTGCTGTCAAAGACTAGAGCTCAACTCTGGAAAGGCGG
TGAAACTGGTAGGCTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATTGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAAGTACACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGG
ATACTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCC
TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG
AGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCCGGA
AAAGTGAGAGCTTTAGGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCATCCTTAGTTGCCAG
CATTAGGTTGGGCACTTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTGGGACAAAGGGC
AGCCAACTCGCAAGAGTGAGCGAATCTCATCAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATTTCG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGAAGTTCGGCCACGCCCGAAGTCGTTA
CCCTAACCTTTCGAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTACTGGGGTGAA

>CENA338 1412 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTCCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGAATGTGCAGAGATGTGAAATATTAATAGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTAGGTGTGTAAGAGCGCACCTAGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAA
ACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAATCTTGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTTAATAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGGCAGTGGA
AACTACATGGCTAGAGTACGTTCCGGGCGAGGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACCAGGTTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATAC
TAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCTCGCAACTTAGG
TGAAAGCCAAAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTLAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCT
AACCAGCGATGGCATGCTAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTC
GCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAATTCTGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGAAGTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACCCCA
ACCCTTGTGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAA

>CENA339 1412 pb

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAACCCTTTCGGGGGTGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGAGGGAAACTTCT
GCTAAAACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGTTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCTGTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG

TCCGTAGGTGGTTATAAAAAGTCTGTTGTTAAAGCCACAGCTCAACTGTGGATGGGCAATGG
AAACTGTATGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCATAACTGACACTGATGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACA
CTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCAGTATCGAAGCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACGAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGATTGACATCCTACGAACCTTCT
GTGAAAGCAGTGGGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCAT
TCAGTTGGGCACCTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCAACGGACAAAGGGCAGC
CAACTAGCGATAGTGCGCAAATCCCATAAACCGTTGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCC
AACCTTAGGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA340 1410 pb

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCTTCGGATCTAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTTAGGATGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGC
TAATACCCAATATGCCGAGAGGTGAAACTAATTGGCCTGAGGATGAGCTCGCGTCTGATTAG
CTAGTTGGAGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCG
CAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGTAAC
CTCTTTTGACCGGGAAGAACAATGACGGTACCGGTGCAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTC
CGTAGGTGGTTGACCAAGTCAGTTGTTAAAGCGTCGAGCTTAACTCGATAAGGGCAATTGAA
ACTGGTCCGCTAGAGTGCATAGGGGCAAGGGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGTGGTCTGCACTGACACTGAGGGACG
AAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGGTACT
AGGCGTTGTCCGTATCGACCCGGACAGTCCCGTAGCTAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGG
AGTACGCTCGCAAGAGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTAT
GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATGTCCAGAATCCTTGT
GAAAGCAGGGAGTGCCTTCGGGAAC TGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCATCATTC
AGTTGGGCACTCTGAAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CAGCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAA
GCGCGGAGTGAAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCG
CCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAA
CCCTCGGGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA341 1414 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAAAGCGTGAGAATCTGGCTTTGGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGGATATGCCGAAAGGTAAAAGATTAATTGCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGTAATGCAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGCTTAACTACATAAAGGCGGTGGA
AACTGCATCACTAGAGTACGTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA

TGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAAGCTCCG
AGAAATTGGAGTGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATT
TAGGATGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGAGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGATGGACAAAGGGCAGC
TAACCAGCGATGGCAAGCAAATCCATAAACCATGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT
CGCTGCGTGAAGTAGGAATCGTTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCT
AACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>CENA342 1414 pb

AACGAACGCTGGCGGAAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCACCCCTTCGGGGTGAGCGGCA
GACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTGGTTTCGGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAG
TAATACCGCATATGCCGAGAGGTGAAAGGATTAATTGCCTGAGGATGAACTCGCGCTGATT
AGCTAGTTGGAGTGGTGACGGCACACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTC
CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGTAA
ACCTCTTTTGTATAGGGAAGAACAATGACGGTACCTATCGAATCAGCCTCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
TCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCAGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAGGGCAATTG
AACTGATAGGCTAGAGTGCATAGGGGCAAGGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGTCTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATA
CTAGGCGTTGTTCTGATCGACCCGGACAGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGGGT
ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTGCGGAATCTTG
GTGAAAGCCGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGCAT
TAAGTTGGGCACTCTGAAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTGCGGACAAAGGGCAGC
TAACTCGCGAGAGCAAGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTCGAGGCTGCAACT
CGCTGTCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCC
AACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>CENA343 1416 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTG
GCTAATACCGAATGTGCAGAAATGTGAAATATTAATAGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTAGGCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTTAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGC
GTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAATAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGGCAGTG
GAACTACATATGCTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGA
TACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCT
GGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTGCGGAATTC
AGGTGAAAGCTTGAAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCT
CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCA
GCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAA

CTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACC
CCAACCTGCAAGGGAGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAA

>CENA344 1413 pb

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGACAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTGGAGGTCGGGGACAACCCCTGGAAACGGGGGC
TAATACCGGATGTGCCGGAAGGTGAAAGATTTATCGCCTCTAGAGGAGCTCGCGTCTGATTA
GCTAGTTGGTGAGATAAAAGCTCACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAA
CCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGCCATTCAAGTCTGCAGTTAAAGACCGGGGCTCAACTCCGGAGGGGCTGTGGA
AACTGAGTAGCTAGAGGGCAGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGACTGCACCTGACACTCAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATAC
TAGGTGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACCGTTAAGTATCCCGCCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCCGGAATCCTTG
GGAACTAGGGAGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCCTT
AAGTGGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAACAATGCGACGGACAAAGGGCAGCT
ACCTCGCGAGAGTCAGCTAATCCCAAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTC
GCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATCCGTTCCC
GGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGCTGGTTTTTCCCGAAGTCGTTACCCTA
ACCGTTCGCGGAGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTACTGGGGTGAA

>CENA345 1436 pb

CCTGAACGCTGTCCGGTATGGTTAAGACATGCAAGTCGAACGCGCACCTTCGGGTGTGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAATGCGTCACTAACGTACCCCTTCTCTGGGATAGGCACTCGAAAGGGT
GTGTAATAACCAGATAACACTTCGATGTGCAATGGCATTGAAGTCAAAGTCCGCCGGAAGG
GATCGGGCGACGTGGTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTTCGACGCCTA
GCCGGACTGAGAGGTTGGCCGGCCACATCGGGACTGAGACACTGCCCGGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAG
GAAGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATTAAGGAAGAAGAAAGTACGGTACTTAAATGAA
TCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG
AATCATTTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTAATCGTGTCTGCTGTTAAAGACAGAAGCTC
AACTTCTGATCGGCAGTGGAAACTGGTAACTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATTCCTA
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGC
CGTAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCT
TAGCTGTAAACGATGAACACTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACG
CGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACT
TGACATCTCGAGAACCCTGCTTAATGGCGGGGGTGCCTTAGGGAACTCGAAGACAGGTGGTG
CATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
CGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTTAGGAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGTAACAAT
GGTTGGGACAAAGGGTAGCCAACCTCGCAAGAGAGGCCAATCCCATCAAACCCAGCCTCAGT
TCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCA
TACTGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCC
ACGCCCGAAGTCGTTACCCTAACCAATTTATTGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTGA
CTAGGGTGAA

>CENA346 1418 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACTCATTTATGAGAGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGACAACAGTTGGAAACGACT
GCTAATACCCAATATGCCTTTAGGGGTGAACTTATATGGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTTGGGTTG
TAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGCAAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACT
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGTCCGCAGGTGGCGTATCAAGTCTGCTGTCAAAGACTAGAGCTCAACTCTGGAAAGGCGG
TGAAACTGGTAGGCTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATTGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAAGTACACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGG
ATACTAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCC
TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG
AGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCCGGA
AAAGTGAAAGCTTTAGGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATCCTTAGTTGCCAG
CATTAGGTTGGGCACTTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAACAATGGTTGGGACAAAGGGC
AGCCAACTCGCAAGAGTGAGCGAATCTCATCAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATTTCG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGAAGTCGGCCACGCCCGAAGTCGTTA
CCCTAACCTTTCGAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTACTGGGGTGAA

>CENA347 1415 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGGAAGTCGAACGGAGTTCTTCGGAACCTTAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTTCCGGGACAACAGTCGGAAACGATT
GCTAATACCGGATGTGCCTTATGGTGAAAGATTTATCACCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCACCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT
CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA
AACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGTACTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG
TCCGCAGGTGGTTTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGAATCTGGCTCAACCAGATAAAGGCAGTGG
AACTGAAAGACTAGAGTATGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGACCAAACTGACACTGAGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTTAGCCGTAACGATGGATA
CTAGGCGTTGCCCGTATCGACCCGGGAGTGTCTGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCCGGAATCTTC
TGAAACGGAAGAGTGCCTACGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGTCTG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCAA
TTCGGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
GGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAACAATGCTGTGGACAAAGGGCAG
CAGGCTAGCAATAGCAAGCAAATCCCATAAACCAGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAAC
TCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGAGTGAATTCTGTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGAAGTCGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCC
TAACCTTTCGAGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAA

>CENA348 1415 pb

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTCTTCGGAGCTAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGACAACAACGAGAAATCGGTGC
TAAAACCCAATGTGCCGAAAGGTGAAATACTTGTAGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCGATTA
GTTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC

GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGATTTTTGGATTGTAAA
CCTCTTTTTTAAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTTAAGAATCAGCATCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTTAAAGACAGAAGCTCAACTTCTGAGCAGCAGTGGA
AACTGGGCAGCTAGAGTACGGTAGGGGTTGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCAACTGGGCCGTAAGTACTGACACTCAGGGAC
GAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGAACAC
TAGGCGTTGCTTGTATCGACCCGAGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTCAATTTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTGACTCGCCGGCT
CCAGAGACGGAGCCTTCGGTTCGGCCGGAGTCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTCCAGTTGCCATC
AGGTTATGCTGGGCACTTTGGAGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGG
ATGCGAAGGGGCGACCCGGAGCCGATCCCCAAAACCGTCCCAGTTCGGATTGCACTCTGCA
ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAATAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGCCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAAACGGTGC
GCTAACCGCAAGGGGGCAGCCGGTCACGGTAGGATCAATGACTGGGGCGAA