

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

**ANA PAULA DINI ANDREOTE**

**Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias,  
bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica**

**Piracicaba**

**2013**



**ANA PAULA DINI ANDREOTE**

**Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias,  
bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica**

**Versão revisada de acordo com Resolução CoPGr 6018 de 2011**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na  
Agricultura da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no  
Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

**Piracicaba**

**2013**

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**

Andreote, Ana Paula Dini

Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica / Ana Paula Dini Andreote; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - versão revisada de acordo com Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

151 f.: il.

Tese (Doutorado – 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. Biodiversidade 2. Filogenia 3. Microbiologia 4. Sequenciamento genético I.  
Título

CDU 579 : 574.1

**Dedico**

*Aos meus pais Augusto Fernando e Maria de Fátima e aos meus irmãos Fernando e Francisco.*

**Ofereço**

*Ao meu amor Felipe Cardena.*



## **Agradecimentos**

*A Deus, pela minha vida e saúde.*

*A Profa. Marli F. Fiore, pela oportunidade, confiança e orientação.*

*Ao Felipe Cardena, pelo amor, carinho e companheirismo.*

*Aos meus pais Maria de Fátima Dini e Augusto Fernando Andreote, pela educação que recebi.*

*Aos meus irmãos Fernando e Francisco D. Andreote, pelo exemplo, estímulo e orientação. Também pela ajuda nos planejamentos e análises.*

*Aos meus sogros Eleúde e José Antônio Cardena, pelo carinho e atenção.*

*Ao CENA/USP, pela oportunidade e apoio constante.*

*Ao órgão de financiamento FAPESP, pela bolsa de estudos concedida.*

*Prof. Dr. Márcio R. Lambais, Depto. Ciência do Solo, Lab. Microbiologia Molecular ESALQ/USP, pelo apoio na coleta, por disponibilizar o cromatógrafo e a estrutura do laboratório para as análises de fixação biológica do nitrogênio.*

*Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, por disponibilizar o equipamento liofilizador para preparo das amostras bioprospectadas.*

*Ao Dr. Itamar S. Melo, da Embrapa Meio Ambiente e Prof. Dr. Ricardo D. Coletta da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), por disponibilizarem os sequenciadores de DNA.*

*Ao Prof. Dr. Ernani Pinto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF/USP, Lab. Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA), por disponibilizar a estrutura e equipamentos necessários para os ensaios de bioprospecção.*

*À Profa. Dra Siu M. Tsai do Lab. Biologia Celular e Molecular - CENA/USP, pelo apoio e estrutura de laboratório cedida.*

*À Dra. Michele C. P. Silva, por gentilmente ceder as sequências dos iniciadores usados no pirossequenciamento.*

*Às Dras Maria Estela S. Stenico e Miriam S. Roldan, pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas.*

*À todos os envolvidos na coleta das amostras, pelo auxílio logístico e prático.*

À Márcia Parma e Ana Camila M. Pereira, pelo auxílio nos sequenciamentos.

À Alice S. Cassetari e Silvia E. B. Berdugo, pela ajuda nos ensaios de fixação biológica do nitrogênio, pela pronta disponibilidade e atenção.

Ao Marcelo G. M. V. Vaz, pelas aulas de microbiologia, pelas discussões em filogenia e taxonomia, pelas idéias e sinceridade.

Ao Danillo Alvarenga, pelos primeiros ensinamentos em cianobacteriologia e pelas discussões.

A Caroline Hoff, pelas dicas em espectrometria de massas e pelas discussões.

Ao Diego B. Genuário, pelas discussões metodológicas, sobre filogenia e taxonomia.

Aos colegas de laboratório atuais: Marcelo, Danillo, Diego, Gabriela Machineski, Andresa M. Fonseca, Karina H. Silva, Talita Schiavolin, Stella T. Lima; e aos que já seguiram seus caminhos: Estela, Caroline, Elaine Crespin, Patricia D. C. Schaker, Isabela M. Ascencio, Adriana S. Lorenzi, Caroline S. Pamplona, Natália J. N. Gonçalves, Tânia K. Shishido e Janaina Rigonato; pela convivência diária, pelas conversas e discussões, pelos cafés deliciosos, pelas faxinas intermináveis, pelas confraternizações de fim de ano e pelas lições que apredi com cada um de vocês.

Aos colegas de outros laboratórios, por toda a colaboração.

Aos funcionários do CENA/USP, pela ajuda nas atividades logísticas, burocráticas e de laboratório.

E a todos que de alguma forma, em algum momento, colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## RESUMO

**ANDREOTE, A. P. D. Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica.** 2013. 151 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

A filosfera da Mata Atlântica é um importante nicho de colonização por micro-organismos, cuja comunidade ainda é pouco conhecida. Algumas bactérias associadas à superfície das folhas possuem habilidade de fixar nitrogênio, mineralizar substratos orgânicos e também suprir as árvores com dióxido de carbono e fatores de crescimento. Este trabalho teve como objetivo gerar informações sobre a comunidade cianobacteriana que coloniza a filosfera de algumas plantas da Mata Atlântica e investigar a comunidade diazotrófica presente nesse habitat. Um total de 40 linhagens de cianobactérias da filosfera de *Merostachys neesii* (bambu), *Euterpe edulis* (palmeira Juçara), *Guapira opposita* e *Garcinia Gardneriana* foram isoladas e cultivadas. Os isolados foram caracterizados por análises morfológicas e filogenia do gene 16S rRNA. Essa abordagem permitiu a identificação de uma linhagem do gênero *Nostoc*, sete *Desmonostoc*, seis *Leptolyngbya*, uma *Oculatella*, cinco *Brasilonema*, uma *Pleurocapsa* e duas *Chroococcidiopsis*. Dezessete linhagens (uma Microchaetaceae, dez Nostocaceae e seis Pseudanabaenaceae) não puderam ser identificadas ao nível de gênero. Vinte e seis linhagens (24 pertencentes às ordens Nostocales e duas à Pseudanabaenales) foram caracterizadas como diazotróficas pela amplificação, sequenciamento e filogenia do gene *nifH*. Além disso, caracterizou-se o perfil de fixação biológica de nitrogênio da linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362. Com relação ao potencial biotecnológico dessas linhagens, treze isolados foram identificados como potenciais produtores de ácido indol acético (IAA) de acordo com o teste Salkowski. Diversas linhagens apresentaram genes associados à via biossintética do inibidor de protease microviridina, sendo que três delas codificam para novas variantes. Além disso, dez linhagens foram identificadas como potenciais produtoras aeruginosina, três de cianopeptolina e três de microcistina. A comunidade bacteriana diazotrófica avaliada por pirosequenciamento do gene *nifH* apresentou um perfil de variação espécie-específica para Proteobacteria e uma correlação positiva entre a riqueza e a fixação biológica de nitrogênio. Neste estudo, cianobactérias que habitam a filosfera da Mata Atlântica foram isoladas estão sendo mantidas em condições de cultivo. Novos táxons foram descobertos e vários gêneros conhecidos foram descritos pela primeira vez neste habitat, o que contribuiu para o aprimoramento da sistemática de Cyanobacteria. As linhagens em cultivo e as informações geradas sobre os seus compostos metabólicos representam uma valiosa fonte para estudos posteriores. Além disso, informações sobre a comunidade bacteriana diazotrófica da filosfera pode auxiliar no entendimento da dinâmica do nitrogênio, elemento limitante e pouco disponível na Mata Atlântica.

**Palavras-chave:** Epifíticos. Filogenia. Taxonomia. Análise polifásica. Microcistina. Microviridina. Aeruginosina. Cianopeptolina. Fixação biológica do nitrogênio.



## ABSTRACT

ANDREOTE, A. P. D. **Phyllosphere of the Atlantic Forest: isolation and systematic of Cyanobacteria, bioprospection and diazotrophic community characterization.** 2013. 151 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The phyllosphere of the Atlantic Forest is an important niche for colonization by microorganisms, whose community is still little known. Some bacteria associated with leaf surfaces may possess the ability to fix nitrogen, mineralize the organic substrates and also supply the trees with carbon dioxide and growth factors. Therefore, this study aimed to generate information about cyanobacterial community that colonize the phyllosphere of some plants of the Atlantic Forest and investigated the diazotrophic community in this habitat. A total of 40 strains of Cyanobacteria from the phyllosphere of *Merostachys neesii* (bamboo), *Euterpe edulis* (Juçara palm), *Garcinia gardneriana* and *Guapira opposita* was isolated and cultivated. The isolates were characterized by morphological analyses and phylogeny of the 16S rRNA gene. This approach allowed the identification of one strain of the genus *Nostoc*, seven *Desmonostoc*, six *Leptolyngbya*, one *Oculatella*, five *Brasilonema*, one *Pleurocapsa* and two *Chroococcidiopsis*. Seventeen strains (one Microchaetaceae, ten Nostocaceae and six Pseudanabaenaceae) could not be identified at the genus level. Twenty-six strains (24 belonging to Nostocales and two belonging to Pseudanabaenales) were characterized as diazotrophic by amplification, sequencing and phylogeny of *nifH* gene. Also, it was characterized the profile of biological nitrogen fixation for the strain *Desmonostoc* sp. CENA362. Regarding the biotechnological potential of these strains, thirteen strains were identified as potential producers of indole acetic acid (IAA) according to Salkowski test. Several strains presented genes involved in the biosynthetic pathway of the protease inhibitor microviridin, three of them encoding putative novel variants. Moreover, ten strains were identified as potential producers of aeruginosin, three of cyanopeptolin and three of microcystin. The diazotrophic bacterial community evaluated by pyrosequencing of the *nifH* gene showed a profile of variation plant species-specific for Proteobacteria, and a positive correlation between richness and biological nitrogen fixation. In this study, cyanobacteria that inhabiting Brazilian Atlantic Forest phyllosphere were isolated and are been maintained in culture conditions. New taxa were discovered and several known genera were described for the first time in this habitat, which contributed to improvement of the cyanobacterial systematic. The culturable strains and the information generated about their metabolites compounds represent a valuable source for further studies. In addition, information about the diazotrophic bacterial community inhabiting the phyllosphere may help in understanding the dynamics of nitrogen, a limiting and low available element in Atlantic Forest.

**Keywords:** Epiphytic. Phylogeny. Taxonomy. Polyphasic approach. Microcystin. Microviridin. Aeruginosin. Cyanopeptolin. Biological nitrogen fixation.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>A Mata Atlântica e sua diversidade microbiana.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>A superfície das folhas (filosfera) como habitat de micro-organismos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>A fixação biológica do nitrogênio em florestas tropicais.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>As cianobactérias .....</b>	<b>21</b>
2.4.1	A fixação biológica do nitrogênio em cianobactérias .....	22
2.4.2	Sistemática cianobacteriana .....	23
2.4.3	Bioprospecção de moléculas conhecidas .....	26
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Área de estudo e coleta .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Isolamento das linhagens de Cyanobacteria .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterização morfológica dos isolados .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4</b>	<b>Caracterização filogenética dos isolados pelo gene 16S RNAr.....</b>	<b>32</b>
5.4.1	Extração de DNA .....	32
5.4.2	Amplificação do gene 16S RNAr.....	33
5.4.3	Clonagem dos fragmentos gênicos.....	33
5.4.4	Seleção de clones .....	34
5.4.5	Extração do DNA plasmidial .....	34
5.4.6	Sequenciamento .....	35
5.4.7	Processamento das sequências .....	35
5.4.8	Análises filogenéticas.....	36
<b>5.5</b>	<b>Caracterização do gene <i>nifH</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6</b>	<b>Bioprospecção .....</b>	<b>37</b>
5.6.1	Seleção por PCR .....	37
5.6.2	Ensaios colorimétricos .....	39
5.6.3	Espectrometria de Massas .....	40
<b>5.7</b>	<b>Análise da FBN pela linhagem <i>Desmonostoc</i> sp. CENA362 .....</b>	<b>41</b>
5.7.1	Ensaio de redução do acetileno .....	42
<b>5.8</b>	<b>Levantamento da comunidade diazotrófica por pirosequenciamento do gene <i>nifH</i> .....</b>	<b>43</b>
5.8.1	Extração de DNA .....	43

5.8.2 Amplificação e sequenciamento .....	44
5.8.3 Análise das sequências .....	45
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Caracterização das linhagens isoladas .....</b>	<b>47</b>
6.1.1 Linhagens unicelulares .....	50
6.1.2 Linhagens homocitadas .....	54
6.1.3 Linhagens heterocitadas .....	61
<b>6.2 Bioprospecção.....</b>	<b>71</b>
6.2.1 Ensaios colorimétricos para detecção de AIA e sideróforos .....	71
6.2.2 Busca por moléculas conhecidas .....	73
<b>6.3 Análise filogenética do gene <i>nifH</i> das potenciais linhagens diazotróficas isoladas</b>	<b>83</b>
<b>6.4 Fixação biológica do nitrogênio pela linhagem <i>Desmonostoc</i> sp. CENA362 ....</b>	<b>89</b>
<b>6.5 Diversidade de diazotróficos na filosfera de <i>E. edulis</i>, <i>M. neesii</i> e <i>G. opposita</i>.</b>	<b>91</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A superfície das folhas (filosfera) é o maior ambiente aerofítico passível de colonização por micro-organismos (MORRIS; KINKEL, 2002; VORHOLT, 2012). Apesar disso, por muito tempo foi um ambiente negligenciado em estudos que contemplavam a diversidade e funcionalidade das comunidades microbianas em sistemas naturais, de modo que, apenas no final da década de 90, passou a despertar maior interesse dos pesquisadores de todo o mundo.

A filosfera da Mata Atlântica brasileira, sob o ponto de vista da colonização microbiana, consiste em um mosaico de possibilidades. O primeiro fator responsável por isso é o fato desse bioma apresentar altíssima diversidade de espécies vegetais, abrigando cerca de 20.000 considerando-se apenas as plantas vasculares (MYERS; MITTERMEIER; MITTERMEIER, 2000); cada uma delas com suas próprias características foliares estruturais e químicas. Sabe-se que diferentes espécies de plantas podem selecionar comunidades microbianas distintas em sua filosfera (LAMBAIS et al., 2006) e que a localização da planta, assim como sua idade e condição nutricional também afetam a estrutura dessas comunidades (RIGONATO et al., 2012; RIOS RUIZ, 2010; YANG et al., 2001; WHIPPS et al., 2008). Além disso, esse bioma possui uma distribuição latitudinal e longitudinal ao longo do território brasileiro, o que expõe as espécies vegetais a diferentes condições climáticas, tais como variações de temperatura e regime de chuvas, e a estratificação da floresta também determina variações nas condições de luminosidade e umidade.

O filo Cyanobacteria pertence ao domínio Bacteria e abriga linhagens fotoautotróficas oxigênicas de ampla distribuição e plasticidade funcional. Sabe-se que a filosfera é um ambiente passível de colonização por esses organismos, mas, informações sobre sua diversidade na Mata Atlântica são escassas. Em 2011, o trabalho de tese desenvolvida por Gonçalves, mostrou haver uma elevada diversidade desse filo na filosfera da Mata Atlântica e identificou um perfil de seleção da comunidade cianobacteriana espécie-dependente nas espécies vegetais avaliadas. Outro aspecto relevante é que as cianobactérias são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos com potencial aplicação biotecnológica e farmacológica (BURJA et al., 2001), de modo que constituem um grupo interessante para abordagens de bioprospecção.

A sistemática das cianobactérias é complexa e historicamente vem sofrendo profundas modificações. Atualmente, o filo está inserido em dois códigos de nomenclatura: o Botânico e o Bacteriano; o que provoca disparidades e conflitos. O sistema de classificação mais aplicado atualmente para as cianobactérias é o Botânico, uma vez que ainda hoje são os pesquisadores

dessa área do conhecimento os responsáveis pela maioria dos estudos voltados à taxonomia e filogenia de linhagens do grupo. Para a acurácia das afiliações é indicada a abordagem polifásica, que agrupa dados filogenéticos e ultra-estruturais (citológicos) às análises morfológicas tradicionalmente usadas para a taxonomia do grupo (HOFFMAN; KOMÁREK; KASTOVSKÝ, 2005).

Além da capacidade de fixar carbono, diversos grupos de cianobactérias são capazes de realizar também a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN); de modo que podem atuar como produtores primários de matéria orgânica e fonte de nitrogênio combinado nos ecossistemas (BERMAN-FRANK et al., 2001; CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; FAY et al., 1992; WOLK et al., 1994). Sabe-se que os solos da Mata Atlântica são pobres em nitrogênio disponível e que os micro-organismos diazotróficos têm um papel fundamental no aporte desse elemento em florestas tropicais (CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009; JORDAN et al., 1983; REED; ROGGY et al., 1999; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008).

A diversidade de diazotróficos envolve diferentes grupos filogenéticos de arquéias e bactérias com habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico em amônia. A FBN já foi reportada na filosfera (BENTLEY, 1987; FREIBERG, 1998; FRITZ-SHERIDAN; PORTÉCOP, 1987) e grupos como as cianobactérias e proteobactérias têm sido relatados como atuantes no processo de FBN nesse ambiente (GÓMEZ, 2012; FÜRNKRANZ et al., 2008).

O presente estudo gerou informações inéditas sobre a sistemática e sobre aspectos do potencial biotecnológico das cianobactérias da filosfera da Mata Atlântica, baseando-se em linhagens isoladas e cultivadas que hoje compõem o Banco de Culturas de Cianobactérias do CENA/USP. Ainda, caracterizou a comunidade bacteriana diazotrófica presente nesse ambiente baseando-se no sequenciamento massivo do gene *nifH*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Mata Atlântica e sua diversidade microbiana

A Mata Atlântica é um conjunto de formações florestais que ocorrem na costa Atlântica da América do Sul, cobrindo originalmente grande parte do litoral brasileiro com extensões no Paraguai e Argentina (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Este bioma abrange toda a costa do Brasil, atingindo 17 estados. Devido à sua distribuição longitudinal, latitudinal e altitudinal é composto por uma série de unidades fitogeográficas, constituindo um mosaico de grande diversidade. Em termos da conservação da biodiversidade mundial, está entre os mais ameaçados devido à contínua supressão de habitats e ao alto grau de endemismo de espécies (MYERS et al., 2000). Atualmente, estima-se que somente 8,5% da Mata Atlântica original brasileira seja remanescente (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE, 2012), sendo que essa estimativa pode chegar a 11 % se forem consideradas as áreas ocupadas pelos inúmeros pequenos fragmentos (<100 ha) (RIBEIRO et al., 2009).

A maior porção remanescente desse bioma localiza-se na costa dos estados de São Paulo e do Paraná devido, principalmente, ao relevo irregular da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba, o que torna difícil o acesso à essas áreas e também as faz impróprias para práticas agrícolas (LEITÃO FILHO, 1994). O Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), localizado no estado de São Paulo, é a maior área de proteção integral do litoral brasileiro e a maior área protegida de Mata Atlântica do Brasil. Criado em 1977, seus 315.390 hectares abrangem parte de 23 municípios, distribuídos do norte ao sul do estado. No planalto, abriga as cabeceiras dos rios Paraíba do Sul, Tietê e Ribeira de Iguape. Dentro do parque encontram-se diversos tipos de vegetação: floresta ombrófila densa, restinga, campo de altitude, manguezal e várzea (HIROTA, 2003). O PESM é o único corredor biológico íntegro conectando os remanescentes florestais do sul do estado do Rio de Janeiro aos remanescentes do Vale do Ribeira e Paraná, possibilitando a manutenção dos fluxos gênicos e a preservação das espécies que necessitam de grandes territórios para sua sobrevivência.

Qualquer que seja o grupo taxonômico considerado, a estimativa do número de espécies na Mata Atlântica está entre as maiores do planeta. Sabe-se que este bioma abriga ao menos 250 espécies de mamíferos, 1.023 de aves, 197 de répteis, 340 de anfíbios, 350 de peixes e 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo que cerca de 40% destas são endêmicas (MYERS; MITTERMEIER; MITTERMEIER, 2000). Em relação às espécies de

invertebrados e de micro-organismos, há uma carência de informações sobre sua diversidade. Um fator alarmante é que dados os níveis de supressão da Mata Atlântica, sugere-se que muitas espécies foram e estão sendo extintas antes mesmo de serem descritas (REIS et al., 1992).

Considerando os micro-organismos, a Mata Atlântica consiste num celeiro de biodiversidade inexplorado, uma vez que os estudos realizados são poucos em frente à complexidade deste bioma. Do mesmo modo, os processos que determinam a composição, manutenção e função dessa diversidade microbiológica permanecem como questões a serem respondidas.

Em relação aos micro-organismos cultivados, a maior coleção de bactérias isoladas da Mata Atlântica pertence ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O acervo contém 800 isolados de diversos tipos de solo encontrados no bioma e de diversos gêneros bacterianos. No estado de São Paulo, outros acervos também abrigam linhagens de micro-organismos isolados da Mata Atlântica, dentre os quais destacamos os bancos específicos para o filo Cyanobacteria do Instituto de Botânica de São Paulo (IBOT/ Seção de Ficologia); e agora, com este trabalho, o banco de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP), que conta com as 40 linhagens isoladas no presente estudo e mais outras 40, isoladas de diversos ambientes aerofíticos e corpos d'água. As linhagens isoladas e depositadas nesses bancos servem de fontes para estudos taxonômicos (FIORE et al., 2007; GAMA JUNIOR, 2012; SANT'ANNA et al., 2010; 2011), e aplicados (SILVA-STENICO et al., 2012). Em 2007, Fiore e colaboradores descreveram um novo gênero de cianobactéria, *Brasilonema*, colonizando folhas de bromélias e canos d'água na casa de vegetação do Jardim Botânico de São Paulo. Esse gênero se mostrou, posteriormente, ter ampla ocorrência na Mata Atlântica (SANT'ANNA et al., 2011). Em estudo similar, Sant'Anna e colaboradores (2010) descrevem os gêneros *Ophiothrix*, *Streptostemon*, isolados de superfície de rocha e tronco, e solo da Mata Atlântica.

Na última década, com a disseminação do uso das técnicas independentes de cultivo, muitos trabalhos foram e estão sendo realizados para a investigação de micro-organismos de diversos biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica. Em 2006, Lambais e colaboradores publicaram um estudo conduzido nas copas das árvores no qual mostraram haver uma variação na estrutura da comunidade bacteriana influenciada pela espécie da planta. Recentemente, um estudo amplo foi conduzido, o qual levantou informações sobre a diversidade bacteriana existente nos diversos habitats epifíticos da Mata Atlântica (GOMÉZ, 2012). Nesse estudo, análises utilizando o pirosequenciamento do 16S RNAr mostraram que

há diferentes comunidades bacterianas associadas à serapilheira, solo, casca e folhas das árvores. Os dados mostraram, ainda, que essas comunidades são influenciadas não só pela espécie, mas também pela localização da planta. Outros estudos realizados recentemente abordaram a diversidade de bactérias e arquéias no solo (BRUCE et al., 2010; FAORO et al., 2010; LIMA, 2011), a diversidade de bactérias associadas a cogumelos (HALSEY, 2012), a estrutura da comunidade de cianobactérias em filosfera (GONÇALVES, 2011) e aspectos da biogeografia microbiana (RIOS RUIZ, 2010).

## **2.2 A superfície das folhas (filosfera) como habitat de micro-organismos**

O ambiente formado na interface entre as folhas e a atmosfera é chamado filosfera. Estimativas globais sugerem que a área total da filosfera seja de  $10^8 \text{ km}^2$  (MORRIS; KINKEL, 2002), o que pode, na verdade, corresponder ao dobro em se considerando as faces adaxial e abaxial das folhas (VORHOLT, 2012); constituindo o maior ambiente epífítico colonizado por micro-organismos. Esse ambiente vem sendo estudado não somente sob o ponto de vista de caracterização de sua biodiversidade, mas também sob o enfoque de teorias ecológicas (MEYER; LEVEAU, 2012).

A filosfera é um ambiente hostil ao estabelecimento e desenvolvimento dos micro-organismos, pois apresenta baixa disponibilidade de nutrientes e condições ambientais extremas como grande amplitude de temperatura, estresse osmótico e alta incidência de raios ultravioleta (UV) (WHIPPS et al., 2008). Apesar dessas características, fungos, arquéias e bactérias habitam esse ambiente, sendo que as últimas estão presentes em maioria (ANDREWS; HARRIS, 2000; LEVEAU, 2006). As bactérias da filosfera não estão preferencialmente dispostas como células solitárias ou em grupos pequenos, mas sim em amplos agregados formando um denso e complexo biofilme (MORRIS; MONIER; JACQUES, 1998). Esses biofilmes podem ser formados por uma complexa comunidade contendo bactérias, fungos, leveduras, protozoários, algas e vírus (LINDOW, 2003). Em relação à distribuição espacial da comunidade, a colonização tende a ocorrer em associação com determinadas estruturas foliares, tais como nervuras, estômatos e tricomas, o que favorece a aderência (BALDOTO; OLIVARES, 2008; MECHABER et al., 1996).

Os micro-organismos da filosfera apresentam mecanismos refinados que lhe permitem resistir às condições de estresse biótico e abiótico a que estão expostos (revisado por VORHOLT, 2012). A filosfera é um ambiente onde há elevada liberação de oxigênio devido à

atividade fotossintética das plantas e também elevada luminosidade, de modo que é comum a formação espécies reativas de oxigênio, moléculas que causam danos aos ácidos nucléicos, proteínas e lipídios. Para se proteger, é comum os micro-organismos produzirem pigmentos e/ou acionarem mecanismos de reparo de DNA, com a síntese de fotoliases, catalases e superóxido desmutases (GUNASEKERA; SUNDIN, 2006; JACOBS; CARROLL; SUNDIN, 2005). A dessecação também é um estresse constante nesse habitat, contornado pelos micro-organismos com a formação de agregados e liberação de exopolissacarídeos e biossurfactantes (BEATTIE, 2011; BUNSTER; FOKKEMA; SCHIPPERS, 1989; YU et al., 1999). A competição entre os micro-organismos é intensa, de modo que a produção de antibióticos, assim como de moléculas que conferem resistência representam vantagem adaptativa. A baixa disponibilidade de nutrientes seleciona micro-organismos capazes de sintetizar moléculas que aumentem essa disponibilidade, tais como biossurfactantes e o ácido indol-3-acético (AIA, da classe das auxinas). Os biossurfactantes também geram um aumento na umidade, permitindo a lixiviação dos nutrientes do substrato (SCHREIBER et al., 2005). A liberação de AIA em baixas concentrações ainda estimula o afrouxamento da parede celular e a libertação de açúcares da célula vegetal (LINDOW, 2003).

Os fatores que determinam a dispersão dos micro-organismos na filosfera, assim como os processos que selecionam essa comunidade são inúmeros e vêm sendo intensamente estudados nos últimos anos. A migração da comunidade microbiana é influenciada por fatores abióticos tais como ventos e chuvas, e bióticos, como queda de galhos e folhas e animais. Sabe-se também que alguns grupos de micro-organismos são perpetuados em uma planta pela própria semente (DARRASSE et al., 2010). A determinação da estrutura da comunidade microbiana na filosfera não é randômica, mas fruto de um processo seletivo (VORHOLT, 2012). Estudos mostram que a composição e estrutura dessas comunidades variam entre espécies de plantas, entre plantas da mesma espécie e também com a idade da folha, a localização da folha na planta e a localização da planta (LAMBAIS et al., 2006; REDFORD; FIERER, 2009; REDFORD et al., 2010; RIGONATO et al., 2012; RIOS RUIZ, 2010; YANG et al., 2001; WHIPPS et al., 2008). Em 2006, Lambais e colaboradores, estudando a filosfera de plantas da Mata Atlântica, identificaram um perfil de variação onde o fator determinante da estrutura dessas comunidades é a espécie de planta, o mesmo perfil encontrado por Gonçalves (2011) estudando o filo Cyanobacteria.

O intercâmbio de elementos entre filosfera e atmosfera é, em grande parte, mediado pelas populações microbianas, sendo a filosfera um habitat fundamental para a ciclagem de

nutrientes, principalmente do nitrogênio (ABRIL; TORRES; BUCHER, 2005; FREIBERG, 1998; FURNKRANZ et al., 2008).

### **2.3 A fixação biológica do nitrogênio em florestas tropicais**

O nitrogênio é um elemento essencial para o desenvolvimento dos organismos vivos, pois é componente de biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucléicos. Entretanto, a maior reserva de nitrogênio da Terra está na atmosfera em forma gasosa ( $N_2$ ) e, portanto, indisponível para uso da maioria dos seres vivos (VITOUSEK; HOWARTH, 1991). Há duas entradas naturais para esse elemento na biosfera, a fixação atmosférica e a biológica. A fixação atmosférica ocorre por meio dos relâmpagos e raios, cuja elevada energia separa as moléculas de nitrogênio e permite que os seus átomos se liguem com moléculas de oxigênio existentes no ar formando monóxido de nitrogênio (NO). Este é posteriormente dissolvido na água da chuva e depositado no solo. A fixação biológica do nitrogênio (FBN), por sua vez, pode ser realizada apenas por alguns grupos de bactérias e arquéias, que utilizam o nitrogênio na sua forma elementar e o disponibilizam para outros organismos como moléculas orgânicas (YOUNG et al., 1992). Essa via é responsável por 97% da entrada de nitrogênio em ambientes terrestres naturais (GALLOWAY et al., 2004; VITOUSEK et al., 2002). Além disso, o nitrogênio pode entrar nos sistemas naturais devido a poluição atmosférica, principalmente, como componente da chuva ácida (SINGH; AGRAWAL, 2008).

A reação base da FBN é uma redução do  $N_2$  dependente de ATP em duas moléculas de amônia, sendo um dos processos metabólicos de maior custo energético, em que 16 moléculas de ATP são consumidas para cada  $N_2$  fixado (SIMPSON; BURRIS, 1984). Apesar de ser um dos processos metabólicos de maior custo energético na natureza, a FBN constitui uma grande vantagem adaptativa por conferir maior autonomia às células e permitir a colonização de ambientes deficientes nesse elemento (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997).

A FBN é o processo mais importante de entrada do nitrogênio em ambientes naturais. Sabe-se que grande parte do processo é realizado por organismos simbiontes associados às raízes de plantas leguminosas (CREWS, 1999; GEHRING et al., 2005), mas organismos epifíticos de vida livre também atuam no processo (CLEVELAND et al., 1999; REED et al., 2007). Os diazotróficos de vida livre em ambientes florestais ocupam os mais diversos habitats epifíticos, tais como a superfície dos troncos e galhos das plantas, das folhas, a serapilheira ou sobre o solo, rochas e galhos caídos (BARRON et al., 2008; DELUCA et al., 2002; MATZEK; VITOUSEK, 2003; ROSKOSKI, 1980). Estudos sugerem que a FBN pelos

micro-organismos presentes na filosfera pode ser um mecanismo fundamental para o aporte desse nutriente em ecossistemas tropicais úmidos (BENTLEY, 1987; DOJANI et al., 2007; FREIBERG, 1998; FRITZ SHERIDAN; PORTÉCOP, 1987; FURNKRANZ et al., 2008; YANG et al., 2001).

A reação química da FBN é realizada pelo complexo enzimático nitrogenase, codificada pelo agrupamento dos genes *nif*DKH (ZEHR et al., 2000; 2001). O complexo nitrogenase é altamente conservado e consiste em duas proteínas, a dinitrogenase ou proteína Mo-Fe (ferromolibidênio) e dinitrogenase redutase, ou proteína-Fe (ferro). A dinitrogenase é composta de duas subunidades alfa, codificadas pelo gene *nifD* (LAMMERS; HASELKORN, 1983), duas subunidades beta, codificadas pelo gene *nifK* (MAZUR; CHUI, 1982) e corresponde ao sítio de ligação e redução do N<sub>2</sub> (ORME-JOHNSON, 1992). Já a dinitrogenase redutase é codificada pelo gene *nifH* (MEVARECH et al., 1980) e suas funções são hidrolisar o ATP e mediar a transferência de elétrons do doador de elétron externo (a ferrodoxina ou a flavodoxina) para a dinitrogenase (ORME-JOHNSON, 1992). Ainda, existem outros sistemas alternativos que utilizam outros cofatores. Um desses sistemas utiliza o vanádio no lugar do molibdênio e é codificado pelos genes *vnfH/vnfDGK*. O outro sistema contém somente ferro e é codificado pelos genes *anfHDGK* (BISHOP; JOERGER, 1990; ZEHR et al., 2003). Um ponto crítico para a FBN está no fato de que o complexo nitrogenase é irreversivelmente inativado por oxigênio (FAY, 1992). Acredita-se que isso deve à provável origem desta enzima em um período anterior à oxigenação da atmosfera terrestre (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003).

Uma vez conhecidos os genes responsáveis pela FBN, estudos envolvendo abordagens independentes de cultivo vêm sendo amplamente utilizados para se acessar as comunidades diazotróficas (BEN-PORATH; ZEHR, 1994; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; FARNECID, et al., 2011; FURNKRANZ et al.; 2008; ININBERGS et al., 2011; ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Para tal, o *nifH* é o mais utilizado e possui amplo banco de dados, com 33.449 sequências disponíveis no *Functional gene pipeline e repository* – FunGene (<http://fungene.cme.msu.edu/index.spr> - versão 7.3 de 22/10/2013). Apesar de já ter sido reportada a transferência horizontal dos genes *nif* (BOLHUIS et al., 2009), outros estudos demonstram seu perfil de transferência vertical, a partir de um ancestral comum; evidenciado pela topologias semelhante de árvores filogenéticas geradas pelo sequenciamento do 16S RNAr e *nifH* (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). De modo geral, afiliações taxonômicas utilizando os genes *nif* apresentam melhor resolução nos níveis taxonômicos mais elevados (FARNECID et al., 2011; FURNKRANZ et al., 2008; ININBERGS et al., 2011), sendo que

análises mais refinadas devem ser aplicadas para considerações sobre os demais níveis taxonômicos. Nesse sentido, a constante ampliação e curagem taxonômica do banco de dados de sequências tem sido de extrema valia.

Estima-se que uma grande quantidade de nitrogênio circule anualmente nas florestas tropicais (MARTINELLI et al., 1999). Porém, como o ciclo deste elemento é controlado por diversos fatores físicos, químicos e biológicos, de baixa previsibilidade, é difícil estimar a real disponibilidade de nitrogênio para as plantas (VITOUSEK, 1986).

De modo geral, os solos da Mata Atlântica são ricos em matéria orgânica, mas tendem a ser pobres em nitrogênio (MIRANDA; CANELLAS; TRINDADE-NASCIMENTO, 2007). Acredita-se que essa floresta possua metade do já pouco nitrogênio encontrado na Amazônia ( $1,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), mas ambas possuem mais do que o encontrado nas florestas temperadas (JOLY; MARTINELLI, 2008). Variações na altitude e tipo de solo também influenciam a disponibilidade de nitrogênio nas florestas. Solos da Mata Atlântica entre 0-100 m de altitude são mais pobres nitrogênio do que os 400-1000 m (MARTINS, 2010).

As taxas de FBN nas florestas tropicais estão entre as mais altas do planeta (SODERAND; ROSWALL, 1982; CLEVELAND et al., 1999), devido não só à associação entre diazotróficos e raízes de leguminosas (ROGGY et al., 1999), mas também aos diazotróficos de vida livre, os quais geram aportes significativos de nitrogênio nesse ambiente ( $> 10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) (CUSACK; SILVER; MCDOWELL, 2009; JORDAN et al., 1983; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008). Goméz (2010) relatou elevada taxa de FBN no solo rizosférico, casca e folhas de *Euterpe edulis*, *Guapira opposita* e *Merothachys neesii* na Mata Atlântica. Ainda, demonstrou haver uma variação sazonal e também entre as espécies vegetais analisadas.

## 2.4 As cianobactérias

Cyanobacteria é um filo pertencente ao domínio Bacteria que abriga os únicos micro-organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica. Esse grupo possui uma longa história evolutiva, cuja origem data de cerca de 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1996), sendo, provavelmente, os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (SCHOPF; WALTER, 1982). Outro ponto marcante na evolução da biosfera relacionado às cianobactérias está na origem dos cloroplastos das algas e das plantas, pela endossimbiose (GUPTA, 2009; MCFADDEN, 2001; MARGULIS, 1970).

Apesar de sua natureza fotoautotrófica, alguns grupos de cianobactérias são heterotróficas facultativas, crescendo na ausência de luz e utilizando substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL, 1997). Também ocorrem exceções quanto ao doador de elétrons para a fotossíntese, de modo que alguns grupos, quando em condições anaeróbicas, utilizam o sulfeto ao invés da água. Há também grupos que realizam fermentação com produção de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, acetato, lactato ou etanol (COHEN et al., 1986; RIPPKA, 1972; STAL; MOEZALAAR, 1997). Em alguns ambientes, a mixotrofia (combinação de diferentes estratégias metabólicas) pode ser também observada (EILER, 2006). Recentemente, um grupo de cianobactérias que não apresentam ficobiliproteínas e fotossistema II foi acessado em ambiente marinho utilizando técnicas de sequenciamento massivo. Esse grupo de cianobactérias plantônicas, provavelmente, possui um modo de vida ainda desconhecido (BOTHE; TRIPP; ZEHR, 2010).

A longa história evolutiva combinada a plasticidade fisiológica das cianobactérias, são os fatores responsáveis pela sua ocorrência nos mais diversos tipos de habitats. Elas podem ser encontradas em ambientes comuns como solos, água doce e marinha e ambientes epífitos; e também em ambientes considerados extremos, tais como de temperaturas muito baixas ou elevadas, pobres em nutrientes, como filosfera e desertos, de pH elevado, entre outros (WHITTON; POTTS, 2000). Além de ocuparem diversos ambientes e habitats inseridos nesses ambientes, as cianobactérias podem ser de vida livre ou viverem associadas com briófitas, plantas vasculares, fungos, algas, esponjas marinhas e corais (LESSER et al., 2004; RAI, 2002). A plasticidade genética e fisiológica das cianobactérias reflete-se ainda na sua morfologia, que apresenta ampla variedade de tamanho, arranjo e forma. São encontrados tanto organismos extremamente pequenos e morfologicamente simples, como as cianobactérias unicelulares picoplantônicas, até formas multicelulares filamentosas, ramificadas, multiseriadas e até com células diferenciadas (WATERBURY, 2006). Essa variação morfológica foi e ainda é utilizada na classificação dos táxons dentro do filo Cyanobacteria.

#### **2.4.1 A fixação biológica do nitrogênio em cianobactérias**

As cianobactérias são os únicos micro-organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica e a FBN e por isso desenvolveram alternativas para proteger sua maquinaria de FBN não somente do oxigênio atmosférico, mas também do gerado intra-celularmente (ADAMS, 2000; BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). Acredita-se que

os mecanismos de segregação espacial ou temporal da fotossíntese e da FBN foram sendo desenvolvidos provavelmente junto com a evolução da oxidação dos oceanos e da atmosfera terrestre (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003).

Cianobactérias da ordem Nostocales apresentam capacidade de diferenciar células chamadas heterócitos, as quais propiciam um ambiente anaeróbico para o complexo nitrogenase. Os heterócitos são células tipicamente maiores do que as células vegetativas e possuem envoltório celular mais espesso, com duas camadas adicionais, que limitam a difusão de oxigênio para o ambiente intra-cellular (WOLK; ERNST; ELHAI, 1994). Já organismos da ordem Oscillariales realizam a FBN em grupos de células vegetativas contíguas ao longo de filamentos individuais chamadas diazócitos (BERMAN-FRANK et al., 2001; COMPAORÉ; STAL, 2010). A conformação das colônias em densos agregados também pode favorecer a formação de ambientes anaeróbicos ou micro-anaeróbicos em Chroococcales. Outras linhagens realizam uma separação temporal entre a fotossíntese e a fixação de nitrogênio, de modo que a primeira reação ocorre no período luminoso e a segunda no período escuro em ambiente anaeróbico (SHERMAN et al., 1998).

As cianobactérias diazotróficas encontram-se em ambientes aquáticos e aerofíticos, e podem ser de vida livre ou simbiontes (FOSTER et al., 2011; LESSER et al., 2004; WILKINSON; FAY, 1979). Esse filo é responsável por uma grande quantidade da FBN global, principalmente nos oceanos (CAPONE et al., 1997; ZEHR et al., 2001). Um estudo recente sugere que a origem da nitrogenase nas cianobactérias se deu em uma cianobactéria ancestral e foi transferida verticalmente, com poucos eventos significativos de transferência horizontal (LATYSHEVA et al., 2012). Essa informação é corroborada pela observada coerência entre a filogenia do gene *nifH* e 16S RNAr (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Entretanto, algumas exceções podem existir (BOLHUIS et al., 2009; GENUÁRIO, 2010).

#### **2.4.2 Sistemática cianobacteriana**

A sistemática (taxonomia + filogenia) do filo Cyanobacteria é confusa e vem historicamente sofrendo profundas modificações (OREN, 2011; CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Inicialmente, esses micro-organismos foram explorados em estudos de cunho botânico (BOURRELY, 1970; DESICACHARY, 1979; GEITLER, 1932) e por isso foram classificados dentro do mesmo sistema usado para algas e plantas, o Código de Nomenclatura Botânica (OREN, 2011; BOLD; WYNNE, 1985). Somente na década de 70 as

cianobactérias passaram a ser tratadas dentro do Código de Nomenclatura Bacteriana, após estudos citológicos que comprovaram se tratar de bactérias do grupo das gram-negativas (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). A partir daí, passaram a ser classificadas dentro de dois sistemas, o sistema de classificação microbiológico (CASTENHOLZ, 2001; RIPKA et al., 1979) e botânico (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985; 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; 1999; 2005), sendo o segundo historicamente mais utilizado. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e análises de sequência de DNA, a filogenia utilizando genes marcadores passou a ser aplicada nas determinações taxonômicas. Em 2005, Hoffman, Komárek e Kastovský propuseram uma revisão nos sistemas de classificação descritos até então, unindo dados filogenéticos e ultra-estruturais (citológicos) às análises morfológicas tradicionalmente usadas para a taxonomia do grupo. Segundo o sistema de classificação de Hoffman, Komárek e Kastovský (2005), o filo Cyanobacteria se organiza taxonomicamente em 6 ordens e 29 famílias (Tabela 1), baseando-se, primeiramente, em características morfológicas e ultra-estruturais.

**Tabela 1** - Classificação das cianobactérias de acordo com o sistema de classificação proposto por Hoffman, Komárek e Kastovský (2005)

Ordem	Características morfológicas	Família(s)
Gloeobacterales	Cocóide, sem tilacóides	Gloeobacteraceae
Synechococcales	Unicelular, tilacóides com arranjo parietal, 1 ou 2 planos de divisão	Synechococcaceae, Acaryochloridaceae, Merismopediaceae e Chamaesiphonaceae
Pseudanabaenales	Homocitada, tilacóides parietais	Pseudanabaenaceae e Schizothrichaceae
Chroococcales	Unicelular, tilacóides com arranjo radial, 3 ou mais planos de divisão	Cyanobacteriaceae, Microcystaceae, Prochloraceae, Gomphosphaeriaceae, Chroococcaceae, Entophysalidaceae, Spirulinaceae <sup>1</sup> , Stichosiphonaceae, Dermocarpellaceae, Xenococcaceae e Hydrococcaceae
Oscillatoriales	Homocitada, tilacóides com arranjo radial	Borziaceae, Phormidiaceae, Ammatoideaceae, Oscillatoriaceae e Gomontiellaceae
Nostocales	Heterocitada, tilacóides com arranjo irregular	Scytonemataceae, Symphyonemataceae, Borzinemataceae, Rivulariaceae, Microchaetaceae, Nostocaceae, Chlorogloeopsidaceae, Hapalosiphonaceae, Loriellaceae e Stgonemataceae

<sup>1</sup> Na revisão de Komárek (2006), Spirulinaceae é transferida para a ordem Oscillatoriales.

Apesar do avanço gerado com essa forma de classificação, a relação filogenética estimada por genes marcadores, não apresenta uma distribuição coerente entre as divisões dos níveis taxonômicos mais elevados (ordem e família). Apenas a ordem Nostocales é monofilética (CASTENHOLZ, 2001; FEWER; FRIEDL; BÜDEL, 2002; KOMÁREK, 2010; TURNER, 1997) e grupos filogenéticos de diferentes ordens e famílias se misturam nas reconstruções filogenéticas (SCHIRRMEISTER et al., 2011).

Em 2010, um trabalho publicado pelo Professor J. Komárek reuniu informações e discutiu o “passo-a-passos” para a descrição de novos grupos cianobacterianos e organização dos grupos já descritos. Segundo o autor, a organização de uma unidade genérica exige a existência de ao menos uma característica morfológica, ecológica ou fisiológica própria (diacrítica) e uma coerência filogenética, somadas ao critério de identidade de sequência menor que 95% com outros gêneros (STACKBRAND; GOEBEL, 1994; WAYNE et al., 1987); instituindo a abordagem polifáfica para a sistemática do filo Cyanobacteria.

Atualmente, a sistemática cianobacteriana considera informações relativas à morfologia, filogenia por genes marcadores e ultra-estrutura (MURRAY et al., 1990). Além desses, a fisiologia e o local e habitat de ocorrência das linhagens (fator ecológico) tem se mostrado taxonomicamente relevante. Recentemente, o gênero *Nodosilinea* foi proposto baseando-se não somente na similaridade de sequência e filogenia do gene 16S RNAr, mas principalmente na capacidade de linhagens desse grupo formarem nódulos quando expostas à condições de baixa luminosidade (PERKERSON et al., 2011). O gênero *Oculatella*, por sua vez, foi descrito a partir de linhagens oriundas, exclusivamente, de ambientes úmidos e de baixa luminosidade, como riunas e catacumbas, que formam um clado robusto filogeneticamente e apresentam uma característica morfológica diacrítica, a ocorrência de pontos avermelhados (pigmento rodopsina) nas células apicais (ZAMMIT; BILLI; ALBERTANO, 2013).

A sequência gênica mais amplamente utilizada para estudos filogenéticos é a do gene 16S DNAr, que codifica para a subunidade menor (16S) do RNA ribossomal (RNAr). Este gene é um marcador adequado, pois é universalmente distribuído; apresenta regiões conservadas e variáveis bem definidas, o que permite tanto a diferenciação por similaridade de sequência, quanto o desenho de iniciadores para sua amplificação; e por ser um RNA funcional, é pouco afetado por mutações e transferência gênica horizontal (DAUBIN; MORAN; OCHMAN, 2003; HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). A maior limitação é a possível ocorrência de mais de uma cópia do gene num mesmo genoma com alguma variação entre sequências (ACINAS et al., 2004; KLAPPENBACH et al., 2001; VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013). Apesar desse último fator e de muitos autores levantarem a questão do

gene 16S DNAr representar apenas uma fração do genoma, estudos demonstram sua aplicabilidade na representação filogenética do filo Cyanobacteria. Em 2013, em um estudo amplo conduzido por Shih e colaboradores, considerando um total de 54 genomas de cianobactérias, sequências concatenadas de 31 proteínas foram utilizadas para a reconstrução filogenética dessas linhagens e o padrão filogenético obtido foi o mesmo quando utilizado apenas o 16S RNAr.

O maior banco de sequências curadas de 16S RNAr é o RDP (*Ribosomal Data Project* – <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), que conta com 7.063 sequências de cianobactérias cultivadas e 15.853 sequências de não cultivadas (versão 10.32, atualização 10, 14 de maio de 2013). Atualmente, existem dois gargalos que dificultam a sintenia entre taxonomia e filogenia molecular cianobacteriana: de um lado, muitos grupos isolados e descritos baseando-se apenas em caracteres morfológicos são mantidos em herbários, e em grande parte foram perdidos, de modo que não se tem nenhuma informação filogenética sobre eles; de outro lado, sabe-se que a maioria das sequências geradas para o filo provém de linhagens não cultivadas, ou seja, sem nenhuma informação morfológica, fisiológica ou ultra-estrutural associada, e ainda, das 15.853 sequências de não cultivadas, mais de 12.000 não se afiliam a nenhum táxon conhecido de Cyanobacteria. Assim, as informações que se encontram em algum desses extremos estão sendo excluídas da reestruturação da sistemática cianobacteriana até que surjam informações ou metodologias complementares.

#### **2.4.3 Bioprospecção de moléculas conhecidas**

As cianobactérias apresentam ampla plasticidade funcional esão capazes de sintetizar moléculas interessantes sob o ponto de vista biotecnológico (BURJA et al., 2001). Atualmente, mais de 800 substâncias bioativas de cianobactérias já foram isoladas e caracterizadas (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996).

Historicamente, esse grupo de micro-organismos vem sendo exaustivamente estudado em corpos d'água devido à sua capacidade de produzir moléculas com efeito tóxico ao homem e outros animais quando consomem ou são expostos à água contaminada. Dentre as toxinas produzidas pelas cianobactérias, a microcistina está entre as mais estudadas, tendo mais de 90 variantes estruturais descritas (PEARSON et al., 2010). A hepatotoxina microcistina é comumente produzida por cianobactérias de água doce dos gêneros

*Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* (WELKER; VON DÖHREN, 2006), entretanto, pode ocorrer também em outros gêneros, como *Nostoc* (GENUÁRIO et al., 2010), *Hapalosiphon* (PRINSEP et al., 1992) e *Phormidium* (IZAGUIRRE; JUNGBLUT; NEILAN, 2007), em sistemas terrestres e também em simbiose (KAASALAINEN et al., 2012). A biossíntese de microcistinas é realizada pela via não-ribossômica e a maioria das enzimas envolvidas na sua biossíntese consiste em complexos multienzimáticos contendo domínios: NRPS (*nonribosomal peptide synthetases* - peptídeo-sintetasas não-ribossomais) ou PKS (*polyketide synthases* - policetídeo sintases).

Além das toxinas, outra classe de moléculas que vem sendo caracterizada em cianobactérias é a dos inibidores de proteases (GESNER-APTER; CARMELI, 2008). Inibidores de proteases são proteínas capazes de formar complexos com proteases, promovendo a inibição ou a diminuição da atividade proteolítica. O interesse nesse tipo de molécula vem, principalmente, da área médica e farmacêutica, devido às possibilidades de aplicação dessas enzimas no tratamento enfermidades, como por exemplo, enfisema pulmonar e alterações do miocárdio (MAL et al., 1999; ZAIDI et al., 1999). Já na dinâmica de interação entre micro-organismos e plantas, proteases e inibidores de proteases são moléculas fundamentais na determinação dos processos de competição e patogenicidade. Muitos inibidores de proteases são sintetizados constitutivamente pelas plantas e podem ser induzidos em resposta ao ataque de um patógeno (HICKS et al., 1997; VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Um grande número de proteases extracelulares é produzido por fungos (PARIS; LAMATTINA, 1999).

As aeruginosinas são uma classe de moléculas produzidas pela via não ribossomal com mais de 27 variantes conhecidas (WELKER; VON DÖHREN, 2006; KAPUŚCIK et al., 2013). A atividade biológica associada com essa classe de cianopeptídeos tem sido avaliada principalmente por meio de estudos *in vitro*, na tentativa de elucidar sua atividades inibitória contra diversas moléculas da classe das serina proteases (ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008). As aeruginosinas atuam no complexo da cascata de coagulação sanguínea, no qual a maioria das moléculas envolvidas é do tipo serina protease. Em estudo conduzido por Radau e colaboradores (2003) foram investigadas novas estruturas capazes de inibir trombina a partir de extratos de cianobactérias, mostrando atividades biológicas interessantes. Esses mesmos autores reportaram a ação de aeruginosinas nos tratamentos de complicações tromboembolíticas, como trombose venosa e arterial, derrame, estreitamento dos vasos sanguíneos, bem como, enfartes recorrentes do miocárdio. Até o momento, o agrupamento gênico *aer* foi sequenciado em três linhagens de *Microcystis* (FRANGEUL et

al., 2008; ISHIDA et al., 2009; KANEKO et al., 2007) e uma *Planktothrix* (ISHIDA et al., 2007). Além disso, o espaço intergênico *aerA-aerB* foi caracterizado pelo nosso grupo para outras linhagens de *Microcystis* e também para *Radiocystis* e *Geitlerinema* (SILVA-STÊNICO et al., 2012). As aeruginosinas já foram detectadas e bem caracterizadas nos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* (WELKER, 2006) e *Nodularia* (FEWER et al., 2013; MAZUR-MARZEC et al., 2013). Além disso, outros gêneros foram descritos como potenciais produtores dessa molécula (SILVA-STÊNICO et al., 2012).

A inibição de serina proteases (tripsina, quimotripsina e elastase) tem sido bastante relatada também para a classe das cianopeptolinhas em diversos estudos (BISTER et al., 2004; CHOI et al., 2008; MATERN et al., 2003; VON ELERT et al., 2005). Cianopeptolinhas também são produzidas pela via não ribossomal e possuem mais de 80 variantes estruturais já são conhecidas (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Os agrupamentos gênicos da biossíntese de cianopeptolina foram, até o presente momento, descritos para *Microcystis* (genes *mcn*; KANEKO et al., 2007; TOOMING-KLUNDERUD et al., 2007), *Anabaena* (genes *apd*; ROUHIAINEN et al., 2000) e *Planktothrix* (genes *oci*; ROUNGE et al., 2007). Além disso, outros gêneros foram descritos como potenciais produtores dessa molécula (SILVA-STÊNICO et al., 2011; 2012).

As microviridinas são outra classe de moléculas com ação de inibidor de protease, porém diferentes das aeruginosinas e cianopeptolinhas, são sintetizadas pela via ribossomal. Até o momento, a produção dessa molécula foi reportada nos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (ZIEMERT et al., 2010). Sua ação como inibidoras de elastase têm sido relatada (MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995) e já se conhecem catorze variantes (GESNER-APTER; CARMELI, 2009; ISHITSUKA et al., 1990; MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995; RESHEF; CARMELI, 2006; ROHRLACK et al., 2003; ZIEMERT et al., 2010).

### **3 HIPÓTESE**

A filosfera da Mata Atlântica abriga uma diversidade de cianobactérias desconhecida, que possui potencial para a fixação biológica do nitrogênio e produção moléculas bioativas.

### **4 OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi isolar linhagens de cianobactérias da filosfera da Mata Atlântica, identificá-las utilizando uma abordagem baseada em análises morfológicas e filogenéticas, e avaliá-las quanto ao seu potencial de produção de algumas moléculas bioativas conhecidas. Ainda, caracterizar filogeneticamente e funcionalmente as linhagens diazotóficas isoladas; e gerar informações acerca da estrutura da comunidade diazotrófica bacteriana nesse ambiente.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Área de estudo e coleta

A coleta foi realizada nos núcleos Picinguaba e Santa Virgínia, do Parque Estadual da Serra do Mar, estado de São Paulo em janeiro de 2010. Folhas de quatro espécies foram coletadas: (1) *Euterpe edulis* (Martius) - Arecaceae (palmeira Juçara), (2) *Guapira opposita* (Vell.) Reitz – Nyctaginaceae, (3) *Garcinia Gardneriana* (Planchon et Triana) Zappi – Clusiaceae e (4) *Merostachys neesii* (Rupr.) – Poaceae (bambu). Os locais amostrados consistem em áreas de 1 ha, subdivididas em 10 sub-parcelas de 100 m<sup>2</sup>, delimitadas pela equipe do projeto “Gradiente Funcional” – Biota/FAPESP nº 03/12595-7.

O núcleo de Picinguaba possui uma área de abrangência de 47.000 ha, totalmente inserido no município de Ubatuba. O clima é bastante úmido e as temperaturas médias variam entre 19,5°C (junho) a 25,9°C (fevereiro). A vegetação do local se caracteriza como floresta ombrófila densa atlântica e fisionomia submontana, e possui um perfil de variação de altitude entre 64 e 89 m acima do nível do mar. O Núcleo Santa Virgínia está localizado no município de São Luiz do Paraitinga (7557ha), Vale do Paraíba, São Paulo, a uma altitude de 880 metros, com clima tropical úmido e temperatura média de 21°C, apresentando altos índices pluviométricos (1800 mm anuais), e predominando a vegetação de floresta ombrófila densa alto-montana (CAMPOS, 2008; ARAÚJO, 2009).

A escolha das espécies vegetais foi realizada de acordo com o índice de valor de importância (IVI), estabelecido no III Relatório do projeto BIOTA FAPESP de Gradiente Funcional (JOLY; MARTINELLI, 2008), o qual considera os parâmetros: número, frequência relativa, densidade relativa e dominância relativa de indivíduos. As espécies *Garcinia Gardneriana*, *Guapira opposita* e *Euterpe edulis* foram selecionadas por apresentarem elevados IVIs, de 6,03, 9,99 e 21,5, respectivamente. Já a espécie *M. neesii* foi selecionada, pois apresenta ampla ocorrência no local.

*Euterpe edulis* (palmeira Juçara) é uma espécie climácica, perenifólia, que chega a atingir até 20 m de altura na idade adulta (LORENZI, 1992). Possui estratégia de regeneração do tipo banco de plântulas, com distribuição espacial agrupado próximo das plantas parentais (FANTINI; RIBEIRO; GURIES, 2000). As folhas são alternas, pinadas, com até 3 m de comprimento e estreitas. *Guapira opposita* é uma espécie arbórea secundária ou clímax perenifólia que atinge até 25 metros de altura. Suas folhas são muito variáveis em tamanho e forma, sendo opostas, pecioladas, oblongas, agudas, 4-17 cm de comprimento, 1,5-5 cm de

largura (REITZ, 1970; ELTINK; TORRES; RAMOS, 2008). Seus frutos são apreciados por aves e insetos, principalmente as formigas (JORDANO, 1993). *Garcinia Gardneriana* também é uma espécie arbórea secundária ou clímax perenifólia, de ramos ascendentes e copa densa, que atinge de 5-10 m de altura; suas folhas são simples, cartáceas, de 6-15 cm de comprimento; seu fruto, o bacupari, é apreciado por diversos animais (BACKS; IRGANG, 2004; LORENZI et al., 2006). *M. neesii* é uma espécie de bambu endêmica do Brasil. São plantas perenes, lignificadas, eretas e arqueadas no ápice, com de colmos até 10 m altura, 1,6-3,2 cm de diâmetro e entrenós com até 30 cm de comprimento. Folhas dos colmos com bainhas tardiamente decíduas lanceoladas (CLAYTON et al., 2014).

Folhas de *E. edulis* foram coletadas em ambos os núcleos, de *G. opposita* e *G. Gardneriana* somente no núcleo Picinguaba e de *M. neesii* em Santa Virgínia. As mesmas espécies vegetais foram utilizadas para outros estudos realizados também dentro do projeto temático “Diversidade Microbiana na Filosfera e Solo da Mata Atlântica” – Biota/FAPESP nº 08/50824-1, coordenado pelo Prof. Dr. Marcio R. Lambais, cujo enfoque foi avaliar a diversidade microbiana e dinâmica de nitrogênio nesse ambiente.

Folhas de oito indivíduos de cada espécie e local foram coletadas em ambiente de sub-bosque (2 a 10 metros de altura), acondicionadas em sacos estéreis e mantidas a 4 °C.

## 5.2 Isolamento das linhagens de Cyanobacteria

As folhas coletadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BG11 sólido e também imersas em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL de volume contendo 200 mL de meio BG11 líquido, ambos com e sem a adição de nitrogênio (ALLEN, 1968). Ciclohexamida ( $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) foi utilizada para inibição do crescimento de organismos eucariotos.

As culturas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, sob iluminação fluorescente, com fotoperíodo de 14h claro: 10h escuro e irradiação 5 - 10  $\mu\text{mol.fótón.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As linhagens isoladas foram obtidas por meio de repicagens sucessivas em meio sólido e avaliações por observação em microscópio óptico (Axioskop 40), equipado com sistema digital de imagem AxioVisionLE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Atualmente os isolados, estão sendo mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade, e fazem parte da coleção de cianobactérias do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA-USP.

### 5.3 Caracterização morfológica dos isolados

Inicialmente, as linhagens foram avaliadas morfologicamente para a determinação taxonômica em nível de ordem (e para as Nostocales em nível de família), seguindo o Sistema de Classificação proposto por Komárek e Anagnostidis (1986; 1989; 1999), revisado por Hoffmann, Komárek e Kastovský (2005) e Komárek (2006; 2010). Realizou-se a morfometria baseada nos diâmetros e comprimentos das células vegetativas. Vinte medições de cada característica foram realizadas, a partir dessas informações foi estimada uma média para cada característica com sua respectiva variação.

### 5.4 Caracterização filogenética dos isolados pelo gene 16S RNAr

#### 5.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada seguindo o protocolo descrito por Fiore et al. (2000), partindo de aproximadamente 3 mL de cultura em meio líquido concentrados por centrifugação. As células concentradas foram, inicialmente, lavadas com água ultrapura esterilizada e posteriormente com 1 mL da solução tampão I (EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 50 mM). O pélete foi então ressuspandido em 200 µL da solução tampão II (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 50 mM) e as células lisadas por choque térmico com resfriamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria a 55 °C. Em seguida adicionou-se Proteinase K (2 µg.mL<sup>-1</sup>), sendo as amostras incubadas por 10 minutos a 55 °C. Após a lise, foram adicionados 600 µL de tampão de extração pré-aquecido a 55 °C (CTAB 3 %, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, Sarkosyl 1 % e β-mercaptoetanol 1 %) e incubou-se as amostras em banho-maria a 55 °C por 30 minutos. Em seguida, 800 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v) foram adicionados aos tubos, os quais foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 7000 × g. Um volume de 500 µL do sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 1000 µL de NaCl 4 M e 50 µL de uma suspensão de sílica (20 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão PBS), seguido da incubação a 55 °C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por 30 segundos a 7000 × 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 a 37 °C, sua reidratação com 30 µL de água ultrapura esterilizada, ressuspensão, incubação em banho-maria a 45 °C durante 10 minutos e nova centrifugação a 7000 × g por 30 segundos. Por fim, o sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e transferido para um novo microtubo esterilizado, e armazenado a - 20 °C.

#### **5.4.2 Amplificação do gene 16S RNAr**

A amplificação parcial do gene 16S RNAr (aproximadamente 1400 pb) foi realizada utilizando o conjunto de iniciadores 27F1 (5'AGAGTTGATCCTGCTCAG 3') e 1494Rc (5'TACGGCTACCTTGTACGAC 3') (NEILAN et al., 1997). Essa amplificação foi feita em reação contendo: tampão para a reação PCR 1X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20-50 ng de DNA e 5 µM de cada iniciador; em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada na seguinte ciclagem térmica: 95 °C/3 min; 30 ciclos 94 °C/10 s, 50 °C/20 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7 min.

Na amplificação contemplando o espaço intergênico (ITS) dos genes 16S e 23S RNAr (16S-23S ITS), utilizou-se o mesmo iniciador direto 27F1, porém com o reverso 23S30R (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT -3') (TATON et al., 2003). A ciclagem ocorreu com desnaturação inicial a 94 °C/5 min, 10 ciclos de 94 °C/45 s, 57 °C/45 s, 68 °C/2 min, 25 ciclos de 92 °C/45 s, 54 °C/45 s, 68 °C/2 min, e extensão final a 68 °C/7 min.

A especificidade das reações foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo o marcador de tamanho e concentração *Low mass DNA ladder* (Invitrogen).

#### **5.4.3 Clonagem dos fragmentos gênicos**

Os fragmentos gênicos amplificados foram ligados em vetor pGEM-T *Easy Vector Systems* (Promega) conforme instruções do fabricante e inseridos em *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes, via transformação por choque térmico.

#### **5.4.4 Seleção de clones**

Uma vez que os iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S RNAr reconhecem esta sequência gênica em todo o domínio Bacteria, e que as cianobactérias isoladas não são axênicas, há necessidade de se selecionar as colônias transformadas que abriguem o inserto referente ao 16S RNAr de cianobactérias e não de bactérias heterotróficas “contaminantes”. Tal seleção foi feita por amplificação de fragmentos menores (aproximadamente 450 pb) do 16S RNAr, utilizando os iniciadores descritos por Nübel e colaboradores (1997) os quais são específicos para regiões conservadas do gene 16S RNAr de cianobactérias. A reação foi realizada nas condições: tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 5 µM do iniciador CYA359F (5' GGGGAATYTTCCGCAATGGG 3'), e da mistura dos iniciadores CYA781R a (5' GACTACTGGGTATCTAACCCCATT 3') e CYA781R b (5' GACTACAGGGTATCTAACCCCTTT 3') e 1 µL da suspensão de células transformadas provenientes de uma colônia obtida após a etapa de transformação, em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada nas condições: 94 °C/2 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 63 °C/1min, 72 °C/1 min, com extensão final a 72 °C/7 min. A especificidade da reação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v).

#### **5.4.5 Extração do DNA plasmidial**

O DNA plasmidial contendo o inserto de interesse foi extraído pelo método de lise alcalina. Colônias de *E. coli* foram inoculadas em 3 mL de meio cultura Luria-Bertani Broth (LB) (25g/L) (Himedia, Mumbai, Índia) contendo ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) e incubadas por 14-16 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm. As células foram concentradas por centrifugação e re-suspendidas em 100 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10mM e glucose 50 mM). Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M; SDS 1 %). As amostras permaneceram em gelo por 10 min, foram centrifugadas a 15000 × g, por 15 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A precipitação foi realizada com a adição de 270 µL de isopropanol e centrifugação a 15.000 × g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 250 µL de etanol 70%. Em seguida o pélete foi seco e

ressuspendido em 30 µL de água ultrapura contendo RNase (1,5 µg.mL<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. O DNA plasmidial foi quantificado por eletroforese em gel contendo o marcador *Low mass DNA ladder* (Invitrogen) e armazenadas a – 20 °C.

#### **5.4.6 Sequenciamento**

A PCR para o sequenciamento foi feita usando-se o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA). Para a reação utilizou-se 1 µL de *BigDye*, tampão de reação 1 X, 200 ng de DNA plasmidial e 5 µM do iniciador, num volume final de 10 µL. Foram utilizados os iniciadores externos: M13F (5'- GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA- 3') e M13R (5' - GAGC GGATAACAATTCACACAGG - 3'); e para cobrir toda a sequência do 16S RNAr, foram utilizados também os internos: 357F (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3'), 357R (5'- CTGCTGCCTCCCGTAGG -3'), 704F (5'- GTAGSGGTGAAATSCGTAGA -3'), 704R (5'- TCTACGSATTCACCSCTAC -3'), 1114F (5'- GCAACGAGCGMRACCC -3') e 1114R (5'- GGGTYKCGCTCGTTGC -3') (LANE, 1991). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 1 min; 35 ciclos de 95 °C/15 s, 50 °C/15 s, 60 °C/2 min.

As amostras foram então precipitadas com a adição de 25 mM de EDTA pH 8 e etanol absoluto em centrifugação refrigerada. O pélete foi então lavado com etanol 70% e seco no escuro à temperatura ambiente por 2 a 10 horas. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di (Applied Biosystems/Life Technologies) e inseridas no sequenciador. O sequenciamento foi realizado em equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technologies), em parcerias com o pesquisador Dr. Itamar S. Melo, da Embrapa Meio Ambiente e o professor Dr. Ricardo D. Coletta da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP).

#### **5.4.7 Processamento das sequências**

As sequências geradas foram montadas e processadas para remoção de bases com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) com o uso do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As sequências foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* (NCBI), utilizando-se

a ferramenta BLASTn (ALTSCHÜL et al., 1990). Nos casos de análise de genes funcionais, foi utilizada também a ferramenta BLASTx.

As sequências geradas contendo o 16S-23S ITS foram analisadas com a ferramenta online RNAmmer 1.2 (LAGESEN et al., 2007) para identificação da região codificadora do gene 16S RNAr; tRNAscanSE (SCHATTNER; BROOKS; LOWE, 2005) para a identificação dos RNAs transportadores (tRNAs); e mFOLD (ZUKER, 2003) para a obtenção das estruturas secundárias das regiões Box B e D1-D1'. As sequências foram também avaliadas quanto à formação de quimeras utilizando o banco de dados *Database Enabled Code for Ideal Probe Hybridization Employing R* (DECIPHER), com a ferramenta “*Find Chimeras*” (WRIGHT et al., 2012).

#### **5.4.8 Análises filogenéticas**

As árvores filogenéticas foram construídas no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Para isso, as sequências obtidas neste estudo e outras, selecionadas no banco de dados públicos, foram alinhadas pela ferramenta Muscle. O algoritmo de distância evolutiva máxima verossimilhança com re-amostragem de 1000 foi aplicado usando o parâmetro Kimura-2.

### **5.5 Caracterização do gene *nifH***

A amplificação parcial do gene *nifH* (325 pb) foi realizada para a investigação de potenciais linhagens diazotróficas. Para tal, foi utilizado o par de iniciadores específicos para cianobactérias descrito por Olson e colaboradores (1998): F (5'CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA 3') e R (5'GCATACATGCCATCATTCAACC 3'), em reação contendo: tampão para a reação 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 50 ng de DNA, 5 µM de cada iniciador e BSA (1µg/mL), em um volume final de 25 µL. A reação ocorreu nas condições: 95 °C/2 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 47 °C/1 min e 72 °C/1 min; e extensão final a 72 °C/7min.

A clonagem, o sequenciamento e a análise das sequências foram conduzidos conforme descrito nos itens 4.4.3, 4.4.5, 4.4.6, 4.4.7 e 4.4.8.

## 5.6 Bioprospecção

As linhagens isoladas foram investigadas quanto ao potencial de produção de algumas moléculas bioativas. Para tal, foram aplicadas duas abordagens: a genética, onde o potencial para produção de determinadas moléculas foi aferido pela detecção de genes associados à sua via biossintética; e química, em ensaios colorimétricos, cromatográficos e por espectrometria de massas.

### 5.6.1 Seleção por PCR

Genes relacionados com a produção dos inibidores de proteases aeruginosina, cianopeptolina, microviridina e da toxina microcistina foram investigados usando iniciadores específicos descritos em literatura.

A busca por linhagens potencialmente produtoras de microcistina foi realizada pela amplificação dos genes relacionados à sua biossíntese, utilizando os conjuntos de conjunto de iniciadores: mcyD-F (5'GATCCGATTGAATTAGAAAAG 3') e mcyD-R (5' GTATTCCCCAAGATTGCC 3'), que amplifica um produto de cerca de 800 pb do gene *mcyD* (codificante de uma policetídeo sintase - PKS); mcyE-F (5' GAAATTGTGTAGAACGGTGC 3') e mcyE-R (5' AATTCTAAAGCCCAAAGACG 3') que amplifica um produto de cerca de 800 pb do gene *mcyE* (codificante de um híbrido PS/PKS); e mcyG-F (5' GAAATTGGTGCGGGAACTGGAG 3') e mcyG-R (5' TTTGAGCAACAATGATACTTGCTG 3'), que amplifica um produto de cerca de 400 pb do gene *mcyG* (codificante de um híbrido PS/PKS). O tamanho esperado dos fragmentos baseou-se em literatura e o controle positivo para as reações foi o DNA da linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777. As condições de amplificação para os três genes foram: tampão para a reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 20 ng de DNA e 5 μM de cada iniciador; em um volume final de 25 μL; com ciclagem de 95 °C/3 min; 30 ciclos 94 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min (FEWER et al., 2007; RANTALA et al., 2004).

A amplificação de genes relacionados com a produção de aeruginosina foi conduzida com o conjunto de iniciadores (aerA: 5'GATAGCACCCAGAACGGAAGC 3' e aerB: 5' CGTTAAACGGATGGTTAGAGC 3' - produto de aproximadamente 1000 pb); e de cianopeptolina com o conjunto de iniciadores (mcnC-F:

5' TAAGGATAATTCTTGAAATTGGGAG            3'            e            mcnC-R:            5'

AATAATCTCTAAATCAACAGC 3' - produto de aproximadamente 600 pb). O tamanho esperado dos fragmentos baseou-se em literatura e o controle positivo para as reações foi o DNA da linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4. A reação foi realizada nas seguintes condições: tampão para a reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 20 ng de DNA e 5 μM de cada iniciador; em um volume final de 25 μL; com ciclagem de 95 °C/2 min; 30 ciclos 94 °C/45 s, 50 °C/45 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min (CADEL-SIX et al., 2008).

Por fim, a seleção de linhagens potenciais produtoras de microviridina foi feita pela amplificação dos genes *mdnA*, que codifica o peptídeo precursor da molécula, *mdnB* e *mdnC*, que codificam ATP-ligases. Foram utilizados os conjuntos de conjunto de iniciadores: *mdnA*-F (5'GAAGGTTGCAATTTGTCCA 3) e *mdnA*-R (5'CGCCAACGGGATTAATTCT 3) que amplifica um produto de cerca de 200 pb, *mdnB*-F (5' TTGGCTGGTTTGAGGATAG 3') e *mdnB*-R (5' CGATCGCATTGGAAATAGGT 3') que amplifica um produto de cerca de 600 pb, e *mdnC*-F (5'TCACTCGAAATTACCAGAGGAA 3') e *mdnC*-R (5'CGGTGTAATCAAGAAAAGTGCT 3) que amplifica um produto de cerca de 300 pb (ZIEMERT et al., 2010). O tamanho esperado dos fragmentos baseou-se em literatura e o controle positivo para as reações foi o DNA da linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4. As condições de amplificação para os três genes foram: tampão para a reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 20 ng de DNA e 5 μM de cada iniciador; em um volume final de 25 μL; com ciclagem de 95 °C/3 min; 30 ciclos 94 °C/20 s, 60 °C/30 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min.

A clonagem, o sequenciamento e a análise das sequências foram feitos conforme descrito nos itens 4.4.3, 4.4.5, 4.4.6, 4.4.7 e 4.4.8, sendo que neste último, as análises foram feitas com as sequências já traduzidas em aminoácidos e utilizando também o método *Neighbor-joining*. Sequências de nucleotídeos traduzidas (aminoácidos) foram utilizadas nas análises dos genes funcionais com o objetivo de se excluir a questão da degeneração do código genético das análises de similaridade e filogenéticas.

## 5.6.2 Ensaios colorimétricos

As linhagens isoladas foram inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BG11 líquido (ALLEN, 1968) e mantidas por 30 dias em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, sob iluminação fluorescente de 14h claro: 10h escuro e irradiação  $20 \mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 5.6.2.1 Determinação de AIA e derivados pelo reagente Salkowski

O método de detecção de ácidos indólicos pelo reagente de Salkowski baseia-se na alteração de coloração das amostras devido à oxidação de compostos indólicos, variando do amarelo (não oxidado) ao vermelho (oxidado), passando por diversos tons róseos. Um volume de 1 mL de sobrenadante foi utilizado para a análise em uma proporção de 1:1 (v:v) com reagente de Salkowski ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2% +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  37%) (SERGEEVA; LIAIMER; BERGMAN, 2002) após incubação por 30 min no escuro. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e as concentrações foram estimadas baseando-se numa curva de diluição seriada de AIA comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) contendo 5 pontos no intervalo de 0 a  $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

### 5.6.2.2 Análise de sideróforo em CAS

O ensaio para a detecção da produção de sideróforos foi realizado com o complexo corante ferro cromoazurol S (CAS), que na presença de sideróforos, tem o íon de ferro sequestrado, deixando-se ser azul e tornando-se amarelo (SILVA-STENICO et al., 2005).

O ensaio foi realizado após preparo da solução (CAS/MM9) a seguir: 60,5 mg de CAS foram dissolvidos em 50 ml de água destilada e misturada com 10 ml de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM em HCl 10 mM). Sob agitação, esta solução foi vagarosamente adicionada a 72,9 mg de HDTMA (“hexadecyltrimethylammonium bromide”) dissolvido em 40 ml de água. Separadamente, foi preparado meio de cultura deficiente em ferro (MM9) de acordo com Payne (1994). O meio foi composto de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0 g  $\text{L}^{-1}$ . Em 100 ml desta solução foram adicionados 1,2 g de Tris e 18 g de ágar, pH 5,6, completado para 1 L e autoclavada. Esta solução foi suplementada com 30 ml de casaminoácido deferrado 10% (m/v) (o ferro contaminante foi removido com 3% de 8-hidroxiquinolina em clorofórmio), 1 ml de  $\text{MgCl}_2$  1 M e 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Estas

soluções foram preparadas e filtradas em filtro Millipore 0,22 µm separadamente. A solução de CAS foi adicionada ao meio MM9. Toda vidraria utilizada neste experimento foi limpa com HCl 6 N para retirada de ferro contaminante.

O ensaio foi realizado com em 1:1 (v/v) do sobrenadante da cultura de cianobactéria e da solução CAS/MM9 incubados no escuro, à temperatura ambiente, por 24h.

### **5.6.3 Espectrometria de Massas**

As análises de cromatografia líquida e espectrometria de massas foram realizadas em parceria com a Dra. Maria Estela Silva Stênico, no Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP sob coordenação do Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, e Dra. Míriam Sanches, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP), Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA), sob coordenação do Prof. Dr. Ernani Pinto.

As culturas de cianobactérias foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, sob iluminação fluorescente de 14h claro: 10h escuro e irradiância  $20 \text{ } \mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  sob agitação de 150 rpm por 21 dias. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação a  $7000 \times g$  por 5 min, lavadas com solução salina (NaCl 0,8%) três vezes e re-inoculadas em frascos de 500 mL contendo 200 ml de meio de cultura BG11 e cultivadas por mais 21 dias. A suspensão celular foi concentrada por centrifugação a  $7000 \times g$  por 5 min e liofilizadas em equipamento modelo SNL216V (Thermo Electron Corporation, USA), operando à temperatura de -52 °C e pressão na câmara de vácuo de 10 mbar.

Em seguida, as células foram rompidas e o conteúdo celular extraído três vezes utilizando-se pérolas de vidro ( $\phi$  3 mm) e agitação vigorosa ou sonicação por 1 min na presença de metanol 70%. Os resíduos celulares foram precipitados por centrifugação a  $7000 \times g$  por 10 min e os sobrenadantes coletados foram evaporados em concentrador. As amostras foram então ressuspendidas em 1 mL de metanol:água (1:1) e analisados por LC-MS/MS (Agilent 1290 *Infinity* LC acoplado a um Agilent 6410/6460 Triplo Quadrupolo LC/MS espetrômetro de massas equipado com uma interface de ionização por eletroespray). Os dados foram adquiridos usando o programa *Agilent MassHunter (WorkStation B.05.00)* e analisados com a ferramenta *MassHunter Qualitative analyses*.

Duas corridas independentes foram realizadas, uma no modo *full scan* e outra no modo *ion scan*. Na primeira, foram monitorados íons m/z na faixa de 100 a 1.700 Da, para se obter um espectro completo de cada amostra, identificando os íons protonados [M+H]<sup>+</sup>. No

segundo, alguns íons do espectro protonado foram submetidos à diferentes energias de colisão na faixa de 30 a 70 eV para se obter informações sobre a estrutura da molécula.

As condições para ESI no modo positivo foram as seguintes: dessolvatação assistida por gás (nitrogênio) aquecido a 80 - 300 °C, capilar com potencial de 3 - 3,5 kV e a voltagem do cone a 21 - 500 V.

Os espectros obtidos foram comparados com os existentes na biblioteca virtual de espectros do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP e literatura, visando identificar cianopeptídeos com estruturas já conhecidas.

### **5.7 Análise da FBN pela linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362**

A análise de redução do acetileno foi realizada para a determinação da FBN na linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362. Essa linhagem foi selecionada devido ao fato de ter um crescimento rápido, em comparação com as demais heterocitadas isoladas nesse estudo, e por formar colônias não tão densamente agregadas, o que permite a homogeneização dos inóculos iniciais.

Para a obtenção de maior quantidade de células, inicialmente, a linhagem foi inoculada em cinco frascos do tipo Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio BG11<sub>0</sub> (sem adição de nitrogênio) (ALLEN, 1968), e mantida por 15 dias em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, sob iluminação fluorescente, com fotoperíodo de 14h claro: 10h escuro e irradiação 5 - 10 µmol.fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, sob agitação de 150 rpm. Após esse período, as células foram concentradas por centrifugação e inoculadas em um único frasco de 250 mL contendo 100 mL de meio BG11<sub>0</sub> e mantidas nas mesmas condições por mais 15 dias. Em seguida, as células foram novamente concentradas e homogeneizadas por fluxo de seringa para a montagem do experimento.

A linhagem foi inoculada em frascos de 50 mL contendo 20 mL de meio BG11<sub>0</sub> e mantidas nas mesmas condições acima. O experimento foi organizado em quadruplicata para cada um dos 7 pontos amostrados, totalizando 28 inóculos, acrescidos dos controles negativos (frascos contendo meio de cultura, mas não inoculados com a linhagem). Desses 4 inóculos, 1 foi utilizado para as análises microscópicas e os outros três para o ensaio de redução do acetileno. As estimativas de FBN foram geradas para sete pontos, referentes aos inóculos com 24, 72, 120, 192, 240, 288 e 360 horas após o início do experimento, totalizando 15 dias de monitoramento da FBN.

### 5.7.1 Ensaio de redução do acetileno

A atividade da nitrogenase foi determinada pela técnica de redução de acetileno (ARA), que estima indiretamente a atividade da enzima nitrogenase pela reação de redução do acetileno ( $C_2H_2$ ) para etileno ( $C_2H_4$ ) (SCHINNERN et al., 1995). Os inóculos foram incubados em atmosfera fechada contendo 10% de acetileno, sendo os experimentos realizados em triplicata. Posteriormente à adição do acetileno, os inóculos foram mantidos por cinco horas nas mesmas condições acima citadas, até a leitura em cromatógrafo a gás Thermo Scientific, equipado com um detector de ionização por chama (250 °C) e uma coluna N Poropak (120 °C; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.) no Laboratório de Microbiologia Molecular, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” Universidade de São Paulo, coordenado pelo Professor Márcio R. Lambais. As aferições basearam-se em uma curva padrão pré construída utilizando etileno.

Após a leitura em cromatógrafo, as células de cada inóculo foram filtradas em membranas de éster de celulose de 0,22 µM de poro (Millipore, Barueri, São Paulo, BR) já secas em estufa a 80°C por 48 horas e pré-pesadas. A massa úmida foi estimada por pesagem. O material foi então seco nas mesmas condições por, em média, 72 horas e novamente pesado em balança analítica com precisão de três casas decimais até a verificação de peso constante para a determinação da massa seca.

As taxas de redução de acetileno foram calculadas para cada um dos inóculos em nanomoles de acetileno reduzido por grama de massa seca, por hora de incubação, representadas pela equação (1):

$$\text{nmol etileno} \cdot g^{-1} \text{ ms}^{-1} = \frac{(A-C) \cdot V \cdot P \cdot 100}{MA \cdot ml \cdot R \cdot T \cdot t \cdot \% \text{ ms}} \quad (1)$$

Onde A= quantidade de etileno obtido na amostra após incubação (ppm). C = quantidade de etileno obtido em frascos contendo apenas o meio de cultura (branco). V = volume livre nos frascos de incubação. P = pressão de ar sob condições padrão (101300 Pa). MA = massa inicial da amostra (g). ml = volume injetado no cromatógrafo. R = constante do gás ( $8314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ). T = temperatura de incubação (K). t = tempo de incubação (h). % ms = (massa seca/massa úmida).

A transformação para quantidade (ng) de N fixado foi feita considerando-se da relação teórica 3:1 (HARDY; BURNS; HOLSTEN, 1968), indicando a fixação de um mol de  $NH_3$ , para cada 3 mol de etileno formado. Representada pela equação (2):

$$N_2 \text{ fixado} = \frac{\text{nmol etileno} \cdot g^{-1} \text{ ms} \cdot h^{-1}}{3} \times 28 \quad (2)$$

Onde: 28 é a massa molecular do N<sub>2</sub> e 3 o fator de conversão de mol para grama.

Para acessar a comunidade diazotrófica da filosfera, foi realizado o pirosequenciamento do gene *nifH* das amostras coletadas no núcleo Santa Virgínia para as espécies *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii*. Essas espécies foram selecionadas, pois um estudo prévio (GÓMEZ, 2012) demonstrou que a fixação biológica do nitrogênio na filosfera é maior em *M. neesii*, seguida por *G. opposita* e *E. edulis*; de modo que informações acerca da estrutura da comunidade diazotrófica poderiam auxiliar no entendimento das causas da variação na FBN observada nessas espécies e local.

### 5.8.1 Extração de DNA

Um total de cinco indivíduos de cada espécie de planta (*E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii*) do Núcleo Santa Virgínia foi utilizado nesta análise. Três folhas de cada indivíduo foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de água ultra-pura e 15 g pérolas de vidro de 3 mm esterilizados. Em seguida, estas amostras foram submetidas à agitação (230 rpm) à 20°C por 1 h. Após este período as folhas foram descartadas e o volume líquido foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados por 20 min a 7000 × g à 20°C. O sobrenadante foi descartado e o pélete formado foi armazenado a -20 °C. O DNA total foi extraído com o kit MoBio Powersoil TM DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Inicialmente, foi adicionado ao pélete microesferas e solução tampão. Em seguida, 60 µL da solução de lise C1 foram adicionados ao tubo, que foi aquecido por 5 min a 60 °C e resfriado a 4 °C, por três vezes consecutivas. Então, o tubo contendo a mistura foi agitado vigorosamente por 10 min. Após centrifugação a 10.000 × g por 30s, 450 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo novo e 250 µL da solução C2, foi adicionado visando separar os ácidos nucléicos dos demais componentes celulares. A mistura foi incubada por 5 min a 4°C, sendo novamente centrifugada a 10.000 × g por 1 min. O sobrenadante (600 µL) foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 200 µL da solução C3, que

tem a função de precipitar carboidratos, lipídeos e proteínas. Após homogeneização por agitação, a mistura foi incubada novamente a 4 °C por 5 min. Decorrido este período, centrifugou-se a amostra por 1 min a 10.000 × g, e transferiu-se 750 µL do sobrenadante a um microtubo novo, sendo adicionados 1200 µL da solução C4, responsável pela ionização necessária para ligar o DNA à coluna de purificação. Esta coluna foi acoplada a um microtubo de 2 mL e adicionou-se 675 µL da mistura contendo o DNA. Após a centrifugação por 1 min a 10.000 × g, a fração eluída foi descartada e o procedimento repetido até que todo o volume tivesse passado pela coluna. O DNA aderido à coluna foi lavado com 500 µL da solução C5, seguindo centrifugação a 10.000 × g por 30 s. Para garantir que a coluna estivesse completamente seca, a solução de lavagem foi descartada e o procedimento de centrifugação foi repetido por mais 1 min. a 10.000 × g. A coluna foi então transferida para um microtubo novo e o DNA foi eluído com 100 µL em solução tampão C6 e armazenado à -20 °C. A qualidade do DNA extraído foi aferida em gel de agarose 1% (m/v).

### **5.8.2 Amplificação e sequenciamento**

Foram amplificadas 15 amostras, provenientes de cinco diferentes indivíduos de cada espécie de planta. A reação de amplificação foi realizada em “*PCR nested*” com os conjuntos de iniciadores PolF (5'-TGCAYCCSAARGCBGACTC-3') e PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001) na primeira reação; e RoeschF (5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG-3') e RoeschR (5'-ACGATGTAGATTCCCTGGGCCTTGT-3') (ROESCH et al., 2006) na segunda reação. A primeira reação foi realizada com 50 ng DNA, 0.20mM dNTPs, solução tampão 1x, 0,03mg BSA (20mg/ml), 0,5µM de cada iniciador, 2mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em volume final de 50 µL. A ciclagem foi feita com desnaturação inicial a 95 °C/5 min, 35 ciclos de 94 °C/1 min, 48 °C/1 min e 72 °C/1 min; extensão final a 72°C/10 min. A segunda reação foi feita a partir de 50 ng do produto de PCR da primeira reação, 0,20mM dNTPs, solução tampão 1x, 0,03mg BSA (20mg/ml), 0,5µM de cada iniciador, 2mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em volume final de 50 µL. Nas condições: 95 °C/5 min, 20 ciclos de 94 °C/45s, 50 °C/45s e 72 °C/45s min; extensão final a 72 °C/10 min; gerando um produto amplificado de cerca de 400 pb. A especificidade da amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e o produto gerado quantificado por comparação com o marcador de massa e tamanho Low

*mass DNA lader* (Invitrogen). Para posterior identificação da origem das sequências, o iniciador direto da segunda reação recebeu uma etiqueta de identificação única, composta por 6 a 8 bases, para cada uma das 15 amostras; as sequências já otimizadas de iniciadores acoplados às etiquetas foram gentilmente cedidas pela Dra. Michele C. P. Silva da University of Groningen, Holanda (para detalhes ver Pereira e Silva et al., 2013).

Em seguida, quantidades iguais do produto amplificado de cada amostra foram misturadas e purificadas com o *kit PCR clean-up* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. As amostras foram então mantidas a -20 °C e o sequenciamento realizado em sistema de segunda geração *454 GS FLX Titanium* (Roche).

### 5.8.3 Análise das sequências

A análise dos dados obtidos por pirosequenciamento foi realizada com o programa QIIME (CAPORASO et al., 2010). As sequências foram inicialmente filtradas utilizando os seguintes parâmetros: índice de qualidade > 25, tamanho de sequência > 300 e < 500 nt, máximo homopolímero de 6 e máximo número de bases ambíguas de 0. Após a filtragem, as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) ao nível de identidade de nucleotídeo de 80%, utilizando UCLUST (EDGAR, 2010). UTOs contendo menos que cinco sequências foram removidas das análises. As UTOs geradas foram traduzidas para aminoácidos usando a ferramenta *Framebot* no *pipeline* do banco de dados Fungene (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/>) para a identificação de possíveis erros de sequência oriundos de inserções ou deleções de bases. A tabela de distribuição de UTOs por tratamento foi rarefeita à 5000 sequências por amostra (o menor número em uma amostra), de modo a minimizar efeitos de amostragem nas análises posteriores. A plataforma QIIME também foi utilizada para gerar índices de α-diversidade (cobertura amostral, índices de riqueza de espécies - ChaoI, e diversidade – Shannon e Simpson) e β-diversidade, utilizando distâncias obtidas por meio da matriz de Bray-Curtis.

O índice Chao 1 usou o número de UTOs formadas a partir de uma ou duas sequências para estimar as “espécies” ausentes (CHAO, 1984). O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que “espécie” pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa (MÖHLENHOFF et al., 2001). O índice de Simpson exprime, basicamente, a abundância das UTOs mais comuns. É um

índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma “espécie”. Apresenta valores de 0 a 1 e, valores iguais ou próximos a zero representam alta diversidade e próximos a 1 baixa diversidade (SIMPSON, 1949). Enquanto o índice de Simpson considera a abundância das espécies mais comuns, o de Shannon é mais influenciado pela riqueza de espécies (MAGURRAN, 1988). Os valores do índice de riqueza foram comparados pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ) no programa SASM - Agri (CANTERI et al., 2001).

A matriz de similaridade de Bray-Curtis foi utilizada também para gerar o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS). Os valores de “stress” obtidos na análise NMDS relacionam-se com a confiabilidade da interpretação dos resultados, sendo que valores inferiores a 0,1 mostram que a configuração das amostras no espaço de ordenação possui baixa probabilidade de má interpretação (TER BRAAK; SMILAUER, 2002). Para a afiliação taxonômica, uma sequência representativa de cada UTO foi comparada com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta BlastX.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização das linhagens isoladas

Um total de 40 linhagens de cianobactérias foi isolado em culturas ciano-específicas, a partir de folhas de espécies de plantas coletadas no Parque Estadual da Serra do Mar, sendo 16 de *E. edulis*, dez de *G. gardneriana*, sete de *G. opposita* e sete de *M. neesii* (Tabela 2). Dos 40 isolados, três são unicelulares e pertencem à ordem Chroococcales; 13 à Pseudanabaenales e 24 são membros da ordem Nostocales (famílias Nostocaceae, Scytonemataceae e Microchaetaceae). A alta ocorrência de linhagens de Nostocales pode ser explicada pela capacidade de diversos micro-organismos dessa ordem diferenciarem estruturas de resistência denominados acinetos, que germinam assim que encontram condições favoráveis, tais como as proporcionadas pelos procedimentos de isolamento.

Essas mesmas espécies de planta já haviam sido exploradas por abordagens independentes de cultivo em estudo conduzido por Gonçalves (2011). Nesse trabalho, a autora mostrou que a maioria das UTOs geradas correspondiam à cianobactérias da ordem Synechococcales e Nostocales, e não encontrou UTOs associadas à ordem Gloeobacterales. Comparações por similaridade de sequência entre os dados gerados nesse estudo e os gerados por Gonçalves (2011) mostraram que o isolamento pode favorecer o estabelecimento de alguns grupos não representados nas análises independentes de cultivo.

Sequências quase completas do gene 16S rRNA (aproximadamente 1400 pb), obtidas para cada uma das linhagens (Apêndice A), foram analisadas quanto a similaridade com sequências depositadas no GenBank (NCBI) (Tabela 3). Sequências com alta similaridade foram selecionadas, assim como outras sequências provenientes de grupos taxonomicamente associados para a montagem da árvore filogenética. A robustez dos alinhamentos foi conferida pelo tamanho dos alinhamentos gerados, de 1457 nt para reconstrução filogenética das unicelulares, de 1736 nt para as homocitadas, 1432 nt para as Nostocaceae e 1475 nt para as demais heterocitadas (ordem Nostocales).

Informações sobre o ambiente em questão, dados das avaliações morfológicas preliminares, similaridade de sequências e filogenia do gene 16S rRNA foram considerados para o posicionamento taxonômico das linhagens isoladas.

**Tabela 2 - Origem, identificação e aspectos morfológicos das linhagens isoladas**

Ordem	Família	Linhagem	<sup>1</sup> Origem	C ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ dp	L ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ dp	Cor
CHROOCOCCALES	Xenococcaceae	CENA353	<i>Mn</i> -SV	-	-	Verde
		CENA367	<i>Ee</i> -SV	-	-	Verde
	Hydrococcaceae	CENA351	<i>Mn</i> -SV	-	-	Verde
	PSEUDANABAENALES	CENA350	<i>Mn</i> - SV	1,6 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,1	Verde
		CENA355	<i>Mn</i> - SV	2,3 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,5	Marrom
		CENA359	<i>Gg</i> -Pi	2,2 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA364	<i>Gg</i> - Pi	2,2 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,4	Verde
		CENA370	<i>Ee</i> - SV	2,8 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,1	Verde
		CENA372	<i>Ee</i> - Pi	2,2 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA374	<i>Ee</i> - Pi	2,2 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,2	Marrom
		CENA375	<i>Ee</i> - Pi	1,9 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	Verde
		CENA377	<i>Ee</i> - SV	1,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA378	<i>Ee</i> - Pi	2,4 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,3	Marrom
NOSTOCALES	Microchaetaceae	CENA384	<i>Go</i> - Pi	2,3 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,2	Verde
		CENA385	<i>Go</i> - Pi	2,2 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA387	<i>Go</i> - Pi	2,3 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,7	Verde
		CENA354	<i>Mn</i> - SV	3,6 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 1,0	Verde
		CENA352	<i>Mn</i> - SV	4,0 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,2	Marrom
		CENA356	<i>Mn</i> - SV	3,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,6	Verde
		CENA357	<i>Gg</i> - Pi	2,5 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4	Marrom
		CENA358	<i>Gg</i> - Pi	4,0 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,3	Marrom
		CENA362	<i>Gg</i> - Pi	4,0 $\pm$ 0,7	3,9 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA363	<i>Gg</i> - Pi	4,3 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,3	Verde
Nostocaceae	Nostocaceae	CENA365	<i>Gg</i> - Pi	4,0 $\pm$ 0,7	3,9 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA368	<i>Ee</i> - SV	2,4 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	Marrom
		CENA369	<i>Ee</i> - Pi	3,9 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,3	Marrom
		CENA371	<i>Ee</i> - SV	3,6 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,3	Verde
		CENA373	<i>Ee</i> - SV	2,5 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,3	Marrom
		CENA376	<i>Ee</i> - Pi	4,4 $\pm$ 0,6	5,5 $\pm$ 0,2	Verde
		CENA379	<i>Ee</i> - SV	2,9 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,3	Marrom
		CENA380	<i>Ee</i> - SV	3,1 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,2	Verde
		CENA383	<i>Go</i> - Pi	3,5 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,7	Verde
		CENA386	<i>Go</i> - Pi	3,1 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,5	Verde
Scytonemataceae	Scytonemataceae	CENA388	<i>Go</i> - Pi	2,6 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,2	Marrom
		CENA389	<i>Go</i> - Pi	3,2 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 0,3	Marrom
		<sup>2</sup> CENA360	<i>Gg</i> - Pi	14,5 $\pm$ 0,6	10,7 $\pm$ 3,9	Marrom
		<sup>2</sup> CENA361	<i>Gg</i> - Pi	14,2 $\pm$ 1,8	11,0 $\pm$ 2,4	Marrom
		<sup>2</sup> CENA366	<i>Gg</i> - Pi	7,6 $\pm$ 2,2	18,8 $\pm$ 2,6	Verde
		<sup>2</sup> CENA381	<i>Ee</i> - Pi	7,3 $\pm$ 2,6	15,3 $\pm$ 1,0	Marrom
		<sup>2</sup> CENA382	<i>Ee</i> - Pi	10,2 $\pm$ 1,9	13,8 $\pm$ 1,3	Marrom

<sup>1</sup> Indica a espécie de planta e núcleo da planta de origem. *Ee* = *E. edulis*; *Mn* = *M. neesii*; *Gg* = *G. gardneriana*; *Go* = *G. opposita*. Pi = Picinguaba; SV = Santa Virgínia. C = comprimento e L = largura das células vegetativas; dp = desvio padrão; <sup>2</sup>Predominância de células vegetativas quadráticas a alongadas na base e subquadráticas nas extremidades dos tricomas.

**Tabela 3** - Análise de identidade entre as sequências de 16S RNAr geradas nesse estudo com as depositadas no GenBank (NCBI)

Linhagem	T (nt)	*Sequências com maior identidade e cobertura (Blast)	C (%)	I (%)
CENA350	1415	<i>Leptolyngbya</i> sp. 1T12c (FR798935)	100	95,7
		<i>Leptolyngbya</i> sp. VP3-07 (FR798933)	100	94,9
CENA351	1416	<i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (DQ293994)	100	99,2
		<i>Pleurocapsa minor</i> (AJ344564)	100	97,6
CENA352	1414	<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/15 (HE975023)	100	99,2
		<i>Nostoc punctiforme</i> SAG 60.79 (GQ287652)	100	97,9
CENA353	1417	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203 (CP003597)	100	99,0
		<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7431 (AB074506)	100	98,9
CENA354	1416	<i>Tolypothrix distorta</i> SAG 93.79 (GQ287651)	100	97,6
		<i>Coleodesmium</i> sp. ANT.L52B.5 (AY493596)	100	97,5
CENA355	1414	<i>Cf. Leptolyngbya</i> sp. Greenland_10 (DQ431005)	100	95,9
		<i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	100	94,6
CENA356	1413	<i>Nostoc</i> sp. 'Leptogium gelatinosum cyanobiont' (DQ185232)	100	98,7
		<i>Nostoc</i> sp. 'Pannaria fulvescens cyanobiont' (EF174231)	100	98,6
CENA357	1414	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)	100	97,7
		<i>Nostoc</i> sp. 1b-05 (FR798942)	100	97,4
CENA358	1413	<i>Nostoc calcicola</i> TH2S22 (AM711529)	100	97,8
		<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-088'(DQ185208)	100	97,7
CENA359	1411	<i>Leptolyngbya</i> sp. Greenland_7 (DQ431002)	100	93,4
		<i>Phormidium</i> sp. SAG 37.90 (EF654082)	99	92,5
CENA360	1414	<i>Brasilonema octagenarum</i> HA4186-MV1 (HQ847562)	100	99,7
		<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1 (EF150855)	100	99,7
CENA361	1415	<i>Brasilonema octagenarum</i> HA4186-MV1 (HQ847562)	100	99,4
		<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1 (EF150855)	100	99,4
CENA362	1413	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509)	100	99,0
		<i>Nostoc</i> sp. PCC 7906 (AB325908)	100	98,9
CENA363	1413	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509)	100	99,0
		<i>Nostoc</i> sp. PCC 7906 (AB325908)	100	98,9
CENA364	1416	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA103 (EF088339)	100	95,6
		<i>Leptolyngbya</i> sp. 1T12c (FR798935)	100	95,2
CENA365	1413	<i>Desmonostoc</i> sp. 8964:3 (AM711541)	100	98,4
		<i>Desmonostoc</i> sp. Cc2 (AM711532)	100	98,3
CENA366	1415	<i>Brasilonema angustatum</i> HA4187-MV1 (HQ847566)	100	99,2
		<i>Brasilonema octogenarum</i> HA4186-MV1 (HQ847562)	100	98,7
CENA367	1415	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203 (CP003597)	100	98,8
		<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7431(AB074506)	100	98,7
CENA368	1414	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)	100	97,7
		<i>Nostoc</i> sp. 1b-05 (FR798942)	100	97,4
CENA369	1412	<i>Nostoc calcicola</i> TH2S22 (AM711529)	100	97,7
		<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-088'(DQ185208)	100	97,6
CENA370	1411	<i>Leptolyngbya</i> sp. LLi18 (DQ786166)	100	98,1
		<i>Leptolyngbya</i> sp. (X84809)	100	97,4
CENA371	1411	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509)	100	98,5
		<i>Desmonostoc</i> sp. 8964:3 (AM711541)	100	98,5

Continua

<b>Linhagem</b>	<b>T (nt)</b>	<b>*Sequências com maior identidade e cobertura (Blast)</b>	<i>Continuação</i>	
			<b>C (%)</b>	<b>I (%)</b>
CENA372	1411	<i>Phormidium</i> sp. SAG 37.90 (EF654082) <i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	99 100	98,5 98,1
CENA373	1414	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207) <i>Nostoc</i> sp. 1b-05 (FR798942)	100 100	97,8 97,5
CENA374	1418	Cf. <i>Leptolyngbya</i> sp. Greenland_10 (DQ431005) <i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	100 100	95,1 93,9
CENA375	1412	<i>Phormidium</i> sp. SAG 37.90 (EF654082) <i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	99 100	98,6 97,8
CENA376	1413	<i>Nostoc</i> sp. 8964:3 (AM711541) <i>Nostoc linckia</i> var. <i>arvense</i> IAM M-30 (AB325907)	100 100	97,6 97,5
CENA377	1418	<i>Leptolyngbya foveolarum</i> VP1-08 (FR798945) <i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104 (EF088333)	100 100	96,4 96,4
CENA378	1414	Cf. <i>Leptolyngbya</i> sp. Greenland_10 (DQ431005) <i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	100 100	96,0 94,7
CENA379	1414	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207) <i>Nostoc</i> sp. 1b-05 (FR798942)	100 100	97,8 97,5
CENA380	1412	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509) <i>Desmonostoc</i> sp. 8964:3 (AM711541)	100 100	98,6 98,6
CENA381	1415	<i>Brasilonema octagenarum</i> HA4186-MV1 (HQ847562) <i>Brasilonema octogenarum</i> UFV-OR1 (EF150855)	100 100	99,5 99,5
CENA382	1415	<i>Brasilonema octogenarum</i> HA4186-MV1 (HQ847562) <i>Brasilonema octogenarum</i> UFV-OR1 (EF150855)	100 100	99,8 99,5
CENA383	1413	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509) <i>Nostoc</i> sp. PCC 7906 (AB325908)	100 100	98,9 98,9
CENA384	1412	<i>Leptolyngbya</i> sp. Greenland_7 (DQ431002) <i>Leptolyngbya</i> sp. CENA103 (EF088339)	100 100	94,6 93,9
CENA385	1411	<i>Leptolyngbya</i> sp. Greenland_7 (DQ431002) <i>Leptolyngbya</i> sp. CENA103 (EF088339)	100 100	93,1 92,5
CENA386	1411	<i>Desmonostoc muscorum</i> CCAP 1453/22 (HF678509) <i>Desmonostoc</i> sp. 8964:3 (AM711541)	100 100	98,5 98,5
CENA387	1412	<i>Phormidium</i> sp. SAG 37.90 (EF654082) <i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.L53B.2 (AY493576)	99 100	98,6 98,3
CENA388	1413	<i>Nostoc calcicola</i> TH2S22 (AM711529) <i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-088'(DQ185208)	100 100	97,4 97,4
CENA389	1413	<i>Nostoc calcicola</i> TH2S22 (AM711529) <i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-088'(DQ185208)	100 100	97,6 97,6

T = tamanho do fragmento sequenciado; \* desconsiderando as sequências de não cultivadas.

### 6.1.1 Linhagens unicelulares

As linhagens CENA353 e CENA367 foram identificadas como representantes do gênero *Chroococcidiopsis*. Organismos desse gênero apresentam células organizadas em colônias esféricas, semi-esféricas e irregulares envoltas por baínha; ou solitárias; reprodução

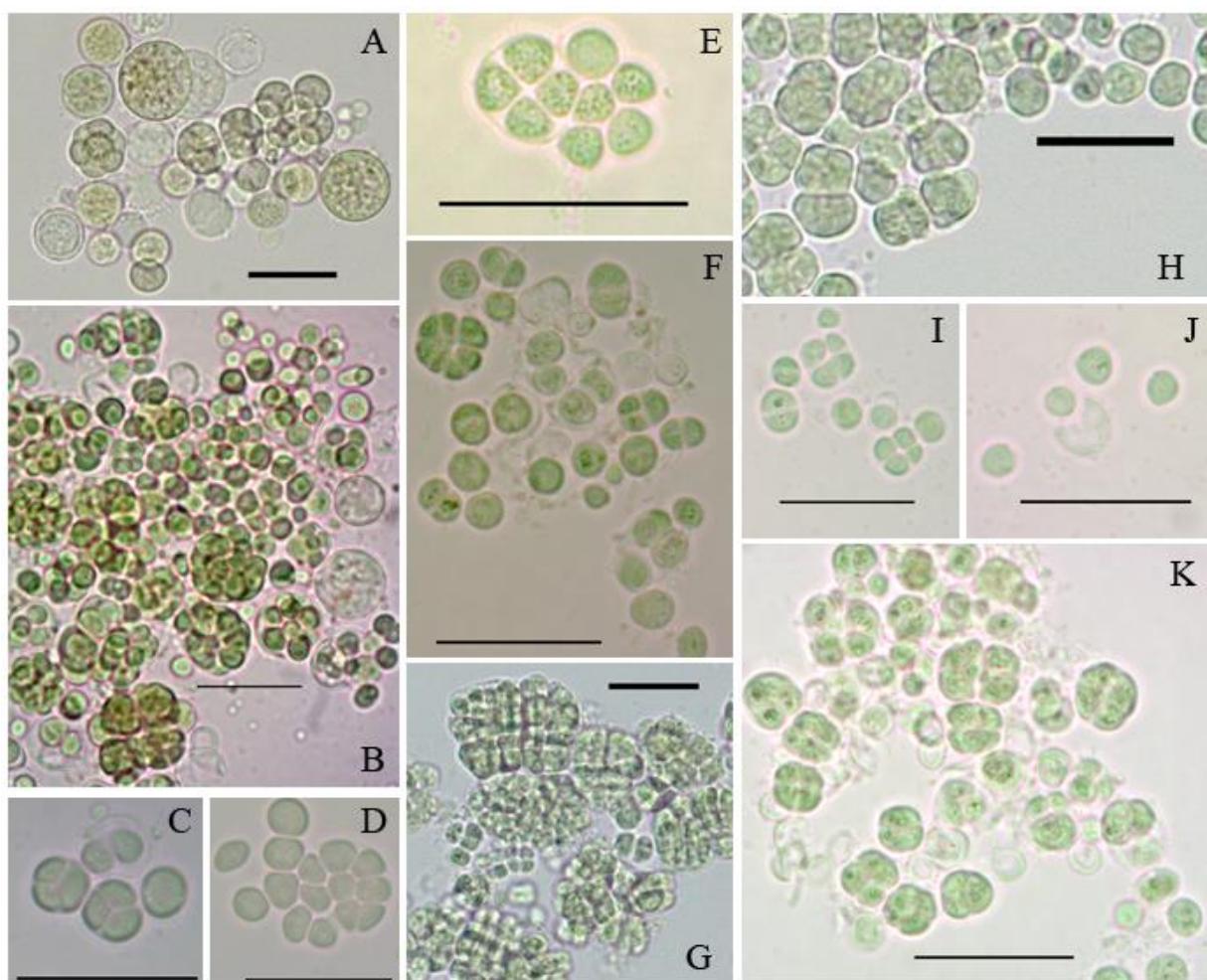
por fissão múltipla e formação de baeóцитos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). É um grupo extremofílico, cuja ocorrência já foi reportada em ambientes com temperaturas altas e baixas e alta salinidade (COCKELL et al., 2004; DOR; CARL; BALDINGER, 1991; POINTING et al., 2009; SCHLESINGER et al., 2003; WARREN-RHODES et al., 2006). Algumas linhagens são também resistentes à dessecação e à radiação (BILLI et al., 2000). É um grupo muito antigo do ponto de vista evolutivo, cuja distribuição global não é fruto de dispersão recente, uma vez que as populações atuais não têm compartilhado um ancestral comum desde antes da formação dos continentes modernos (BAHL et al., 2011). A espécie tipo do gênero é *C. thermalis*.

As duas linhagens isoladas apresentaram as características morfológicas referentes ao gênero (Figura 1) e sequências de 16S RNAr com mais de 98% de identidade com as sequências de *C. thermalis* PCC 7203 (CP003597) e *C. thermalis* PCC 7431(AB074506) (Tabela 3). Na árvore filogenética, observou-se que as sequências das linhagens isoladas neste trabalho agruparam-se com alto valor de reamostragem com outras representantes do mesmo gênero (Figura 2). Esse gênero tem nas cianobactérias heterocitadas seus parentes evolutivamente mais próximos (FEWER, 2002), o que explica sua distribuição num clado divergente dos outros grupos de unicelulares na reconstrução filogenética. Além desses fatores, as linhagens *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 e *Chroococcidiopsis* sp. CENA367, assim como outras linhagens do gênero, provêm de um ambiente extremo, a filosfera. No Brasil, o gênero *Chroococcidiopsis* já havia sido encontrado no solo de manguezal (BRANCO et al., 1996) e reportado em trabalhos independentes de cultivo na filosfera da Mata Atlântica (BERDUGO, 2012; GONÇALVES, 2011).

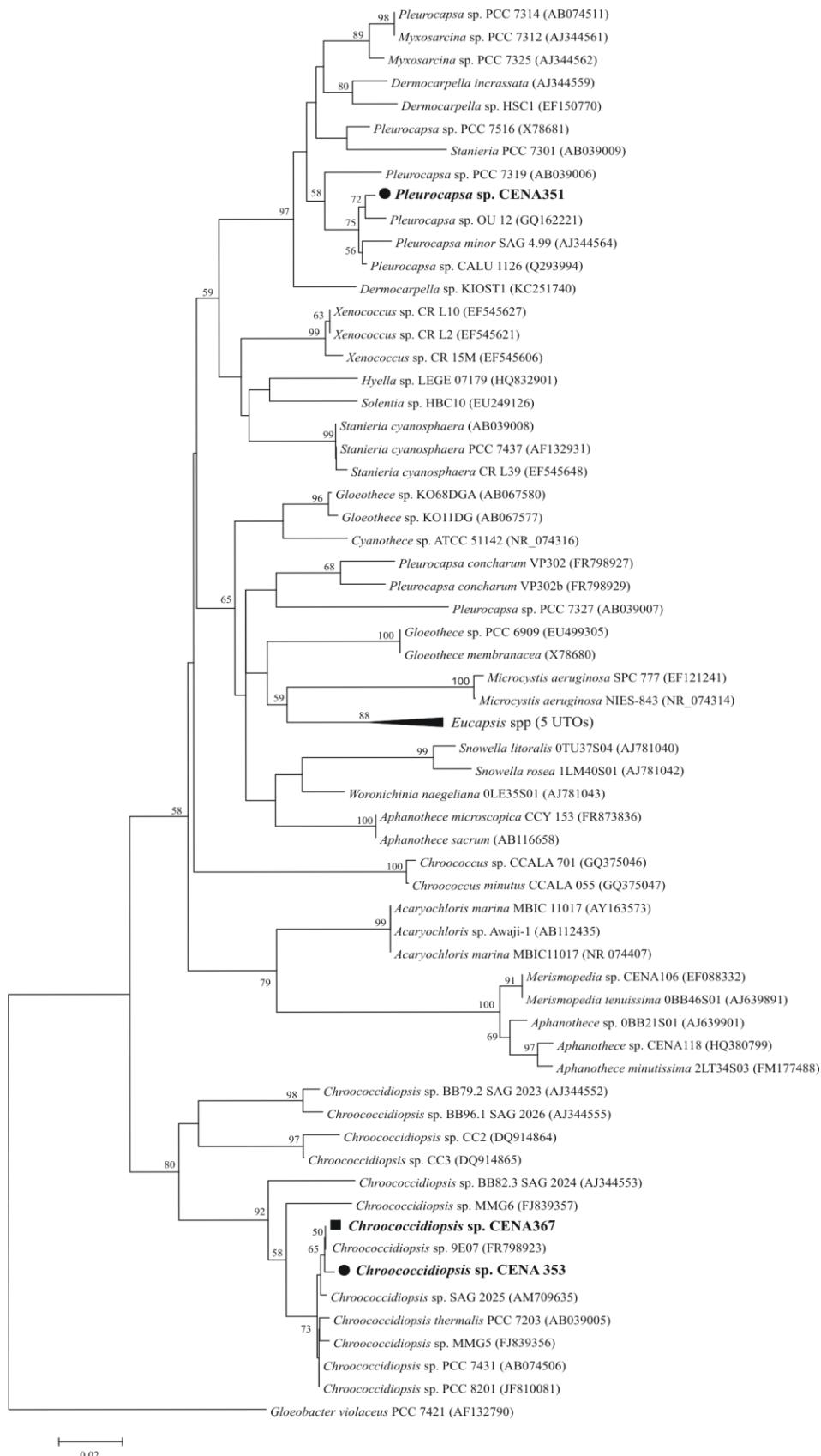
A linhagem CENA351 foi identificada como *Pleurocapsa* sp. Morfologicamente, esse gênero comprehende organismos unicelulares, capazes de formar pseudotalos e baeóцитos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), estrutura que consiste em várias células filhas originadas por fissão múltipla e envoltas em uma firme baínha (WATERBURY; STANIER, 1978). A espécie tipo do gênero é *P. fuliginosa*, e não possui sequências de 16S RNAr disponíveis. A sequência do 16S RNAr de CENA351 apresentou 99,2% de identidade com *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 (DQ293994) e 97,6% com *Pleurocapsa minor* (AJ344564).

Na árvore filogenética (Figura 2) se observa que a sequência da linhagem *Pleurocapsa* sp. CENA351 agrupa-se com outras do mesmo gênero (bootstrap de 75%). Entretanto, outras sequências de linhagens identificadas como *Pleurocapsa*, *Myxosarcina*, *Dermocarpella*, *Stanieria* estão proximamente relacionadas e sem qualquer padrão de agrupamento. Alguns fatores são críticos para o direcionamento da reconstrução filogenética e da taxonomia desses

gêneros, são eles: (1) a escassez de informação, uma vez que não se têm disponíveis estudos filogenéticos e nem se tem um consenso sobre quais são as linhagens referência para esses gêneros; (2) as características morfológicas das linhagens desses gêneros são muito similares, tornando comum a ocorrência de erros da identificação; (3) as características morfológicas diacríticas variam imensamente entre material da natureza e isolado, entre linhagens mantidas em meios de cultura com diferentes composições e estados, e também ao longo do tempo de cultivo. Assim, são necessários esforços no sentido de se agregar informações e revisar sua taxonomia buscando coerência e maior consenso. Nesse sentido, a avaliação genética, seja por análises filogenéticas ou genômicas, acoplada a considerações sobre a origem e ocorrência dessas linhagens, análises fisiológicas e ultraestruturais são ferramentas interessantes.



**Figura 1** - Fotomicrografias das linhagens unicelulares isoladas nesse estudo, *Pleurocapsa* sp. CENA351 (A-D), *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 (E-G) e CENA367 (H-K). A barra refere-se à escala a 20  $\mu\text{m}$



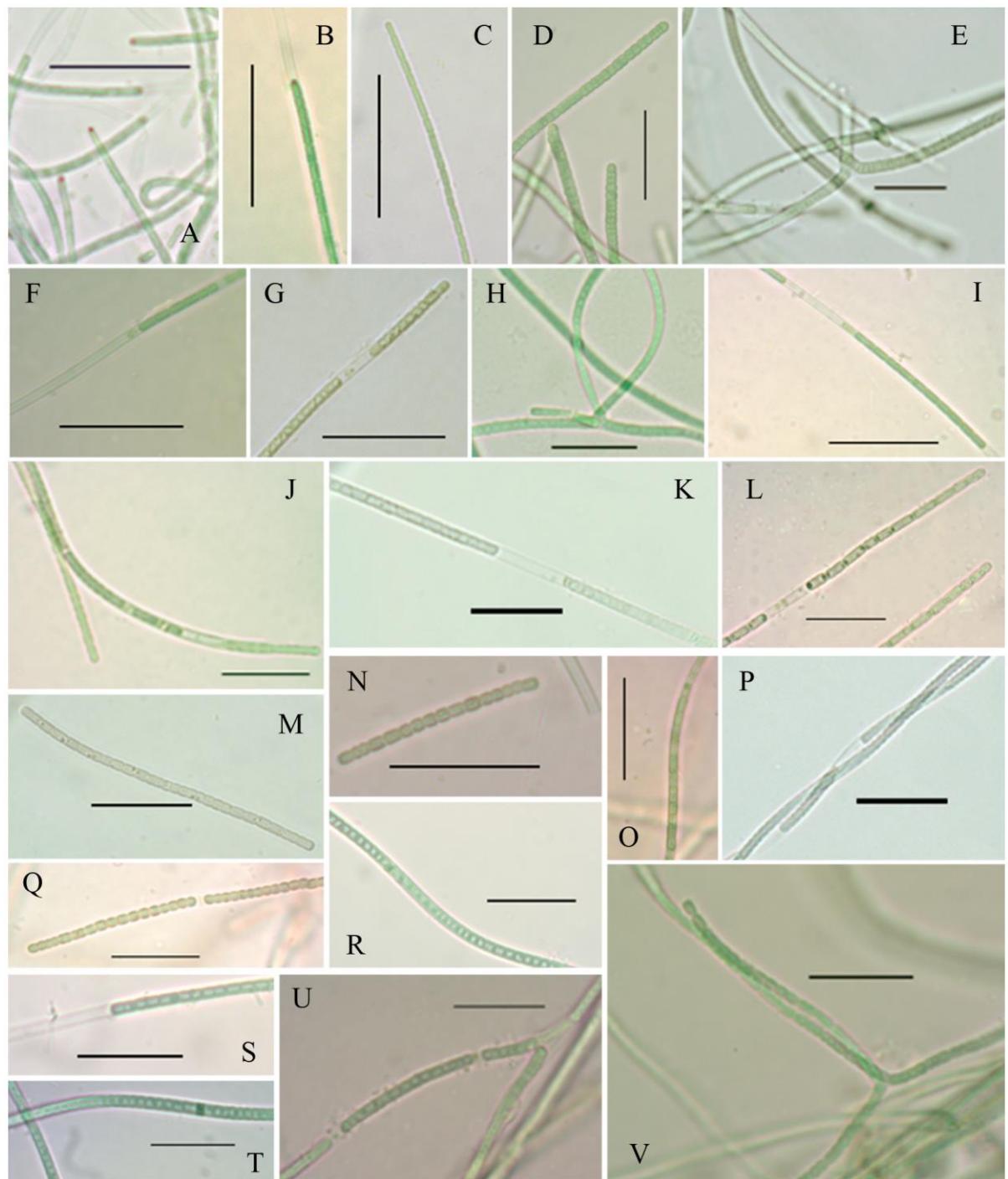
**Figura 2 -** Análise filogenética das linhagens representantes da ordem Chroococcales com base na sequência do 16S rRNA usando o método máxima verossimilhança. Valores de re-amostragem acima de 50% estão apresentados. O carácter ■ indica os isolados de *E. edulis* e ● de *M. neesii*, ambos de Sta Virgínia

### 6.1.2 Linhagens homocitadas

Treze linhagens foram identificadas inicialmente, como morfotipos do gênero *Leptolyngbya* (Figura 3). Esse gênero abriga linhagens com tricomas muito finos (com menos de 3,5 µm de largura) com células isodiamétricas ou mais longas do que largas (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Após análise da sequência 16S RNAr observou-se que apenas seis das treze linhagens apresentaram identidade de sequência igual ou superior a 95% com linhagens do gênero, o que é aplicado atualmente para o agrupamento de linhagens ao nível de gênero (KOMÁREK, 2010). Pelo fato de serem linhagens com dimensões muito pequenas e pobres em características morfológicas diacríticas, sua identificação baseada em avaliações morfológicas pode não só gerar erros de identificação, mas também subestimar a diversidade genética do grupo (ALBERTANO; KOVÁCIK, 1994; BRUNO et al., 2009; CASAMATTA et al., 2005; JOHANSEN et al., 2011).

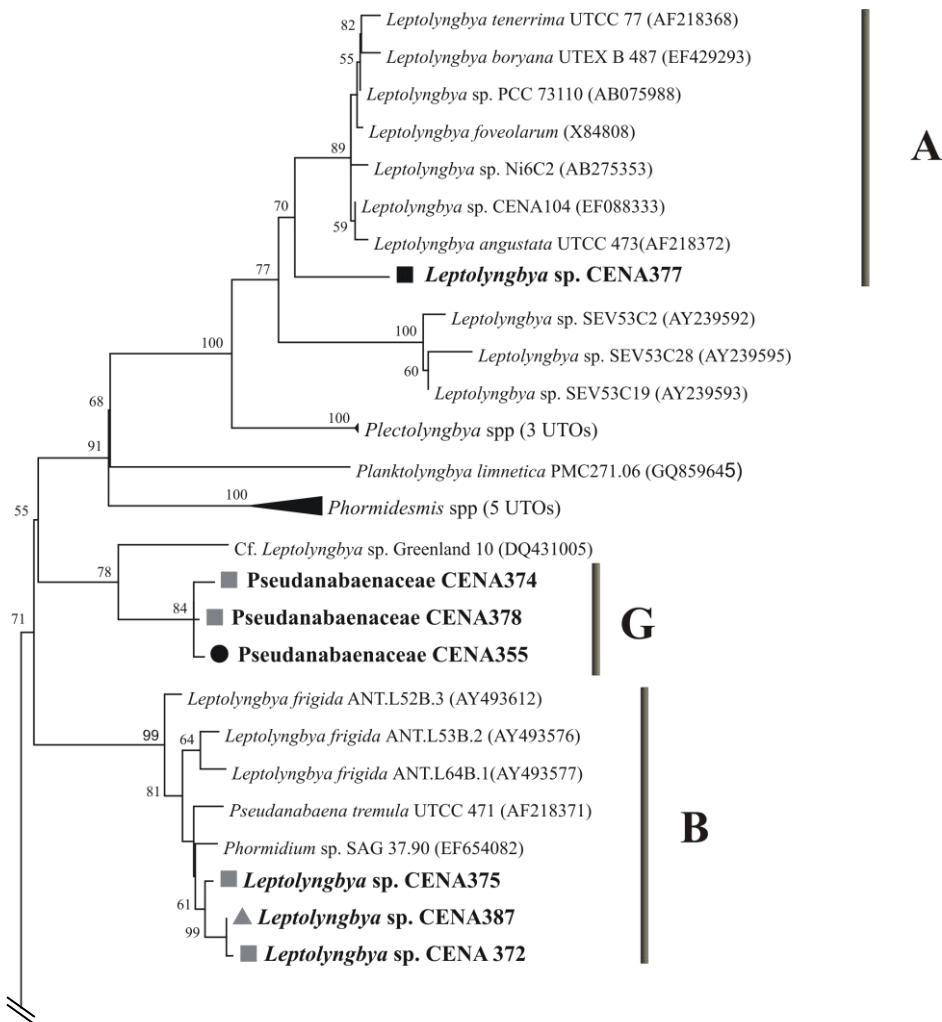
As sequências obtidas para as treze linhagens distribuíram-se em sete clados distintos na árvore filogenética (Figura 4). *Leptolyngbya* sp. CENA377 agrupou-se próxima ao clado típico do gênero contendo *L. boryana* UTEX B 487 (EF429293) e *L. foveolarum* (X84808), com valor de reamostragem de 77% (Figura 4 – Clado A). Características morfológicas observadas nesta linhagem, como a presença de ramificação falsa dupla e ocorrência de necrídeos referem-se a características raramente encontradas no gênero *Leptolyngbya* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), mas também são observadas na espécie *L. boryana* e na linhagem *Leptolyngbya* sp. CENA104. *Leptolyngbya* sp. CENA377 apresentou ainda similaridade com muitas sequências de cianobactérias não cultivadas obtidas em áreas de rejeitos de minas de cobre e de áreas florestais na China (sequências disponíveis, mas não publicadas).

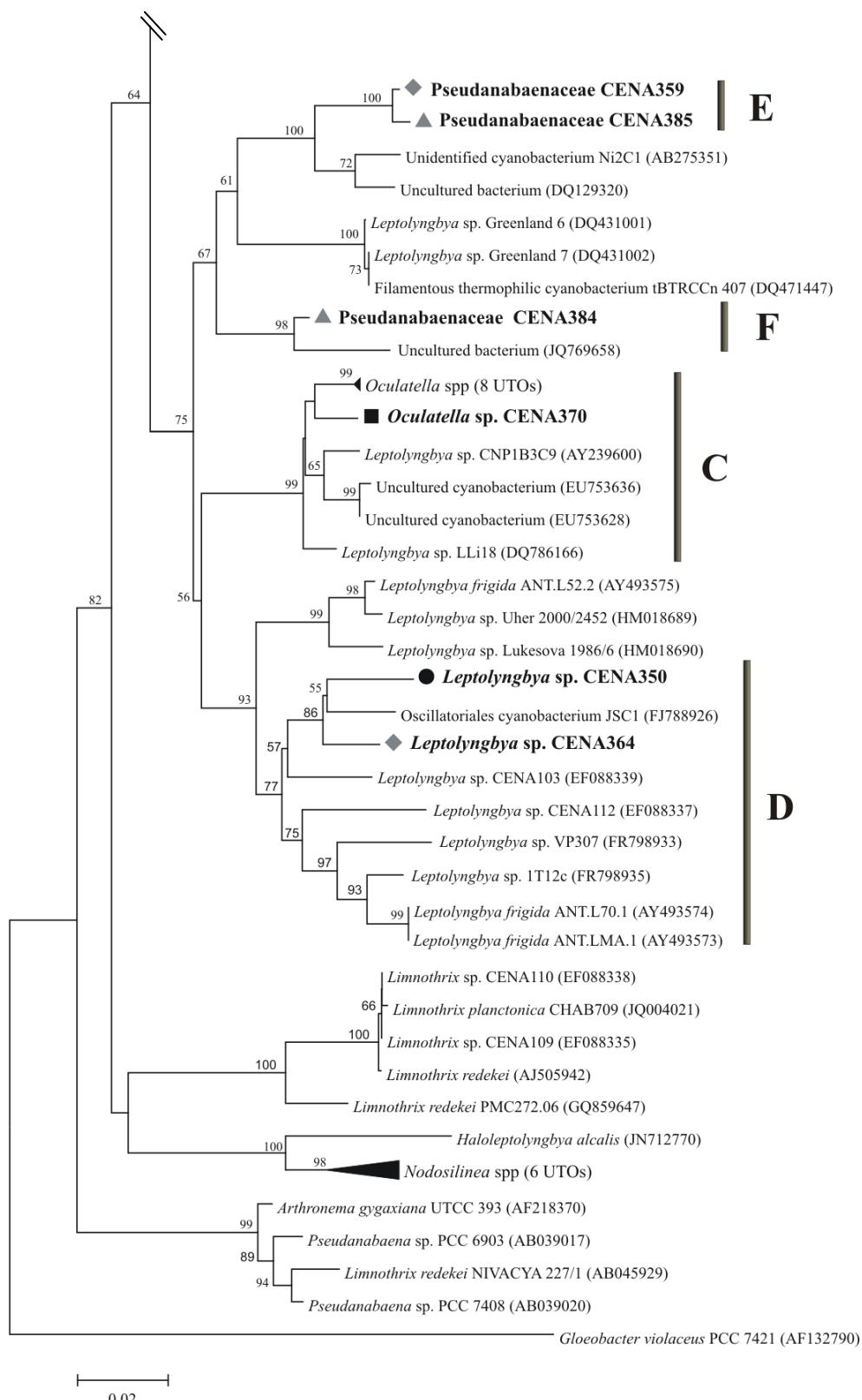
O gênero *Leptolyngbya* é polifilético, de modo que *Leptolyngbya sensu stricto* trata clado típico do gênero, o qual inclui a espécie-tipo *L. boryana* em um clado bem suportado filogeneticamente (Figura 4, Clado A). Já *Leptolyngbya sensu lato* compreende várias linhagens morfologicamente e filogeneticamente relacionadas, mas que não se agrupam em um mesmo clado (TATON et al., 2006; JOHANSEN et al., 2011). Ainda, as sequências de linhagens “SEV”, isoladas em solos de deserto, já foram incluídas no grupo das *Leptolyngbya sensu stricto* (JOHANSEN et al., 2011), mas sempre formando um braço externo ao grupo tradicional.



**Figura 3** - Fotomicrografia das linhagens homocitadas isoladas nesse estudo. *Oculatella* sp. CENA370 (A e B), *Leptolyngbya* sp. CENA372 (C), *Leptolyngbya* sp. CENA377 (D e E), *Leptolyngbya* sp. CENA375 (F), *Leptolyngbya* sp. CENA350 (G), *Leptolyngbya* sp. CENA364 (H), *Leptolyngbya* sp. CENA387 (I), Pseudanabaenaceae CENA355 (J, M e Q), Pseudanabaenaceae CENA374 (K e N), Pseudanabaenaceae CENA378 (L e P), Pseudanabaenaceae CENA384 (O e V), Pseudanabaenaceae CENA375 (R e U) e Pseudanabaenaceae CENA359 (S e T). A barra refere-se à escala a 20 µm.

As linhagens *Leptolyngbya* sp. CENA372, *Leptolyngbya* sp. CENA375 e *Leptolyngbya* sp. CENA387 agruparam-se num clado robusto (bootstrap de 99%) contendo linhagens de ambientes frios isoladas na Antártica, Canadá e Suiça, com as quais compartilham mais de 98% de identidade de sequência (Tabela 3, Figura 4 – Clado B). Essas também compartilham alta similaridade de sequência com cianobactérias não cultivadas obtidas em áreas de rejeitos de minas de cobre. A robustez deste clado já vem sendo relatada (TATON et al., 2006) e espera-se que em breve, seja proposto um novo gênero a partir dessas linhagens (MISCOE et al., 2013).





**Figura 4** - Análise filogenética das linhagens representantes da ordem Pseudanabaenales com base na sequência do 16S rRNA usando o método máxima verossimilhança. Valores de re-amostragem acima de 50% estão apresentados. O caracter □ indica os isolados de *E. edulis*, ○ de *M. neesii*, Δ de *G. opposita* e ♦ de *G. gardneriana*; sendo em preto os do núcleo Sta. Virgínia e em cinza os de Picinguaba

A linhagem CENA370 apresenta tricomas com células mais longas do que largas, e pontos avermelhados na célula apical, característica diacrítica para definição do gênero *Oculatella* (ZAMMIT; BILLI; ALBERTANO, 2012). Essa linhagem apresentou 98,1% de identidade de sequência com *Leptolyngbya* sp. LLi18 (DQ786166) e ao menos 98% com *Oculatella* spp. Todas as oito sequências do gene 16S RNAr disponíveis atualmente para o gênero *Oculatella* possuem cerca de 1000 nt de comprimento, o que as exclui dos resultados das análises de Blast como sequências com maior identidade e cobertura (*Best Hit*) (Tabela 3) quando usamos como molde a sequência gerada nesse estudo (> 1400 nt). Na reconstrução filogenética, CENA370 agrupou-se como um braço externo ao clado de *Oculatella* (Figura 4 – Clado C), de modo que essa linhagem representa um novo agrupamento dentro do gênero, sendo este o primeiro registro da ocorrência desse gênero no Brasil e também em filosfera.

*Leptolyngbya* sp. CENA350 e *Leptolyngbya* sp. CENA364 compartilham 95,2 % de identidade de sequência entre si, entretanto, ficaram próximas na reconstrução filogenética (Figura 4 – Clado D). Ambas também compartilham alta similaridade de sequência com cianobactérias não cultivadas obtidas em áreas de rejeitos de minas de cobre e estão no limite de corte da porcentagem de identidade de sequência para serem identificadas como *Leptolyngbya* spp. (Tabela 3). Essas linhagens agruparam-se em um clado também robusto, distamente relacionado à *Leptolyngbya sensu stricto*.

Na reconstrução filogenética, foi possível observar uma relação entre as linhagens isoladas nesse estudo e linhagens de ambientes extremos, de altas e baixas temperaturas. Considerando-se que a filosfera também é um ambiente extremo, fica evidente que o “ambiente” afeta a filogenia das linhagens; de modo que parece haver algum tipo de convergência em consequência do fato desses organismos viverem em um ambiente de elevado estresse. Sabe-se que espécies microbianas de diferentes origens e taxonomias, vivendo em condições ambientais similares, podem convergir de modo a apresentar similaridades em seu genoma e proteoma (PAUL et al., 2010; SECKBACH, 2003). A existência de relações filogenéticas entre cianobactérias provenientes das regiões ártica e antártica já foi reportada (JUNGBLUT; LOVEJOY; VINCENT, 2010). Entretanto, mais informações devem ser levantadas para o melhor entendimento dessa convergência filogenética entre cianobactérias extremofílicas.

Seis linhagens homocitadas não puderam ser identificadas ao nível de gênero por apresentarem identidade de sequência inferior à 95% (Tabela 3) com sequências disponíveis no banco de dados; e distribuíram-se em três clados distintos (Figura 4 – Clados E, F e G). As

linhagens CENA359 e CENA385 agruparam-se próximas a duas sequências oriundas de biofilme e aerossol (Figura 4 – Clado E) e apresentam também similaridade com muitas sequências de bactérias não cultivadas obtidas em áreas de floresta na China e estromatólitos na Espanha (sequências disponíveis, mas não publicadas). Já CENA384 agrupou-se com uma sequência de bactéria não cultivada gerada em áreas de rejeitos de minas de cobre (Fig. 4 – Clado F). Todas essas sequências agruparam-se em um clado com valor de *bootstrap* de 67%, junto a duas sequências de linhagens identificadas como *Leptolyngbya* spp. e uma cianobactéria de ambiente termofílico. As linhagens CENA355, CENA374 e CENA378 agruparam-se em um clado separado (84% de bootstrap), tendo como grupo irmão a linhagem Cf. *Leptolyngbya* sp. Greenland 10. As três apresentam alta identidade entre si (Tabela 4) e com sequências de bactérias não cultivadas oriundas de ambientes termais, de áreas de rejeitos de minas de cobre e de uma caverna no Havaí (sequências disponíveis, mas não publicadas). Ainda, esses novos clados são formados por linhagens que compartilham alta identidade entre si (> 99% de reamostragem – Tabela 4).

**Tabela 4** - Identidade de sequência (%) do gene 16S RNAr entre as novas linhagens de Pseudanabaenaceae isoladas nesse estudo

Linhagem	1	2	3	4	5
<b>1</b> CENA359	-	-	-	-	-
<b>2</b> CENA385	99,2	-	-	-	-
<b>3</b> CENA384	93,1	92,9	-	-	-
<b>4</b> CENA374	91,0	91,0	91,2	-	-
<b>5</b> CENA378	91,7	91,7	92,0	99,1	-
<b>6</b> CENA355	91,7	91,7	91,9	98,9	99,7

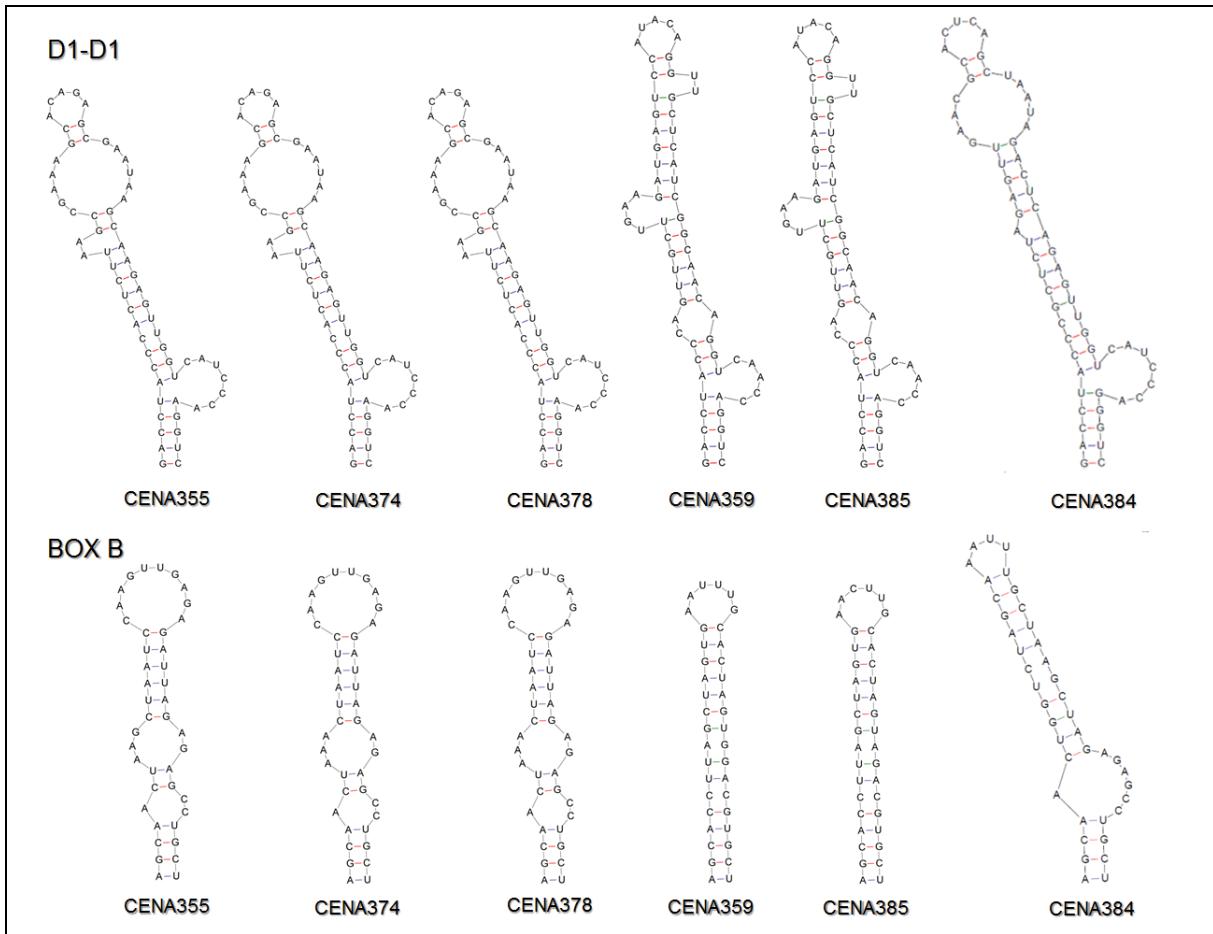
Análises da estrutura secundária de regiões específicas do espaço intergênico (ITS) entre os genes 16S e 23S do RNAr corroboram o padrão de distribuição observado na filogenia das seis novas linhagens de Pseudanabaenaceae isoladas nesse estudo (Tabela 5, Figura 5). As linhagens que formam o clado G (Figura 4) apresentam exatamente a mesma sequência codificando a estrutura D1-D1', Box B e RNAs transportadores (tRNAs), com exceção da linhagem CENA355 que apresenta uma única substituição G → A na décima base da sequência codificadora da estrutura Box B. As linhagens CENA359 e CENA385 também possuem sequências idênticas para D1-D1' e diferem na sequência de Box B por duas bases, sendo as substituições T → C e G → A, respectivamente. Essas substituições não afetam a conformação das estruturas secundárias, de modo que tanto D1-D1', quanto Box B, são idênticas entre as linhagens dentro de cada clado (Figura 5). A linhagem CENA384 apresenta tanto estrutura de Box B, quanto de D1-D1' diferentes das demais.

**Tabela 5** - Tamanho (nt) das regiões Box B e D1-D1' e características do tRNA codificados no 16S-23S ITS das novas linhagens de Pseudanabaenaceae isoladas nesse estudo

Linhagem	Box B (nt)	D1-D1' (nt)	tRNA (anti-códon)
CENA359	38	65	Ile, Ala
CENA385	38	65	Ile, Ala
CENA384	41	64	Ile, Ala
CENA374	42	63	Ile, Ala
CENA378	42	63	Ile, Ala
CENA355	42	63	Ile, Ala

Essa homogeneidade também é observada na morfologia das linhagens (Figura 3). As linhagens do clado G apresentam coloração marrom, células de 2,2 µm (valor médio) de comprimento e 2,0 µm de largura (Tabela 1). Além disso, já foi observado que, em algum momento do ciclo de vida, as três apresentam pontos de granulação nos tricomas, distribuídos próximos aos dois septos (Figura 3). O clado E também é formado por linhagens de morfologia similar, com células de mesmo comprimento e largura (Tabela 1), com baínha e necrídios (Figura 3). A linhagem CENA384 apresenta as mesmas características morfológicas dessas últimas linhagens. Os dados gerados nesse estudo acerca da caracterização de grupos novos de Pseudanabaenaceae mostram que essas linhagens podem corresponder a novas unidades genéricas, uma vez que atendem aos critérios de similaridade de sequência, morfologia, distribuição filogenética e ambiente.

O gênero *Leptolyngbya* foi descrito por Anagnostidis e Komárek (1988) e agrupa linhagens filamentosas homocitadas que antes eram classificadas como pertencentes aos gêneros *Lyngbya*, *Phormidium* e *Plectonema*. Contudo, com o aumento no número de linhagens isoladas e de sequências de rDNA 16S disponíveis, sabe-se hoje, que *Leptolyngbya* é um gênero polifilético (ALBERTANO; KOVÁCIK, 1994; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), contendo linhagens com diferentes histórias evolutivas (CASAMATTA et al., 2005; TATON et al., 2003). Análises filogenéticas e fisiológicas têm demonstrado que esse gênero deve ser subdividido em muitos outros (CASAMATTA et al., 2005; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005) e isso já está acontecendo, como por exemplo, com a proposição de *Nodosilinea* (PERKERSON et al., 2011) e *Oculatella* (ZAMMIT; BILLI; ALBERTANO, 2012), ambos baseados em abordagens polifásicas.



**Figura 5** - Estruturas secundárias D1-D1' e Box B codificadas no 16S-23S ITS das novas linhagens de Pseudanabaenaceae isoladas nessa estudo

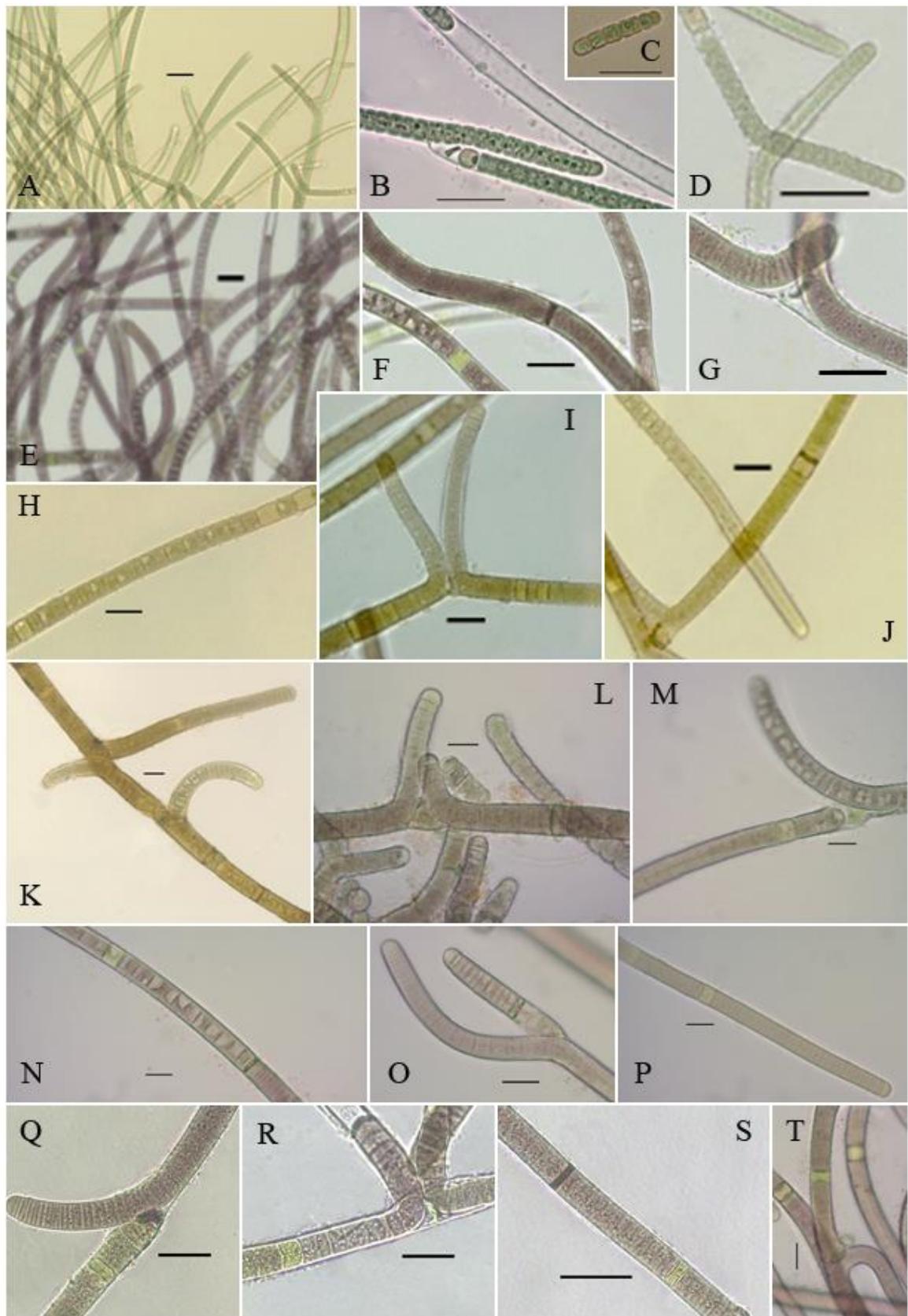
### 6.1.3 Linhagens heterocitadas

A maioria das linhagens isoladas neste estudo (24) pertence ao grupo das cianobactérias heterocitadas (ordem Nostocales). Dessas, 18 foram identificadas como membros da família Nostocaceae, cinco como Scytonemataceae e uma como Microchaetaceae. Os procedimentos de isolamento possivelmente favorecem o estabelecimento de cianobactérias dessa ordem, devido à capacidade de muitas linhagens diferenciarem acinetos (células de resistência), que germinam assim que encontram condições favoráveis, tais como o meio de cultura. Contudo, a ordem Nostocales já foi reportada como a de maior abundância na filosfera dessas mesmas espécies (GONÇALVES, 2011).

As linhagens CENA360, CENA361, CENA366, CENA381 e CENA382 foram identificadas como *Brasilonema* spp. Morfologicamente esse gênero abriga linhagens com tricomas de crescimento fasciculado, com células mais longas na base do tricoma e mais curtas nas extremidades, e sempre envoltos por baínha; apresentam ramificações falsas

simples e duplas (Figura 6). Apresentam, ainda, regiões translúcidas circulares facilmente observadas em microscópio óptico e formam um grupo bem suportado filogenéticamente. Todas as linhagens apresentaram identidade > 99% com *Brasilonema* spp. (Tabela 3). Na árvore filogenética, as sequências destas cinco linhagens ficaram agrupadas com outras representantes do gênero em um clado com valor de reamostragem de 75 % (Figura 7).

A linhagem CENA354 foi classificada, morfologicamente, como pertencente à família Microchaetaceae, visto que apresenta tricomas heteropolares, ramificações falsas simples e duplas, as quais ocorrem próximas ou no heterócito, de modo similar ao que ocorre em *Tolypothrix* spp. Além disso, apresenta um padrão de crescimento com ramificações axilares (Figura 6-B). Em relação à sequência do gene 16S RNAr, apresentou identidade de 97,6 % com *Tolypothrix distorta* SAG 93.79 (sequência disponível, mas não publicada) e 97,5% com *Coleodesmium* sp. ANT.LH52B.5, mas agrupou-se distantemente dessas linhagens na árvore filogenética (Figura 7). Considerando outras sequências geradas e ainda não depositadas, pelo nosso grupo - Laboratório Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA-USP) - mas já disponíveis em trabalhos de tese e dissertação, observou-se que a CENA354 agrupa-se com linhagens isoladas da filosfera de *Avicennia schaueriana*, em manguezal (ALVARENGA, 2011), com as quais apresentou identidade de sequência de até 99%. Essas linhagens, juntas, formaram um clado separado dos demais grupos de Microchaetaceae. Ainda, dados recentemente gerados, também pelo nosso grupo, em estudos conduzidos na Antártica, identificaram mais três linhagens morfologicamente similares e associadas filogeneticamente a esse clado, sugerindo que estamos diante de um grupo novo ao nível genérico formado, exclusivamente, por linhagens extremofílicas. Esses dados foram agrupados e estão sendo trabalhados para a publicação do novo gênero, *Dactylocladus* (FIORE et al., 2013).



**Figura 6** - Fotomicrografia das linhagens heterocitadas (exceto Nostocaceae) isoladas nesse estudo. Microchaetaceae CENA354 (A, B, C e D), *Brasilonema* sp. CENA360 (E, F e G), *Brasilonema* sp. CENA361 (H, I e J), *Brasilonema* sp. CENA366 (K, L e M), *Brasilonema* sp. CENA381 (N, O, P, T) e *Brasilonema* sp. CENA382 (Q, R e S). A barra refere-se à escala a 20 µm

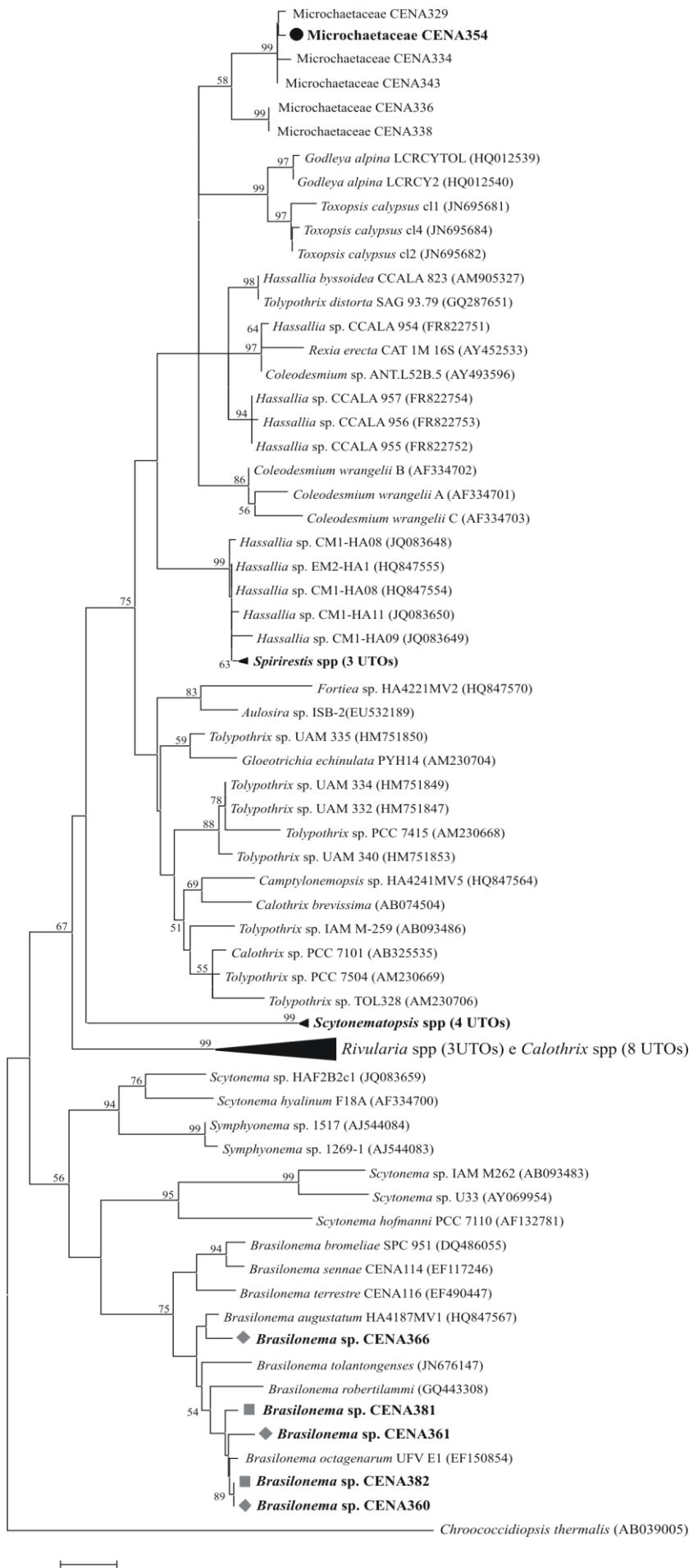
De modo geral, considerando a ordem Nostocales, o nível de identidade de sequência para determinação de gênero de  $\geq 95\%$  não é o mais indicado. Do mesmo modo que obtivemos *Dactylotamnos*, contendo linhagens com coesão morfológica e filogenética, e identidade maior que 95% com linhagens conhecidas, Casamatta et al. (2006) descreveram o gênero *Rexia* (Microchaetaceae) baseados na rara ocorrência de divisão celular em dois planos nos hormogônios da linhagem tipo e única representante do gênero, *Rexia erecta* CAT 1M. Assim como CENA354, a sequência de *R. erecta* apresentou identidade de sequência  $> 95\%$  com outras linhagens de gêneros já descritos. Esse mesmo perfil já foi observado para outros gêneros de Nostocales, recentemente propostos: *Spirirestis* (FLECHTNER et al., 2002), *Desmonostoc* (HROUZEK et al., 2013) e *Toxopsis* (LAMPRINU et al., 2012). Sendo assim, o limite de identidade  $\geq 98\%$  pode ser mais indicado para a delimitação genérica entre indivíduos da ordem Nostocales. Ressalta-se ainda a necessidade de validar essa proposta utilizando uma avaliação ampla de agrupamentos robustos observados em vários gêneros e famílias desta ordem.

Atualmente, existem relativamente poucas sequências disponíveis de linhagens de Microchaetaceae. Além disso, não há trabalhos que abordem de forma ampla a filogenia de linhagens desta família. Esse fator, associado à questão da similaridade de sequência, causa limitação e incerteza nas avaliações filogenéticas e podem explicar as trifurcações observadas na filogenia da árvore gerada para as linhagens dessa família (Figura 7).

Outro fator é que o ambiente também tem extrema importância para a definição dos agrupamentos das linhagens de Microchaetaceae, como observa-se para *Hassalia* spp. CCALA e *Coleodesmium* sp. ANT, isoladas da Antártica, que ficaram distanamente relacionadas com linhagens do mesmo gênero isoladas de solo na América do Norte (*Hassalia* sp. EM2 e CM1; e *C. wrangelii*) (Figura 7). O mesmo perfil é encontrado quando adicionamos na reconstrução filogenética, as linhagens de *Dactylotamnos* isoladas na Antártica, as quais formam um grupo filogenético indiretamente relacionado com as sequências de linhagens de filosfera. Ao que parece, o fator “ambiente” parece ter mais influência sobre a filogenia das linhagens dessa família, do que as características morfológicas, de modo que este fato deve ser considerado nas discussões e nas revisões sobre a sistemática do grupo.

A família Microchaetaceae deve e já está sendo alvo de revisões, principalmente pelo fato de não ser monofilética (HAUER et al., 2013). Contudo, estamos diante de um cenário que pede também a busca de maior coesão e consenso sobre a relevância de cada um dos diferentes aspectos avaliados para a separação taxonômica ao nível de gênero.

**Figura 7** - Análise filogenética das linhagens representantes da ordem Nostocales (exceto Nostocaceae) com base na sequência do 16S rRNAr usando o método máxima verossimilhança. Valores de re-amostragem acima de 50% estão apresentados. O caractere □ indica os isolados de *E. edulis*, ○ de *M. neesii* e ◇ de *G. gardneriana*; sendo em preto os do núcleo Sta. Virgínia e em cinza os de Picinguaba



Um total de 18 linhagens isoladas no presente estudo apresentou características morfológicas relacionadas ao gênero *Nostoc*. As sequências do gene 16S RNAr das 18 linhagens apresentaram identidade de ao menos 97% com outras sequências de *Nostoc* spp. (Tabela 3). Morfologicamente, linhagens desse gênero apresentam tricomas isopolares, que podem estar organizados em colônias aglomeradas, envoltos por baínha ou mucilagem; heteróцитos terminais e/ou intercalares e acinetos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Apesar da semelhança morfológica, a reconstrução filogenética mostrou uma ampla variabilidade genética entre as linhagens (Figura 9). Desta forma, o critério adotado como corte para determinação de gênero dentro da família Nostocaceae foi o nível de similaridade de sequência maior ou igual a 98 %.

Apenas a sequência da linhagem *Nostoc* sp. CENA356 agrupou-se com o clado típico do gênero, contendo as sequências de *N. commune* e *N. muscorum* (Figura 9, Clado A) (HROUZEK et al., 2013). Todas as demais distribuíram-se ao longo de seis clados distintos.

A linhagem Nostocaceae CENA352 agrupou-se próxima ao grupo típico de *Nostoc*, mas apresentou particularidades em sua morfologia, uma vez que comporta-se planctonicamente no cultivo em meio de cultura líquido, de modo que não se observou a formação de colônias nas condições de cultivo. Além disso, possui tricomas e heteróцитos terminais e intercalares delicados. Também foi observada a ocorrência de algumas células terminais e intercalares morfologicamente distintas das demais, possivelmente associadas ao momento da divisão celular e formação dos acinetos (Figura 8-E). Na reconstrução filogenética, a sequência desta linhagem agrupa-se com as sequências de *Nostoc ellipsosporum* CCAP 1453/15 e *Nostoc punctiforme* SAG 60.79, com as quais compartilha 99,2 % e 97,9 % de identidade, respectivamente.

As sequências das linhagens CENA362, CENA363, CENA365, CENA371, CENA380, CENA383 e CENA386, identificadas morfologicamente como *Nostoc* spp, agruparam-se com membros do gênero recém proposto, *Desmonostoc* (HROUZEK et al., 2013), em um clado com valor de reamostragem de 72 %. Esse gênero é definido por linhagens que apresentam as mesmas características morfológicas de *Nostoc*, porém com tricomas preferencialmente mais longos e com menor agregação em colônias. Além disso, é um grupo monofilético e robusto filogeneticamente que abriga linhagens provenientes de diversos ambientes, inclusive epifíticas. As seis linhagens isoladas nesse estudo apresentaram também essas características morfológicas, de modo que foram identificadas como membros do gênero *Desmonostoc*.

A linhagem Nostocaceae CENA376 possui tricomas altamente compactos, em densa mucilagem, sendo rara a visualização de tricomas livres (Figura 8-B). Na reconstrução

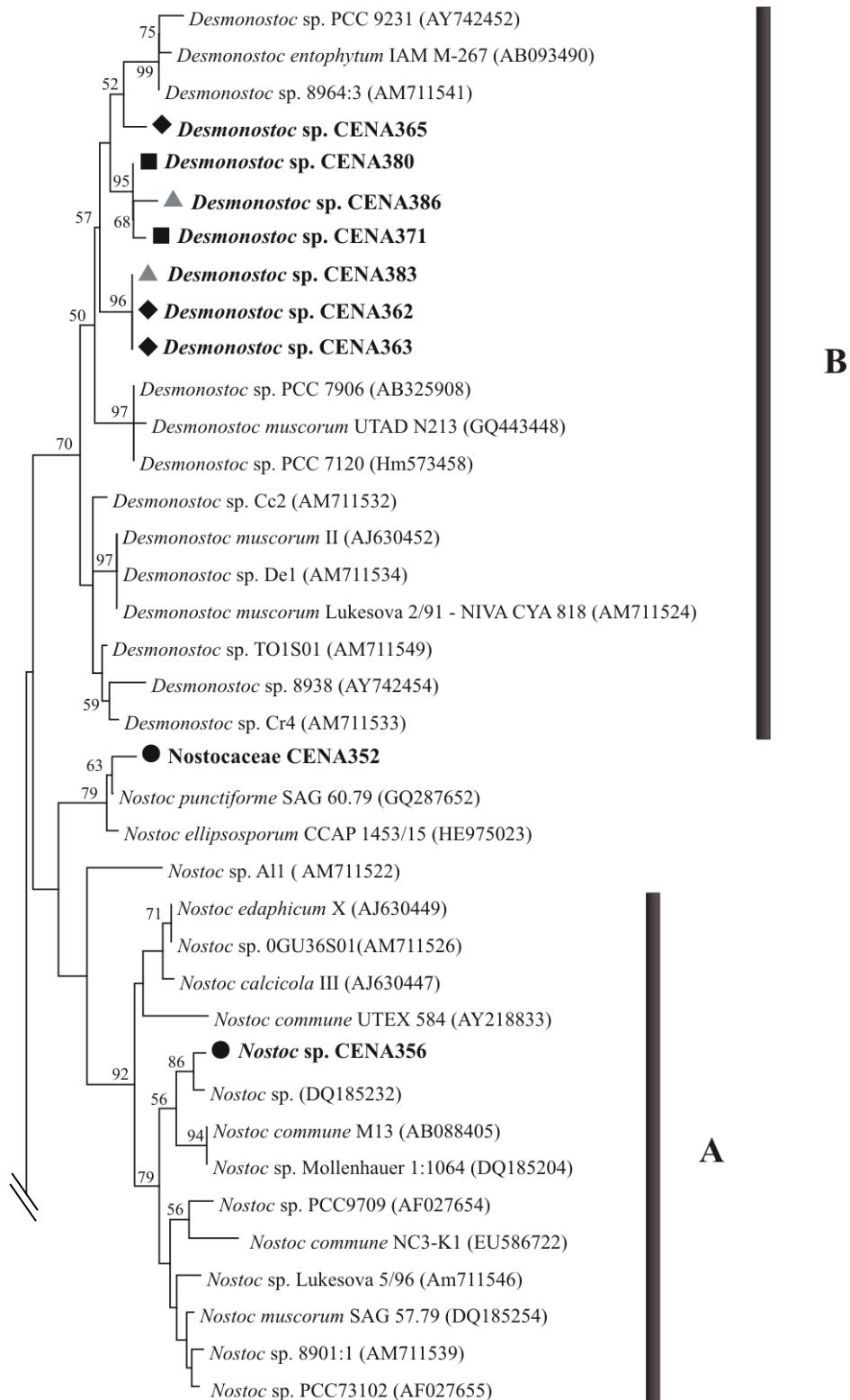
filogenética, a sequência dessa linhagem agrupou-se com a de *Cronbergia siamensis* SAG B11.82, isolada de solo de tabuleiro de arroz irrigado da Tailândia, com a qual compartilha 97,2% de identidade de sequência. Esse gênero apresenta as características morfológicas de *Nostoc* e foi recentemente proposto baseando-se na forma como essa linhagem diferencia os heterocítos (KOMÁREK; ZAPOMELOVÁ; HINDÁK, 2010). Além disso, abriga morfotipos antes identificados como *Anabaena*, *Cylindrospermum* e *Richelia*, linhagens cuja característica comum é o hábito planctônico. Até o momento, não foi observado o perfil de desenvolvimento dos heterocítos de CENA376. Todavia, apesar de os autores afirmarem que uma diferença na identidade de sequência de até 3% já ter sido observada entre linhagens desse gênero, a morfologia de CENA376 a exclui do gênero *Crombergia*. Ainda, ao adicionarmos na reconstrução filogenética, a outra sequência disponível para o gênero, *Crombergia* sp. PCC7417, ela se aloca em um clado não relacionado com CENA376 e *C. siamensis* SAG B11.82; mostrando que *Crombergia* não é um gênero suportado filogeneticamente.

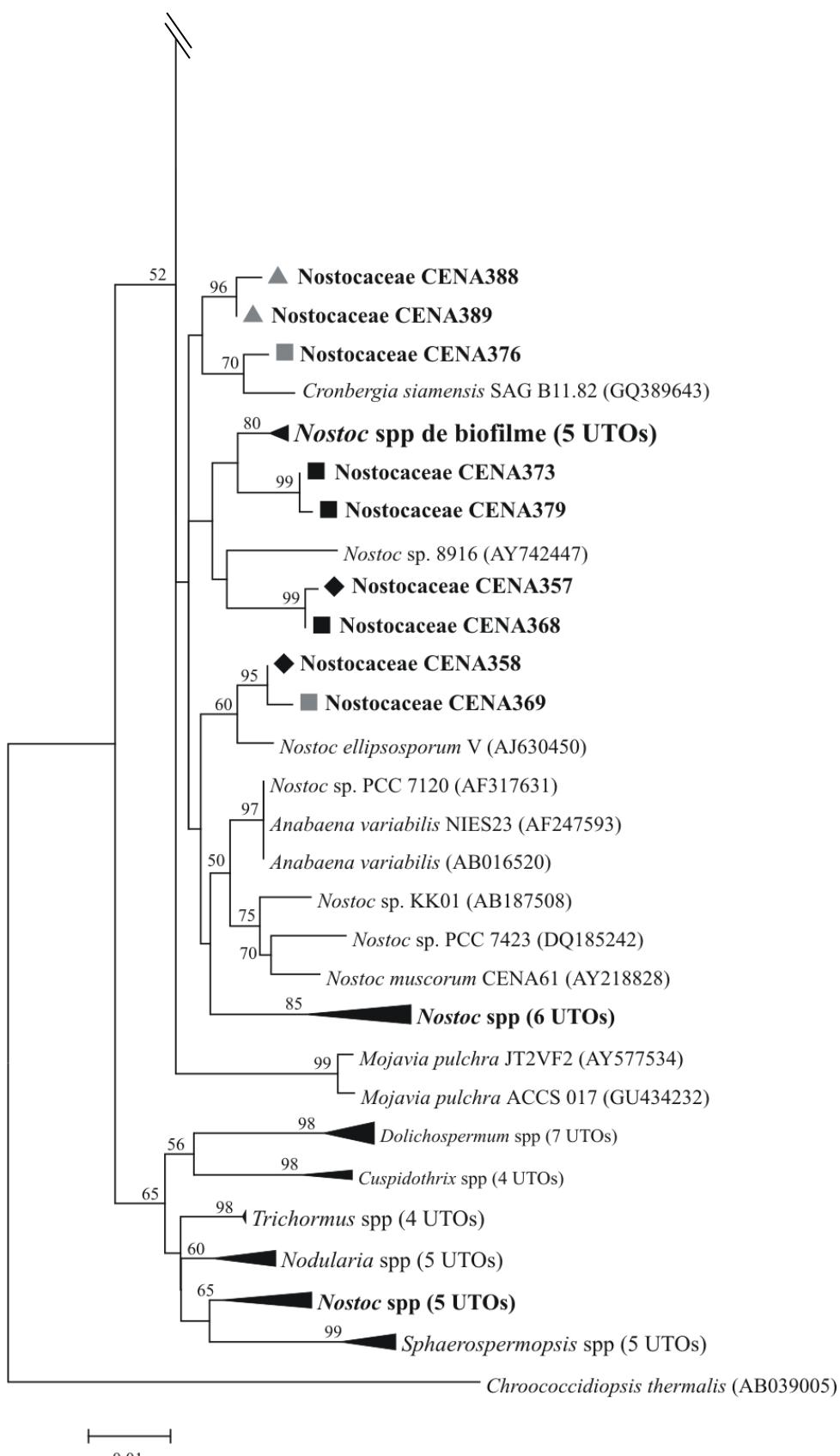
Além das linhagens CENA352 e CENA376, mais oito linhagens apresentaram identidade menor que 98% com sequências disponíveis no banco de dados, sendo identificadas apenas ao nível de família. Além disso, não foi possível determinar um posicionamento filogenético estável para essas sequências. As únicas informações filogenéticas obtidas foram que as sequências das linhagens CENA357, CENA368, CENA373 e CENA379 ficam sempre próximas à um grupo de *Nostoc* sp. oriundas de biofilmes, e CENA358 e CENA369 próximas à linhagem *Nostoc ellipsosporum* V (Figura 9).

O perfil filogenético observado mostra que as linhagens de Nostocaceae isoladas nesse estudo são geneticamente e morfologicamente diversas e a grande maioria não está relacionada com os grupos de *Nostoc* mais conhecidos. Sendo assim, mais informações sobre esses novos grupos são necessárias para se inferir corretamente sobre seu posicionamento filogenético. Outro fator interessante foi que, assim como observado nas linhagens homocitadas, o ambiente de origem foi relevante e afetou a distribuição filogenética das linhagens, uma vez que observamos um clado de *Desmonostoc* formado apenas por linhagens epifíticas (57% de bootstrap) e uma relação entre quatro linhagens isoladas com sequências oriundas de biofilmes.



**Figura 8** - Fotomicrografias das linhagens da família Nostocaceae isoladas nesse estudo. Nostocaceae CENA388 (A), CENA376 (B), CENA356 (C), CENA389 (D), CENA352 (E), CENA358 (F), CENA369 (G), CENA357 (H), CENA368 (I) e CENA373 (J), *Desmonostoc* sp. CENA371 (K) e CENA383 (L), Nostocaceae CENA379 (M), *Desmonostoc* sp. CENA363 (N), CENA365 (O), CENA386 (P), CENA380 (Q) e CENA362 (R). A barra refere-se à escala a 20 µm.





**Figura 9** - Análise filogenética das linhagens representantes da ordem Nostocales, família Nostocaceae, com base na sequência do 16S rRNAr usando o método máxima verossimilhança. Valores de re-amostragem acima de 50% estão apresentados. O caracter □ indica os isolados de *E. edulis*, △ de *G. opposita*, ○ de *M. neesii* e ◇ de *G. gardneriana*; sendo em preto os do núcleo Sta. Virgínia e em cinza os de Picinguaba

A relevância do ambiente nos agrupamentos, assim como a distância filogenética entre os novos grupos caracterizados e os clados tradicionais de *Nostoc* já havia sido observada em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório. Linhagens isoladas em lagoas salino-alcanilas do Pantanal e Antártica formaram dois novos clados, não relacionados entre si, também não relacionados nem ao clado típico do gênero, nem à grupos conhecidos de *Nostoc* spp. (GENUÁRIO et al., 2013a; 2013b).

O gênero *Nostoc* possui ampla ocorrência e abriga organismos aquáticos, terrestres, e associado à algas, fungos, musgos e plantas superiores (KOMÁREK; HAUER, 2009 - CyanoDB). Filogeneticamente é bastante heterogêneo, com a maioria das sequências disponíveis distivamente relacionadas com o clado típico (HROUZEK et al., 2005; LUKESOVÁ et al., 2009; PAPAEFTHIMIOU et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005). A literatura já mostra a existência de outros clados robustos formados por linhagens contendo características morfológicas de *Nostoc* spp, distivamente relacionados ao grupo típico (HROUZEK et al., 2005). Por conta disso, nos últimos anos, diversos estudos têm ressaltado a necessidade de uma revisão no gênero *Nostoc* (PAPAEFTHIMIOU et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005; REHAKOVA et al., 2007). Esta revisão começou a ser feita este ano, com a publicação do gênero *Desmonostoc* (HROUZEK et al., 2013).

## 6.2 Bioprospecção

### 6.2.1 Ensaios colorimétricos para detecção de AIA e sideróforos

As linhagens *Chroococcidiopsis* sp. CENA367, *Pleurocapsa* sp. CENA351, *Pseudanabaenaceae* CENA359 e CENA374, *Leptolyngbya* sp. CENA372 e CENA387, *Brasilonema* sp. CENA381 e CENA382, *Nostocaceae* CENA352, CENA368, CENA376, CENA388 e *Desmonostoc* sp. CENA383 foram identificadas como possíveis produtoras de AIA pelo teste colorimétrico de Salkowski. Nas condições testadas, as alterações colorimétricas não foram observadas a olho nu, sendo que a seleção de linhagens possivelmente sintetizantes de AIA, assim como as estimativas de concentração dos ácidos indólicos foi realizada baseando-se numa curva padrão. A concentração dos ácidos indólicos nas 13 linhagens testadas variou de 0,22 a 0,57 µg/mL, sendo a maior em *Chroococcidiopsis* sp. CENA367 e a menor em *Nostocaceae* CENA352 (Tabela 6).

**Tabela 6** – Concentração de ácidos indólicos determinada por espectrofotometria, para as 13 linhagens identificadas como potenciais produtoras.

Linhagem	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Brasilonema</i> sp. CENA381	0,2
<i>Brasilonema</i> sp. CENA382	0,3
<i>Chrooccocidiopsis</i> sp. CENA367	0,6
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA383	0,4
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA372	0,3
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA387	0,3
Nostocaceae CENA352	0,2
Nostocaceae CENA368	0,3
Nostocaceae CENA376	0,3
Nostocaceae CENA388	0,2
<i>Pleurocapsa</i> sp. CENA351	0,3
Pseudanabaenaceae CENA359	0,2
Pseudanabaenaceae CENA374	0,3

A biossíntese do regulador de crescimento vegetal ácido-indol acético (AIA) é amplamente distribuída entre as bactérias que colonizam a filosfera (BRANDL et al., 2002; FETT et al., 1987; LINDOW et al., 1998), entretanto, o motivo pelo qual esses micro-organismos são capazes de produzir esse hormônio vegetal ainda não é completamente entendido. A capacidade de produção de AIA por bactérias epífitas já foi associada a uma maior competitividade durante a colonização de plantas hospedeiras (BRANDL et al., 1998) e à resistência ao estresse hídrico (MANULIS et al., 1998). Ainda, o AIA promove afrouxamento da parede celular em concentrações muito baixas, podendo estimular a liberação de açúcares da parede celular vegetal (FRY, 1989; GOLDBERG, 1980). Como a filosfera é um ambiente limitado em nutrientes, parece coerente que esse seja um mecanismo para ampliar tal disponibilidade para a comunidade microbiana simbionte. Os dados obtidos sugerem o potencial de produção de AIA por 13 das 40 linhagens isoladas, entretanto, técnicas mais refinadas, tais como cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou espectrometria de massas, com o uso de padrões, devem ser conduzidas para a confirmação desse potencial.

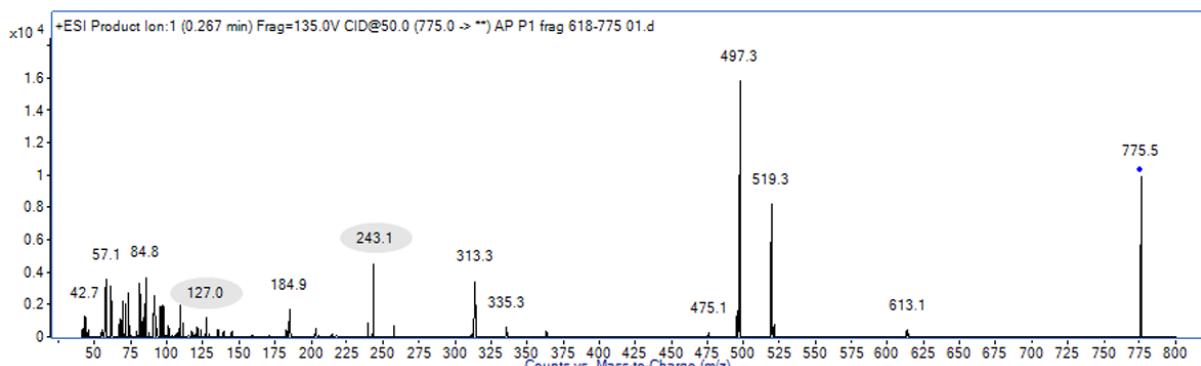
Nenhuma das 40 linhagens isoladas foi positiva para a produção de sideróforos pelo ensaio com o corante cromoazurol S (CAS) nas condições testadas.

## 6.2.2 Busca por moléculas conhecidas

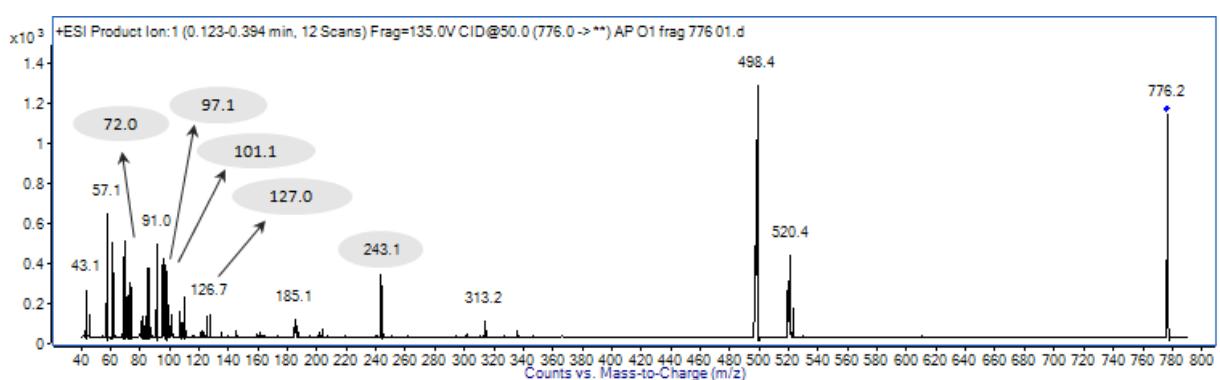
### 6.2.2.1 Aeruginosina e Cianopeptolina

Utilizando infusão direta em modo MRM (Monitoramento Múltiplo de Reação, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) foi possível a identificação de possíveis variantes de cianopeptolina e aeruginosina.

Um novo congênere de cianopeptolina (Cl-775) foi identificado, o qual foi produzido pelas linhagens *Chroococcidiopsis* sp. CENA367 e *Desmonostoc* sp. CENA383. A fragmentação do íon m/z 775 em *Chroococcidiopsis* sp. CENA367 gerou os íons m/z 243 (fenilalanina) e 127 (tirosina clorada) (Fig. 10). Enquanto que a fragmentação do íon m/z 776 em *Desmonostoc* sp. CENA383 gerou os íons m/z 243, 127, 101, 97 e 72 (TOOMING-KLUNDERUD et al., 2007) (Fig. 11). Esses dados foram publicados pelo nosso grupo no trabalho de Silva-Stenico e colaboradores (2012).

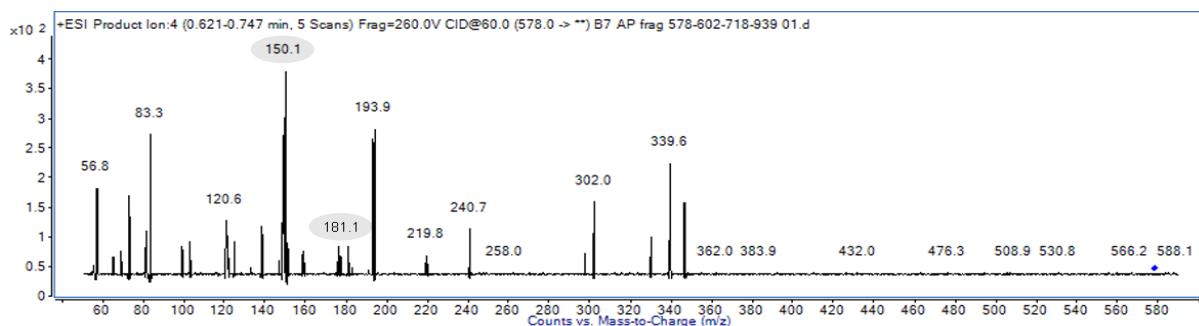


**Figura 10** - Fragmentação do íon m/z 775 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Chroococcidiopsis* sp. CENA367.



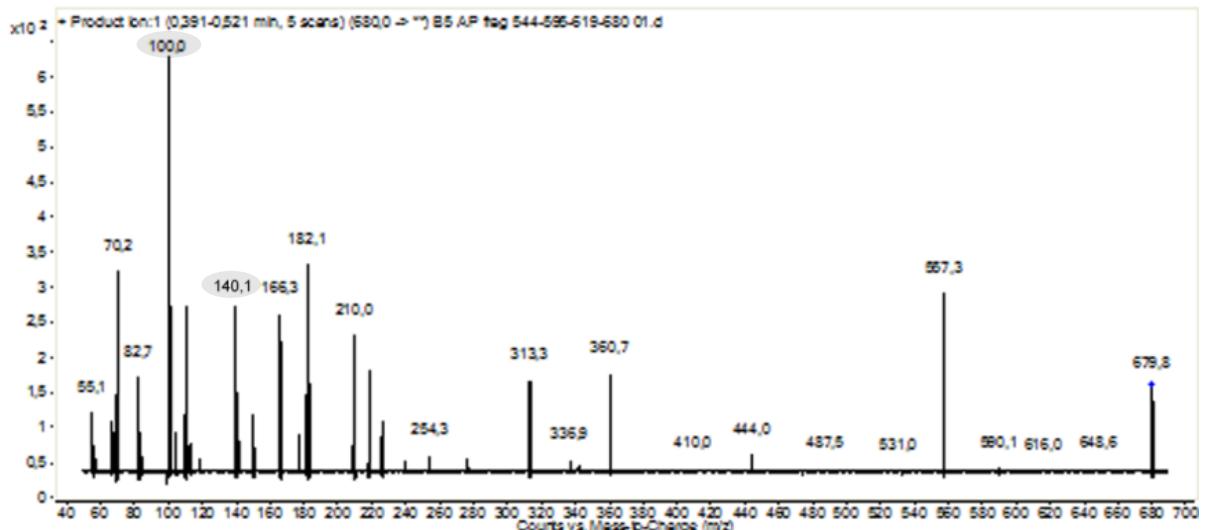
**Figura 11** - Fragmentação do íon m/z 776 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Desmonostoc* sp. CENA383.

A linhagem Pseudanabaenaceae CENA355 foi identificada como potencialmente produtora de cianopeptolina, visto que apresentou o íon m/z 578, que fragmentado gerou fragmentos m/z 150 (tirosina metilada) e 181 (3-amino-6-hidroxi-piperidona e leucina) (CZARNECKI et al., 2006) (Fig. 12).

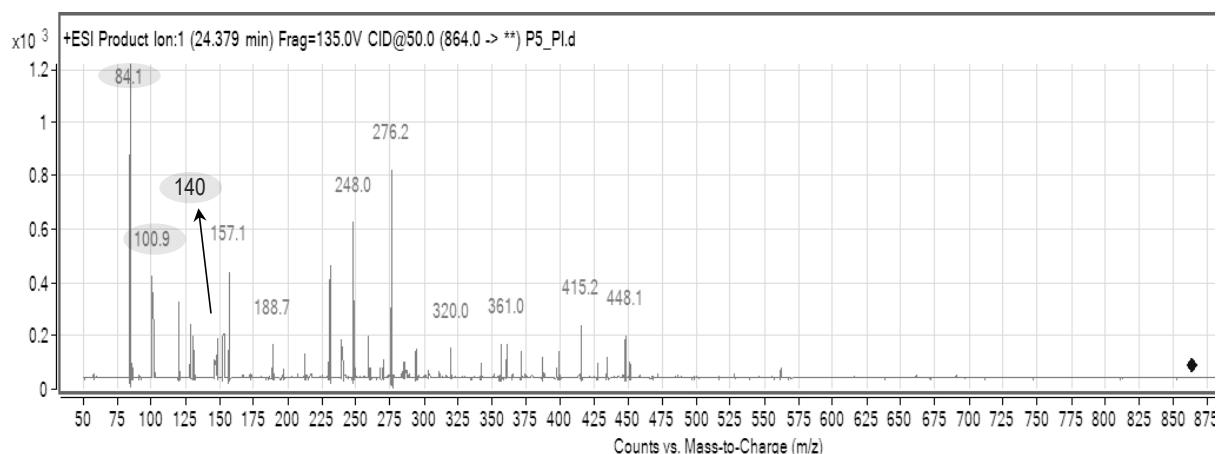


**Figura 12** - Fragmentação do íon m/z 578 obtidos no espectro de massas do extrato metanólico de Pseudanabaenaceae CENA355.

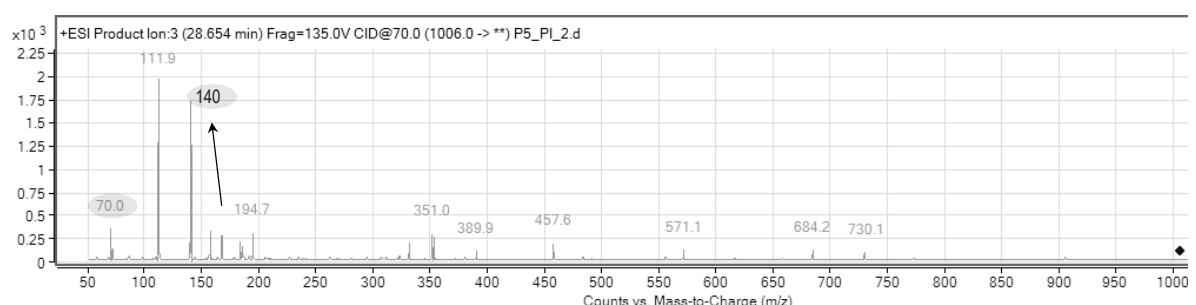
Dez linhagens apresentaram potencial para produção de aeruginosina. Microchaetaceae CENA354 apresentou o íon m/z 679, que fragmentado gerou os íons m/z 100 (fragmento argal), m/z 140 (ácido 2-amino-6-carboxi hidroxi-octahidro-indole - Choi) (ANAHAS; GAYATHRI; MURALITHARAN; WELKER et al., 2004) (Fig. 13). As linhagens *Desmonostoc* sp. CENA371 e CENA386 apresentaram perfil similar, contendo sete íons (m/z 864, 878, 984, 1018, 1004, 1012 e 1032), que quando fragmentados geraram os íons m/z 140. Dentre esses, os íons m/z 864 e 878 e os íons m/z 984, 1018, 1004, 1012 e 1032 tiveram espectros fragmentação muito similares, sugerindo um “esqueleto” estrutural semelhante. Outros íons característicos de aeruginosina (m/z 101 e 84 - íons Lys-Immonium e m/z 70 - íon Pro-Immonium) foram identificados na fragmentação de alguns dos íons m/z acima mencionados (Figs. 14 e 15).



**Figura 13** - Fragmentação do íon m/z 679 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Microchaetaceae* CENA354.



**Figura 14** - Fragmentação do íon m/z 864 (similar à fragmentação do íon m/z 878) obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Desmonostoc* sp. CENA371 e CENA386.



**Figura 15** - Fragmentação do íon m/z 1012 (similar à fragmentação dos íons m/z 984, 1004, 1012 e 1032) obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Desmonostoc* sp. CENA371 e CENA386.

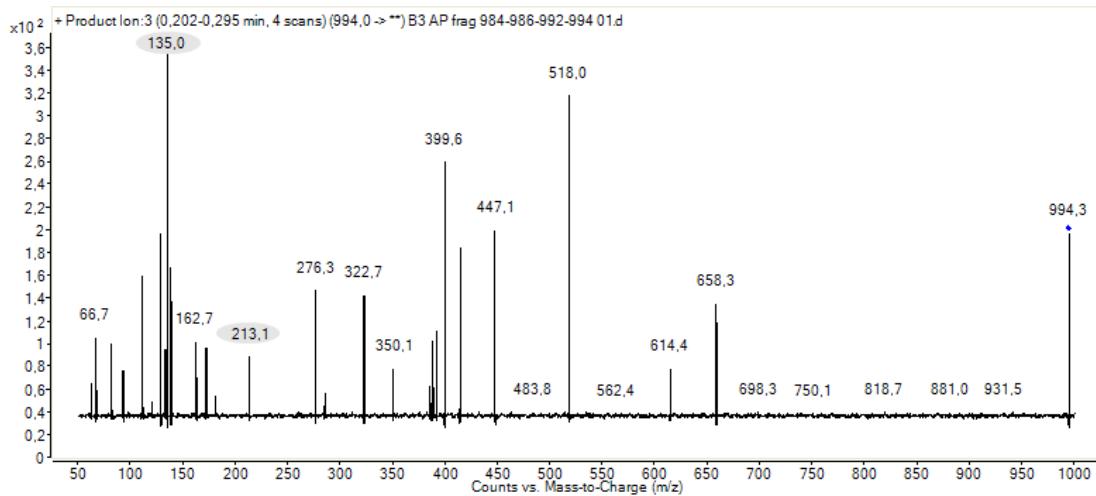
As linhagens Nostocaceae CENA352, CENA358 e CENA369, *Brasilonema* sp. CENA360, CENA361, CENA381 e CENA382 apresentaram os íons m/z 865 e m/z 851, que podem estar relacionados com uma nova classe de aeruginosinas descrita em *Nostoc* sp. (KAPUŚCIK et al., 2013). Além disso, fragmentos de m/z característicos foram detectados na fragmentação dos dois íons (m/z 72 - íon Val-immonium e m/z 86 - íon Leu-immonium).

Apesar dos dados químicos obtidos, nenhuma das linhagens acima apresentou amplificação específica nas condições testadas por PCR. *Chroococcidiopsis* sp. CENA367 e *Desmonostoc* sp. CENA383 apresentaram amplificação inespecífica para cianopeptolina, ou amplificação de fragmentos de tamanho maiores do que o esperado e essas sequências tiveram alguma similaridade a regiões não anotadas de genomas de *Nostoc* spp.; Pseudanabaenaceae CENA355 não apresentou sinal de amplificação. Também não se observou sinal de amplificação para aeruginosina nas 10 linhagens identificadas como potenciais produtoras.

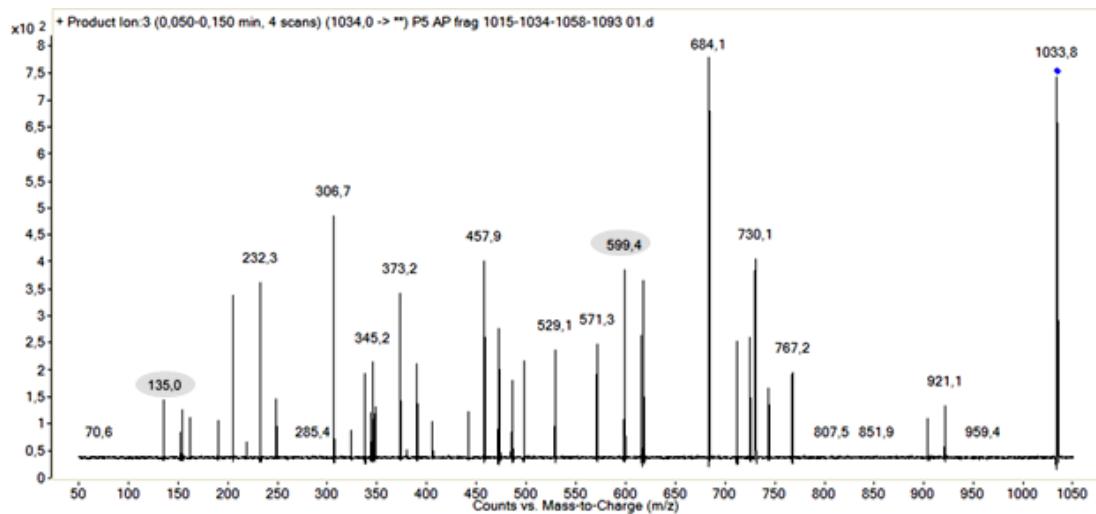
Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo para a detecção dos agrupamentos gênicos da cianopeptolina e aeruginosina foram desenvolvidos baseando-se em sequências de *Microcystis aeruginosa* (CADEL-SIX et al., 2008), linhagem de taxonomia e ecologia diferentes das linhagens isoladas nesse estudo. Além disso, o produto da amplificação de ambos os conjuntos de iniciadores são espaços intergênicos, de modo que alterações na configuração dos agrupamentos gênicos em relação à posição dos genes pode resultar na ausência de amplificação.

#### **6.2.2.2 Microcistina**

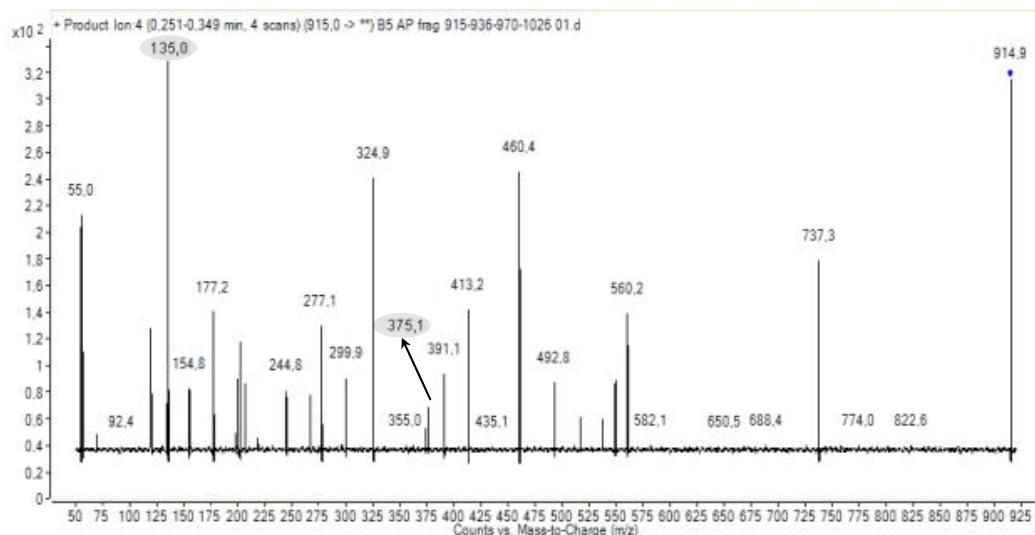
As linhagens Nostocaceae CENA352, *Desmonostoc* sp. CENA371 e Microchaetaceae CENA354 foram identificadas como potenciais produtoras de microcistina (MCY). Na linhagem Nostocaceae CENA352 foi identificado o íon m/z 994, correspondente à MCYST-LR cuja fragmentação gerou os íons m/z 135 (Adda-3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico ácido), que confere toxicidade à molécula de MCY e 213 (Glu-Mdha) (NAMIKOSHI et al., 1992) (Figura 16). Na linhagem *Desmonostoc* sp. CENA371 foi identificado o íon m/z 1033, correspondente a uma possível nova variante de microcistina, cuja fragmentação gerou os íons m/z 135 e 599 (Arg-Adda-Glu-H) (WELKER et al., 2002) (Fig. 17). A linhagem Microchaetaceae CENA354 apresentou o íon m/z 914 (possível nova variante), cuja fragmentação gerou os fragmentos m/z 135 e 375 (Adda-Glu-Mdha) (WELKER et al., 2002) (Fig. 18).



**Figura 16** - Fragmentação do íon  $m/z$  994 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de Nostocaceae CENA352.



**Figura 17** - Fragmentação do íon  $m/z$  1033 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de *Desmonostoc* sp. CENA371.



**Figura 18** - Fragmentação do íon  $m/z$  914 obtido no espectro de massas do extrato metanólico de Microchaetaceae CENA354.

Apesar das linhagens Nostocaceae CENA352, *Desmonostoc* sp. CENA371 e Microchaetaceae CENA354 terem sido identificadas como potenciais produtoras de microcistina, nenhum dos genes associados à sua via biossintética avaliados (*mcyD*, *mcyE* e *mcyG*) apresentaram amplificação nas condições testadas.

Sabe-se que as condições de cultivo nem sempre favorecem a produção de certas moléculas, de modo que muitas vezes não se consegue detectar determinadas substâncias apesar da linhagem ter o potencial genético de produção. Além disso, a presença de um ou alguns genes associados à via biossintética de determinada molécula não garante que a linhagem possua toda a maquinaria necessária para sua síntese. Ainda, limitações em ambas as abordagens raramente permitem resultado coerente entre ambos, de modo que devemos ser cautelosos quanto às interpretações dos resultados obtidos. Assim, a confirmação da produção de uma determinada molécula só se dá por meio de purificação e análise desta, utilizando comparações com padrões comerciais e banco de dados químicos, podendo ser necessárias análises da conformação da molécula, por ressonância magnética nuclear (RMN).

#### **6.2.2.3 Microviridina**

Todas as linhagens foram testadas quanto ao seu potencial para produção do inibidor de protease microviridina por PCR de três genes associados à sua via biossintética, o gene *mdnA*, que codifica para o peptídeo precursor da microviridina e os genes *mdnB* e *mdnC*, os quais codificam para ATP-grasp ligases responsáveis pela macrociclagem do peptídeo (ZIEMERT et al., 2008).

As linhagens Nostocaceae CENA358, CENA376, *Desmonostoc* sp. CENA365 e *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 apresentaram amplificação para os três genes; outras oito linhagens apresentaram amplificação para dois genes e nove linhagens para ao menos um dos genes testados (Tabela 7).

Do mesmo modo que a presença dos três genes é um forte indício de potencial para produção da molécula (considerando-se que trata-se de uma via de síntese ribossômica), o fato de algumas linhagens não apresentarem amplificação para algum dos genes testados não implica na sua incapacidade de sintetizar a molécula, pois os iniciadores utilizados foram desenvolvidos para linhagens de *Microcystis*, isoladas de ambientes aquáticos, grupo distamente relacionado, filogeneticamente e ambientalmente, com as linhagens desse estudo. Ainda, os iniciadores utilizados apresentaram baixa eficiência de amplificação, de

modo que apesar de obter-se uma amplificação específica (apenas uma banda e de tamanho esperado amplificada), a concentração do produto final foi sempre baixa (de 2-10 ng DNA. $\mu$ L $^{-1}$ ).

Até novembro de 2013 41 sequências para “*Microviridin*” foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI). Dessas, a maioria das sequências é proveniente de *Microcystis* spp., duas são de *Planktothrix* spp. (uma não publicada), todas planctônicas, e uma *Nostoc* (também não publicada). A produção de microviridina já foi detectada também em uma linhagem de *Oscillatoria agardhii* (SHIN et al., 1996). Desse modo, esse trabalho é pioneiro na caracterização desses genes em *Chroococcidiopsis* spp. e *Desmonostoc* spp. e na busca desses genes em linhagens de outros gêneros no ambiente de filosfera. O fato de outros gêneros possuírem esses genes indica que o potencial para a produção da microviridina é amplamente distribuído no filo Cyanobacteria.

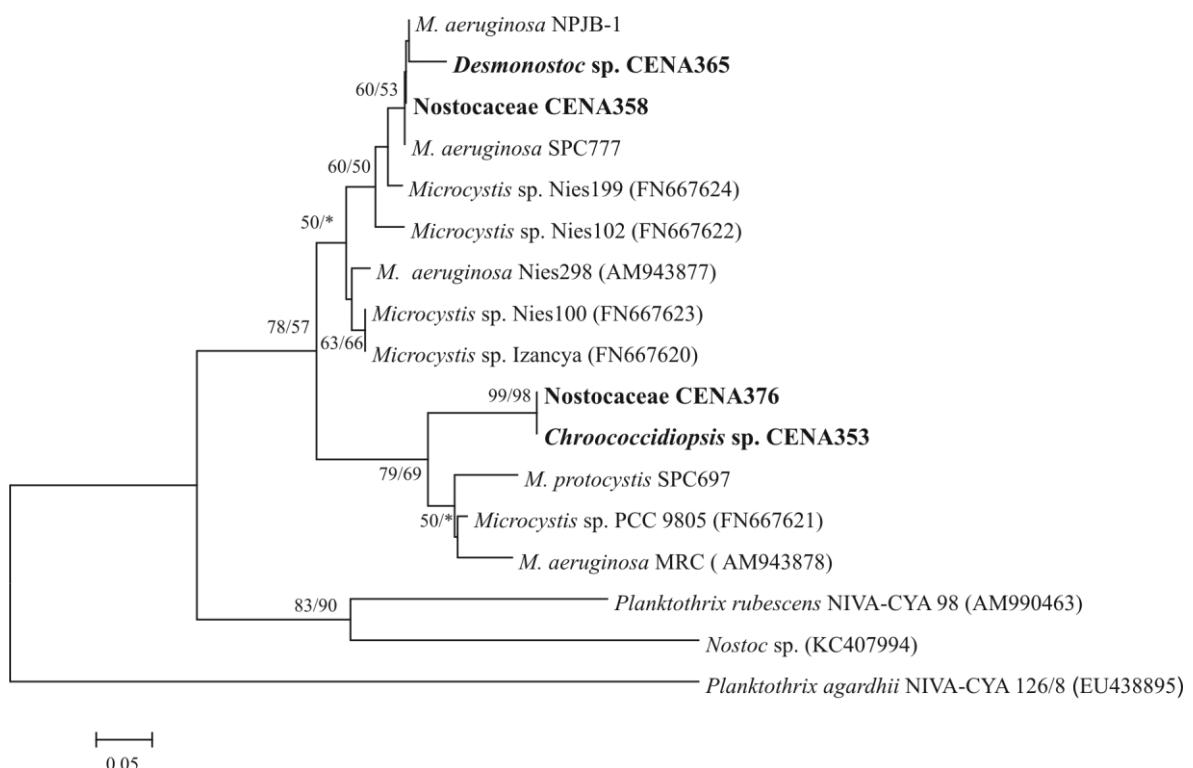
Selecionou-se para sequenciamento e análise filogenética apenas os produtos de amplificação de linhagens positivas para os três genes testados: Nostocaceae CENA358 e CENA376, *Desmonostoc* sp. CENA365 e *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 (APÊNDICE B). A análise filogenética do gene que codifica para o precursor da microviridina *mdnA* (Figura 19) mostra que as sequências geradas nesse estudo agrupam-se em dois clados distintos. Essa distinção se dá pelo fato de as linhagens Nostocaceae CENA376 e *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 apresentarem uma substituição histidina por uma leucina na porção N-terminal do precursor, diferente das demais. Do mesmo modo, Nostocaceae CENA358 e *Desmonostoc* sp. CENA365 diferem das demais na porção C-terminal, onde apresentam a deleção de uma valina e diversas substituições de aminoácidos. Já os genes *mdnB* e *mdnC* tiveram uma distribuição homogênea e seguiram um mesmo padrão de distribuição na análise filogenética, ambos distamente relacionados às sequências de *Planktothrix* spp. e *Nostoc* sp. disponíveis (Figura 20- A e B).

**Tabela 7** - Amplificação dos genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC* nas linhagens isoladas nesse estudo

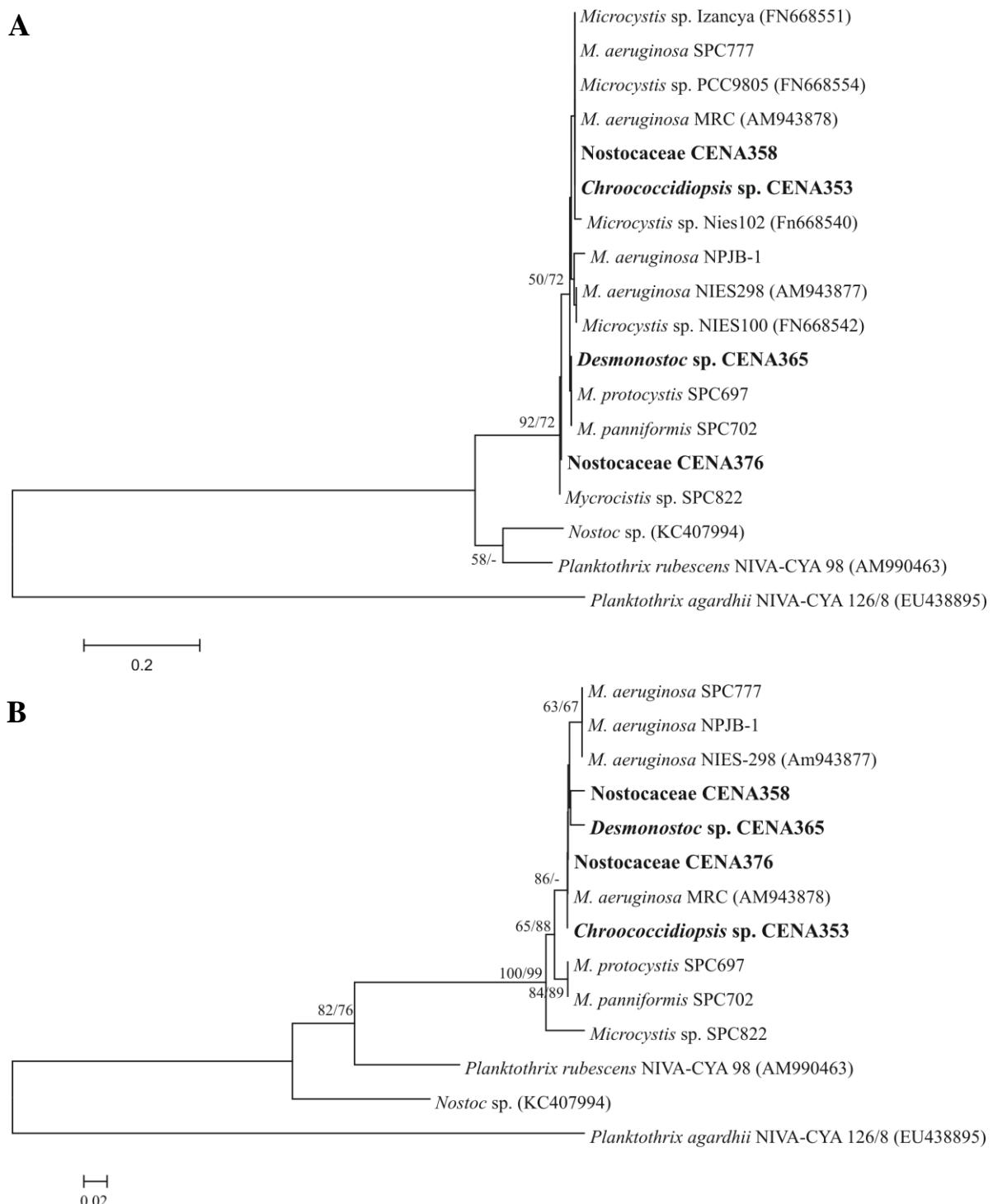
Linhagem	Microviridina		
	<i>mdnA</i>	<i>mdnB</i>	<i>mdnC</i>
<i>Brasilonema</i> sp. CENA360	-	-	-
<i>Brasilonema</i> sp. CENA361	+	-	-
<i>Brasilonema</i> sp. CENA366	+	+	-
<i>Brasilonema</i> sp. CENA381	-	-	+
<i>Brasilonema</i> sp. CENA382	+	-	-
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. CENA353	+	+	+
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. CENA367	+	-	+
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA362	-	-	-
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA363	-	-	-
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA365	+	+	+
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA371	-	-	-
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA380	-	-	-
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA383	-	-	-
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA386	+	-	+
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA350	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA364	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA372	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA375	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA377	+	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA387	-	-	-
<i>Microchaetaceae</i> CENA354	+	-	+
<i>Nostoc</i> sp. CENA356	-	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA352	+	-	+
<i>Nostocaceae</i> CENA357	+	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA358	+	+	+
<i>Nostocaceae</i> CENA368	-	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA369	-	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA373	+	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA376	+	+	+
<i>Nostocaceae</i> CENA379	-	-	+
<i>Nostocaceae</i> CENA388	-	-	-
<i>Nostocaceae</i> CENA389	-	-	-
<i>Oculatella</i> sp. CENA370	-	-	-
<i>Pleurocapsa</i> sp. CENA351	+	+	-
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA355	+	-	-
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA385	+	-	+
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA359	+	-	-
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA374	+	-	-
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA378	+	+	-
<i>Pseudanabaenaceae</i> CENA384	-	-	-

+ significa presença e – ausência de amplificação.

A porção referente aos últimos 13 a 16 aminoácidos da região C-terminal do peptídeo precursor confere as novas isoformas de microviridina (ZIEMERT et al., 2010), e estas, por sua vez, apresentam diferentes capacidades inibitórias das enzimas tripsina, quimiotripsina e elastase. Atualmente, são conhecidas 14 variantes de microviridina (FUJII et al., 2000; ISHITSUKA et al., 1990; MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995; RESHEF; CARMELI, 2006; ROHRLACK et al., 2003; SHIN et al., 1996; ZIEMERT et al., 2010). Ziemert e colaboradores (2012) em uma busca em linhagens de *Microcystis* isoladas e em amostras ambientais, identificaram 15 possíveis novas variantes de microviridina baseando-se na sequência do gene *mdnA* e confirmaram por estudos refinados envolvendo expressão heteróloga a variante *L-microvirinin*. No presente trabalho, encontrou-se quatro possíveis novas variantes, sendo uma delas idêntica à sequência encontrada por Hoff-Rissetti (2012) em quatro linhagens de *M. aeruginosa* e três ainda não descritas (Tabela 8).



**Figura 19** - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do gene *mdnA*. As linhagens sequenciadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% segundo o método de *neighbor joining* (NJ)/ máxima verossimilhança (ML) estão apresentados.\* corresponde a valores < 50 %.



**Figura 20** - Árvores filogenéticas de sequências de aminoácidos de genes associados à via biosintética da microviridina . *mdnB* (A) e *mdnC* (B). As linhagens sequenciadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% segundo método nas análises de *neighboor joining* (NJ)/ máxima verossimilhança (ML) estão apresentados. – indica agrupamento não formado

**Tabela 8** - Sequências de aminoácidos da porção C-terminal do gene *mdnA* das diferentes variantes de microviridina

Linhagem	Seqüência de aminoácidos na região C-terminal								Variante <i>mdn</i>	Referência			
	T	X1	K	Y	P	S	D	X2	E	X3	X4		
<i>M.aeruginosa</i> NIES-843		F						W		D	Y	L	ZIMERT et al, 2010
<i>M.aeruginosa</i> NIES-298			L					W		E	Y	A,B,C, G,H,I	ISHITSUKA et al., 1990; OKINO et al., 1995; MURAKAMI et al., 1997
<i>Oscillatoria</i> <i>agardhii</i> NIES204			Y					F		D	F	E <sup>2</sup>	SHIN et al., 1996
<i>Oscillatoria</i> <i>agardhii</i> NIES204			M					W		D	Y	D <sup>2</sup>	SHIN et al., 1996
<i>M. aeruginosa</i> IL-215			R					W		HO-D	Y	SD <sup>1,2</sup>	RESHEF; CARMELI, 2006
<i>M. aeruginosa</i> MRC			R					W		E	W	J	ROHRLACK et al., 2003
<i>M. aeruginosa</i> SPC777, NPCD-1, NPJB- 1,e NPLJ-4			F					W		D	F	Nd	HOFF-RISSETI, 2012
<i>M. aeruginosa</i> SPC697			R	F				W		E	F	Nd	HOFF-RISSETI, 2012
<b>Nostocaceae</b> <b>CENA358</b>			F					W		D	F	Nd	<b>Este estudo, HOFF- RISSETI, 2012</b>
<b>Desmonostoc</b> <b>sp. CENA365</b>			F					C		D	F	Nd	<b>Este estudo</b>
<b>Nostocaceae</b> <b>CENA376</b>			R					E		G	F	Nd	<b>Este estudo</b>
<b><i>Chroococcidiops</i></b> <b>is sp. CENA353</b>			R					W		G	F	Nd	<b>Este estudo</b>

X representa os aminoácidos variáveis. <sup>1</sup>existem três variações de isoformas SD. <sup>2</sup>Aminoácido determinado por análises químicas. Em negrito, as linhagens analisadas nesse estudo. Nd: não determinado.

### 6.3 Análise filogenética do gene *nifH* das potenciais linhagens diazotróficas isoladas

Foi realizada uma busca por potenciais linhagens diazotróficas pela amplificação e sequenciamento do gene *nifH*. Das 40 linhagens isoladas, 26 apresentaram o gene. Dentre elas, todas as representantes da ordem Nostocales e as duas linhagens homocitadas: *Leptolyngbya* sp. CENA350 e CENA375.

Apesar de possuírem o gene *nifH*, ambas as linhagens homocitadas foram incapazes de sobreviver em meio de cultura sem fontes de nitrogênio, o que demonstra sua incapacidade de realizar o processo de FBN nas condições de cultivo. Essa incapacidade pode indicar ou que essas linhagens não possuem todos os genes *nif* necessários para a FBN, ou que as condições de cultivo as impeçam de realizar a FBN. É sabido que para realizar a FBN é necessário um ambiente anóxico, e este é alcançado pelas cianobactérias homocitadas através de uma separação espacial ou temporal entre a fotossíntese e a FBN e de conformações estruturais tais como disposição dos filamentos/tricomas em feixes, agregação de colônias, etc (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; FIORE; HONDA, 2008). Ainda, já foi reportado que a FBN por *Leptolyngbya* spp. em cultura depende de seu consórcio com bactérias heterotróficas, que consomem o O<sub>2</sub> gerado na fotossíntese (LI et al., 2010).

Os genes *nifH* foram amplificados e sequenciados (APÊNDICE C). A comparação das sequências de nucleotídeos de *nifH* com o banco de dados mostrou que as sequências geradas neste estudo apresentaram identidade de ao menos 84% com sequências de bactérias diazotróficas não cultivadas e cultivadas (Tabela 9).

**Tabela 9** - Análise de identidade baseada em nucleotídeos entre as sequências de *nifH* geradas nesse estudo (325 nt) com as depositadas no GenBank (NCBI)

Linhagem	*Sequências com maior identidade e cobertura (Blastn)	C (%)	I (%)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA350	Uncultured bacteria (HE803101)	100	90
	<i>Leptolyngbya</i> sp. LEGE 06188 (KC256766)	99	87
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA375	Uncultured bacteria (FN985215)	98	97
	<i>Anabaena</i> sp. LCRNK_23 (HQ836199)	96	88
Microchaetaceae CENA354	Uncultured bacteria (AY360969)	96	98
	<i>Tolypothrix</i> sp. JCT-1 (DQ531682)	94	97
<i>Brasilonema</i> sp. CENA360	Uncultured bacteria (EF548044)	93	99
	<i>Mastigocladius laminosus</i> CCMEE 5319 (EF570568)	99	89
<i>Brasilonema</i> sp. CENA361	Uncultured bacteria (EF548051)	93	99
	<i>Anabaena azotica</i> FACHB-118 (DQ294218)	99	90
<i>Brasilonema</i> sp. CENA366	Uncultured bacteria (EF548093)	92	98
	<i>Fischerella</i> sp. Ind81 (JQ246560)	83	97
<i>Brasilonema</i> sp. CENA381	Uncultured bacteria (EF548051)	93	99
	<i>Anabaena azotica</i> FACHB-118 (DQ294218)	99	89
<i>Brasilonema</i> sp. CENA382	Uncultured bacteria (EF548044)	93	99
	<i>Mastigocladius laminosus</i> CCMEE 5319 (EF570568)	99	89
Nostocaceae CENA352	Uncultured bacteria (JX268478)	99	98
	<i>Nostoc</i> sp. PTV (JQ259186)	99	98
<i>Nostoc</i> sp. CENA356	Uncultured bacteria (EF988407)	99	96
	<i>Nostoc</i> sp. LEGE 06150 (KC256764)	99	95

*Continua*

<b>Linhagem</b>	<b>*Sequências com maior identidade e cobertura (Blastn)</b>	<i>Continuação</i>	
		<b>C (%)</b>	<b>I (%)</b>
Nostocaceae CENA357	<i>Anabaena</i> sp. II (AF124378) <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 (CP003642)	99 100	93 93
Nostocaceae CENA358	Uncultured bacteria (DQ480994) <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)	99 99	95 95
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA362	Uncultured bacteria (JX268478) <i>Nostoc</i> sp. 'J. Gallon' (L15551)	99 99	98 98
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA363	Uncultured bacteria (JX268478) <i>Nostoc</i> sp. 'J. Gallon' (L15551)	99 98	98 98
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA365	Uncultured bacteria (EU048129) <i>Calothrix</i> sp. PCC 7507 (CP003943)	99 99	97 90
Nostocaceae CENA368	<i>Anabaena</i> sp. II (AF124378) <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 (CP003642)	99 100	93 93
Nostocaceae CENA369	Uncultured bacteria (JF827764) <i>Anabaenopsis</i> sp. NRE1 (AY461415)	99 98	85 84
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA371	Uncultured bacteria (JN887876) <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP00103)	99 99	94 94
Nostocaceae CENA373	Uncultured bacteria (EF548110) <i>Anabaena</i> sp. CH1 (DQ294217)	91 98	91 85
Nostocaceae CENA376	<i>Anabaena</i> sp. II (AF124378) Uncultured bacteria (DQ250415)	99 98	94 93
<i>Nostoc</i> sp. CENA377	Uncultured bacteria (DQ480994) <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)	99 100	94 94
Nostocaceae CENA379	Uncultured bacteria (EF548110) <i>Anabaena</i> sp. PO1 (EU381351)	91 98	91 84
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA383	Uncultured bacteria (JX268478) <i>Nostoc</i> sp. 'J. Gallon' (L15551)	99 99	98 98
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA386	Uncultured bacteria (JX268478) <i>Nostoc</i> sp. 'J. Gallon' (L15551)	99 99	98 98
Nostocaceae CENA388	<i>Anabaena</i> sp. II (AF124378) Uncultured bacteria (KC412108)	100 97	94 92
Nostocaceae CENA389	Uncultured bacteria (JF827764) <i>Mastigocladius laminosus</i> CCMEE 5201 (EF570553)	100 98	85 84

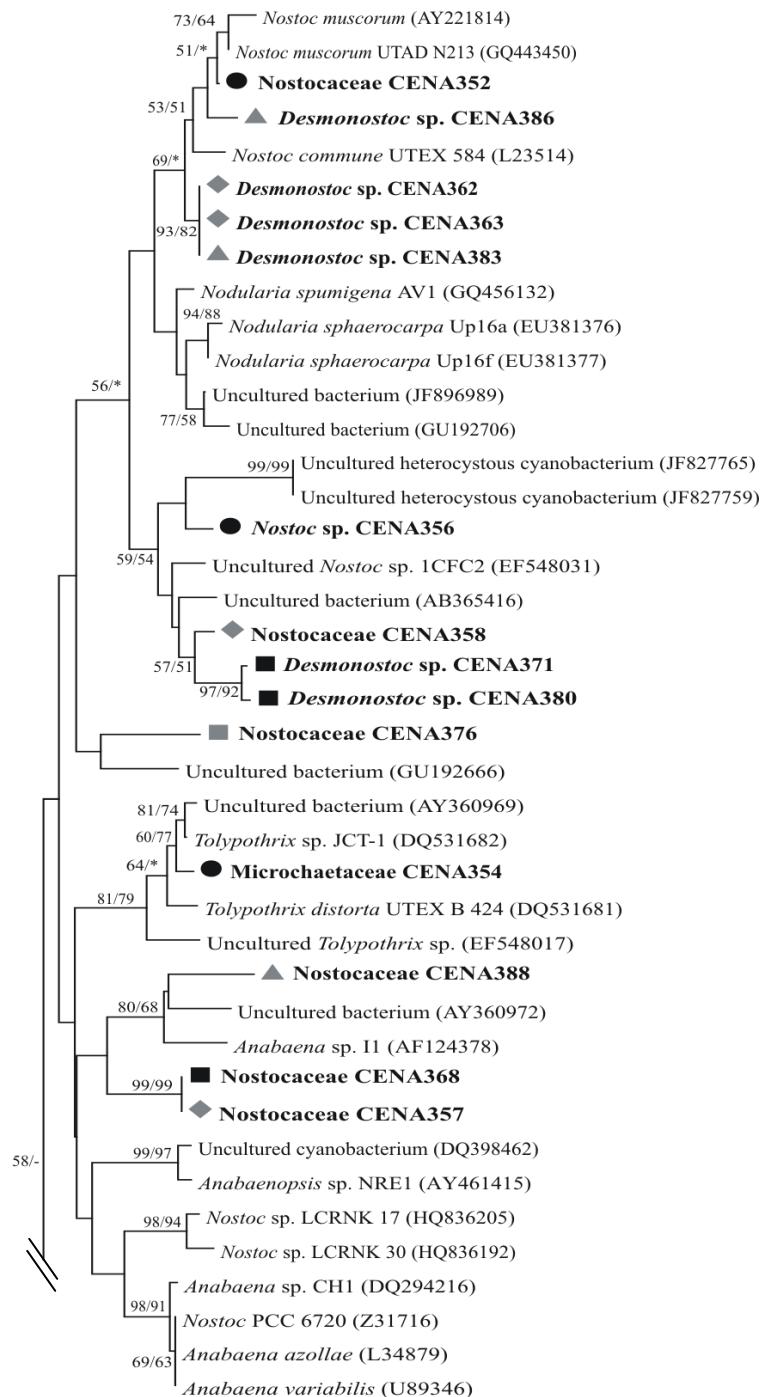
\* Considerando ao menos uma linhagem cultivada.

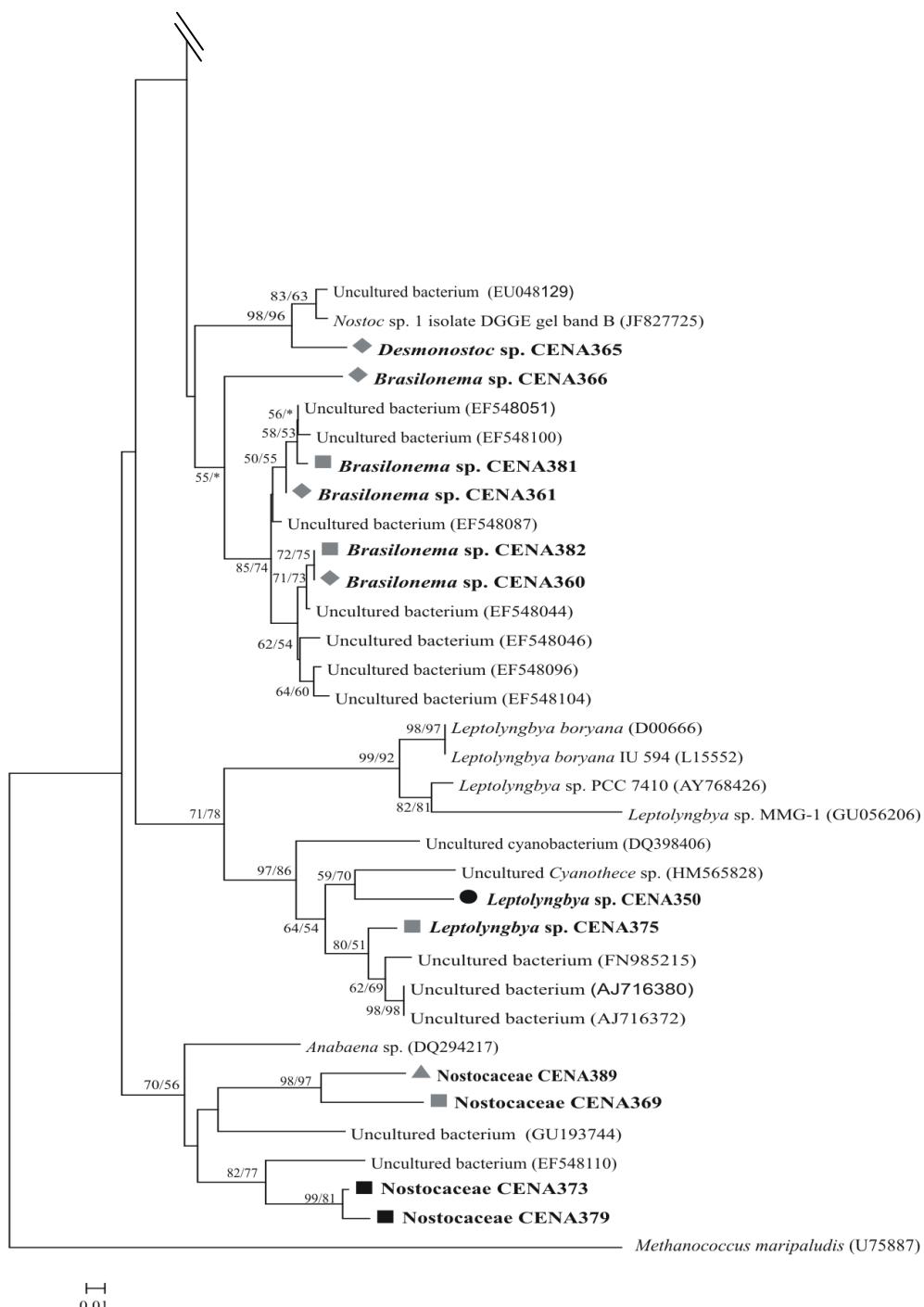
A distribuição filogenética do gene *nifH* das linhagens mostrou uma clara separação entre as linhagens homocitadas e heterocitadas (Fig. 21). Ainda, houve uma certa coerência entre a topologia obtida com a identificação das linhagens ao nível de família para as *Brasilonema* spp. (Scytonemataceae) e Microchaetaceae CENA354. Contudo, as linhagens da família Nostocaceae distribuíram-se em diversos clados ao longo de toda a árvore filogenética, agrupando-se diferentemente dos padrões obtidos na filogenia baseada no 16S rRNA (Figura 13). Tal resultado ilustra uma grande diversidade do gene *nifH*, e consequentemente, uma plasticidade funcional na FBN por membros dessa família.

As *Brasilonema* spp. agruparam-se em um clado formado exclusivamente por sequências oriundas de filosfera. Do mesmo modo, *Nostoc* sp. CENA356, Nostocaceae CENA358, *Desmonostoc* sp. CENA371 e CENA380 agruparam-se em um clado formado por sequências obtidas em ambientes epífíticos. Já Nostocaceae CENA369, CENA373, CENA379 e CENA389 agruparam-se com sequências oriundas de ambientes epífíticos e de biofilme. Esses dados nos mostram uma tendência de agrupamento influenciada pelo ambiente, que pode ser explicada por convergência adaptativa, ou seja, as pressões seletivas comuns a esses ambientes determinaram a seleção de sequências gênicas similares, que conferem vantagens adaptativas na FBN aos organismos desses ambientes (YOUNG, 2000).

O gene *nifH* é amplamente distribuído dentro do domínio Bacteria e atualmente é o mais utilizado em estudos de caracterização de comunidades diazotróficas. É um dos genes envolvidos na FBN com maior número de sequências depositadas nos bancos de dados públicos, com 32.852 sequências no banco de dados de genes funcionais *FunGene* (versão 7.3 de 17/02/2013, <http://fungene.cme.msu.edu/index.spr>). A maioria das sequências de *nifH* de cianobactérias disponíveis são de organismos não cultivados, de modo que informações acerca desse gene em linhagens isoladas são escassas. Este é o primeiro trabalho que caracteriza o gene *nifH* em isolados da fiosfera da Mata Atlântica, e o segundo que o faz com linhagens brasileiras (GENUÁRIO, 2010).

De modo geral, observamos uma baixa correlação entre o perfil filogenético observado para o gene 16S RNAr e *nifH*. Assim sendo, o uso do gene *nifH* como marcador filogenético deve ser realizado com cautela nas inferências ao nível genérico em Cyanobacteria, principalmente quanto se trata de linhagens de ambientes epífíticos e tropicais, sobre os quais ainda temos poucas informações disponíveis, quando comparadas às linhagens de água doce e de regiões temperadas. Essa baixa relação entre o perfil filogenético dos genes 16S RNAr e *nifH* já foi relatado por Genuálio (2010) em um estudo com linhagens isoladas do manguezal brasileiro.



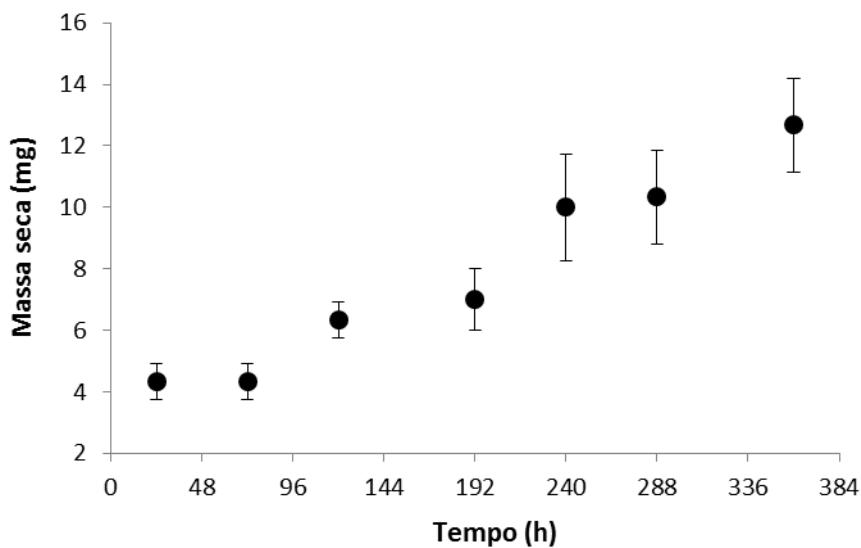


**Figura 21** - Árvore filogenética do gene *nifH*. As linhagens sequenciadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% segundo método nas análises de *neighboor joining* (NJ)/ máxima verossimilhança (ML) estão apresentados. \* indica reamostragem < 50%. O caracter □ indica os isolados de *E. edulis*, Δ de *G. opposita*, ○ de *M. neesii* e ◇ de *G. gardneriana*; sendo em preto os do núcleo Sta. Virgínia e em cinza os de Picinguaba

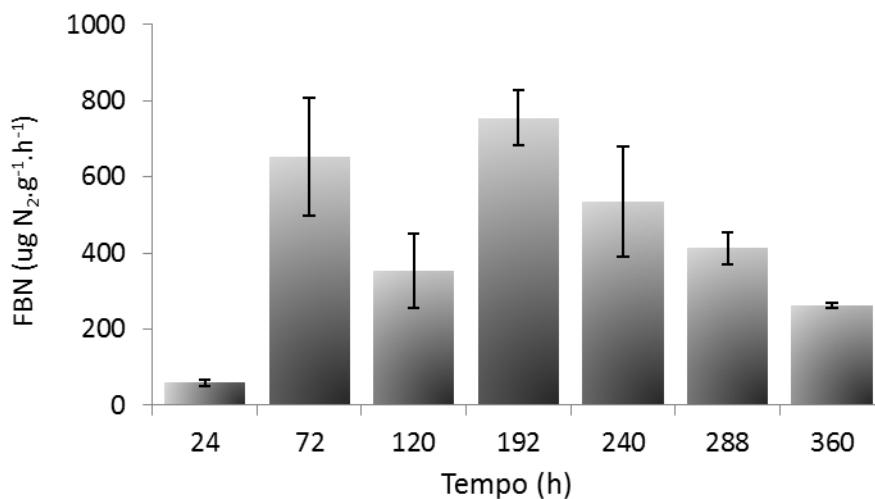
#### 6.4 Fixação biológica do nitrogênio pela linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico pela linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362 foi determinada ao longo de 15 dias de cultivo. Em relação ao crescimento, a linhagem apresentou uma fase lag até 72 horas, seguida por uma sucessão alternada entre fases de crescimento exponencial (fase log) (Figura 22). Esse padrão de crescimento já foi observado em outros estudos (FIORE et al., 2005; VAZ, 2010) para micro-organismos dessa família e pode ser explicado pela sua variação morfológica e pela variação na conformação dos agregados formados. Em nenhum dos pontos observamos homogeneidade nos tipos celulares presentes na cultura em desenvolvimento, de modo que hormogônios, acinetos, tricomas vegetativos com e sem heterócitos, livres ou coloniais, foram observados em todas as fases do crescimento. A predominância de uma forma sobre as demais não foi quantificada. Entretanto, observamos que as fases de crescimento exponencial estiveram sempre associadas ao desenvolvimento de hormogônios, enquanto que as demais fases relacionavam-se à diferenciação de heterócitos e conformação em densas colônias.

As taxas de FBN obtidas variaram de 59  $\mu\text{g N}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , valor obtido após 24 h, até o máximo de 755  $\mu\text{g N}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  após 192 h (Figura 23). Esses valores são altos, quando comparados com outras linhagens diazotróficas de cianobactérias. Genuário (2010) estimou a FBN em linhagens de *Nostoc* sp. isoladas de solos de manguezal e encontrou valores variando de 18 a 76 pmol  $\text{N}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Contudo, o autor coloca que essas linhagens apresentam baixa atividade específica comparada com os dados disponíveis em literatura. Um fator que limita a comparação dos dados gerados com os disponíveis é a utilização de diferentes unidades para relacionar a atividade específica da nitrogenase, tais como proteína total, biomassa fresca (COMPAORÉ; STAL, 2010; HROUZEK; LUKESOVA; SIMEK, 2004) e clorofila-a (FIORE et al., 2005; OHKI; ZEHR; FUJITA, 1992; YUNES et al., 1990).



**Figura 22** – Curva de crescimento (massa seca) da linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362 ao longo de 15 dias. O desvio padrão está indicado pelas barras.



**Figura 23** - Taxas médias de fixação biológica do nitrogênio (FBN) ao longo de 15 dias pela linhagem *Desmonostoc* sp. CENA362. O desvio padrão está indicado pelas barras

Nos pontos iniciais, as maiores taxas de FBN sempre antecederam o crescimento da linhagem, mas este padrão desaparece a partir de 288 horas de cultivo. Esse perfil ilustra haver uma demanda de nitrogênio fixado para o crescimento da linhagem nas fases iniciais. Já nas fases seguintes, o crescimento não está correlacionado com a FBN. Essa correlação negativa sugere que a linhagem esteja utilizando nitrogênio estocado para seu crescimento.

Outro ponto a se considerar é que esse decréscimo nas taxas de FBN após 192 h sugere que a linhagem esteja caminhando para uma fase de diferenciação de acinetos, uma vez que sabe-se que diferenciação de acinetos pode ser estimulada em resposta à baixa quantidade de

$N_2$  (FAY; LYNN; MAJER, 1984). Essa hipótese foi corroborada pela morfologia da linhagem, que apresentou inúmeros tricomas em diferenciação para acinetos após 360h.

Os dados gerados demonstraram a alta eficiência de *Desmonostoc* sp. CENA362 em realizar a FBN e realçaram a necessidade de se conhecer alguns aspectos fisiológicos antes de estimar a real contribuição de uma linhagem no aporte de N.

## 6.5 Diversidade de diazotróficos na filosfera de *E. edulis*, *M. neesii* e *G. opposita*

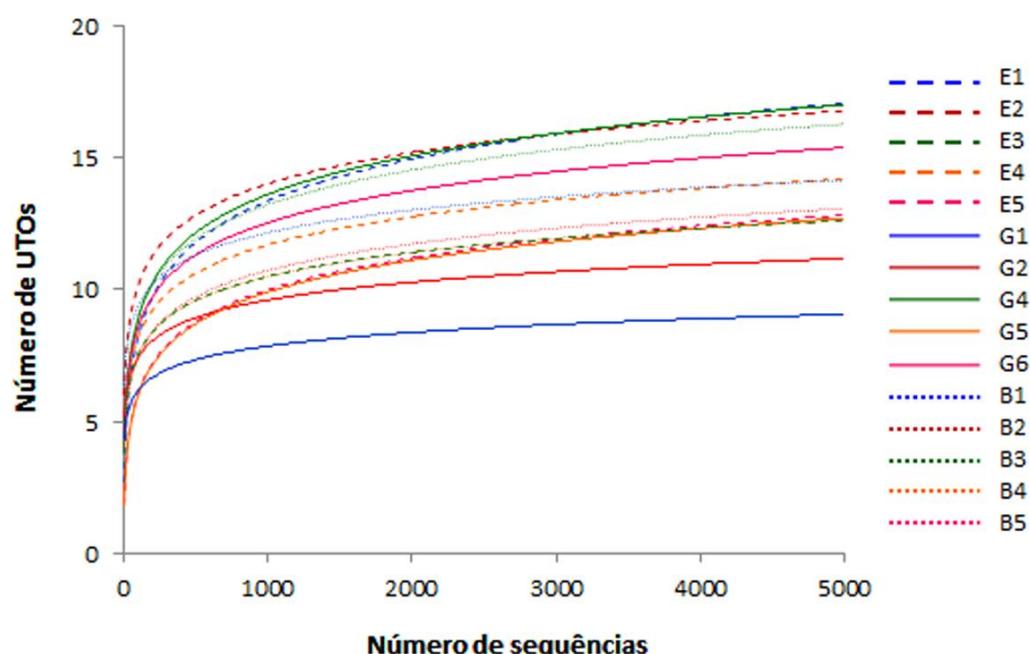
Concomitantemente ao desenvolvimento do nosso estudo, foi realizada uma ampla avaliação acerca da diversidade bacteriana e FBN na Mata Atlântica (GÓMEZ, 2012). Nesse trabalho, a autora mostrou haver uma variação na FBN na filosfera de três das espécies de plantas utilizadas em nosso estudo, de modo que, independente da estação do ano, a FBN foi sempre maior em *M. neesii*, seguida por *G. opposita* e *E. edulis*. Na tentativa de se caracterizar essa comunidade diazotrófica e tentar entender a variação observada na FBN baseando-se na avaliação dos grupos bacterianos diazotróficos presentes, foi realizado o sequenciamento massivo do gene *nifH* a partir do DNA total extraído da filosfera dessas espécies.

Um total de 221.661 sequências foram geradas, com tamanho médio de 308 nt. Após a filtragem por tamanho e qualidade, esse valor foi reduzido a 142.190. As sequências de nucleotídeos foram então agrupadas a 80% identidade e geraram 40 UTOs. Todas as UTOs formadas por menos de 5 sequências foram excluídas das análises subsequentes visando a eliminação de possíveis erros, de modo que restaram 22 UTOs para as análises subsequentes (APÊNDICE D). Os dados foram então rarefeitos por reamostragem randômica de modo a se trabalhar com o mesmo número de sequências (5.000) por amostra, uma vez que sabe-se que as estimativas de riqueza são dependentes do esforço amostral (HUGHES et al., 2001).

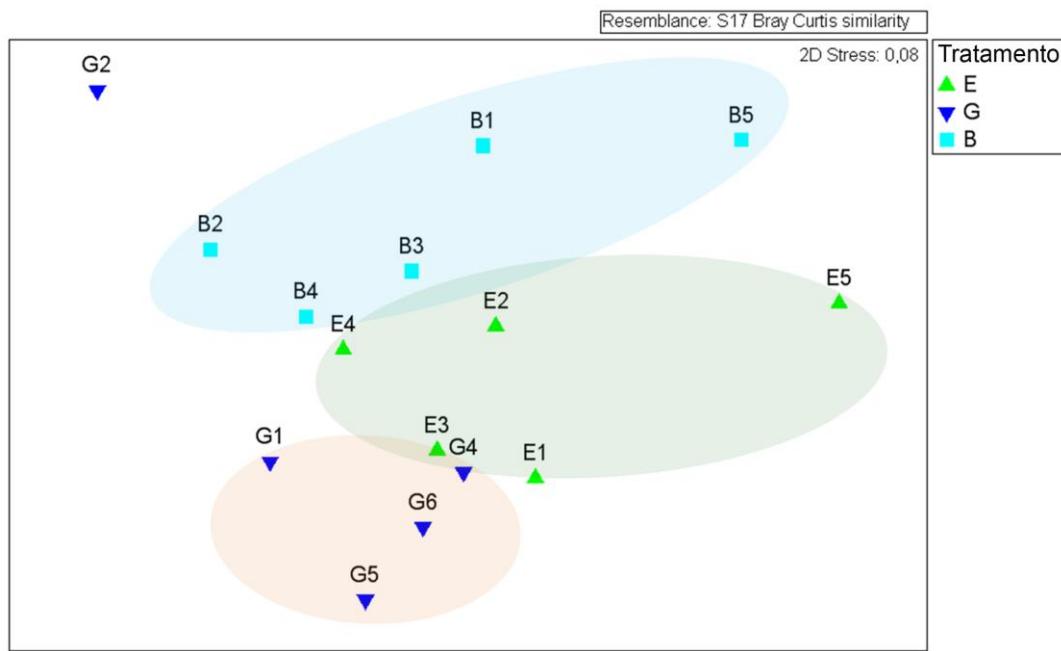
A curva de rarefação mostrou diferentes perfis de saturação, sugerindo uma variação na diversidade de *nifH* nas diferentes amostras, independentemente da espécie de planta (Figura 24). Todas as amostras tiveram altíssima cobertura ( $> 99\%$ ), indicando que a comunidade presente foi bem representada. A riqueza variou entre as espécies de planta, sendo maior em *M. neesii*, seguida por *G. opposita* e *E. edulis*. Entretanto, os índices de diversidade não foram dependentes da espécie de planta, o que indica a ausência de um efeito direto da espécie de planta na abundância dos diferentes grupos nas comunidades diazotróficas (Tabela 10). No trabalho desenvolvido por Gómez (2012), com o gene 16S RNAr, a riqueza e a diversidade

seguiram o mesmo padrão, sendo maiores em *M. neesii*, seguida por *G. opposita* e *E. edulis*, assim como as taxas de FBN observadas por Gómez (2012).

A influência da espécie de planta sobre a comunidade de diazotróficos pode ser visualizada também na análise de NMDS, onde, com exceção da amostra G2, os pontos referentes às amostras de cada espécie de planta apresentaram uma tendência a agrupamento (*stress* = 0,08) (Figura 25).



**Figura 24** - Curva de rarefação de *nifH* para as cinco amostras das três espécies de planta analisadas. Dados gerados após reamostragem para obtenção de mesmo número de sequência por amostra (5000). As UTOs foram geradas a 80% de identidade de nucleotídeos. B = *M. neesii*, G = *G. opposita* e E = *E. edulis*



**Figura 25** - Análise multivariada de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) considerando as cinco amostras das três espécies vegetais analisadas, onde B = *M. neesii*, G = *G. opposita* e E = *E. edulis*

**Tabela 10** - Estimativa de riqueza, índices de diversidade de *nifH* e cobertura das sequências geradas nas cinco amostras das três espécies vegetais analisadas

Amostra	Chao1	Índices de Diversidade		C
		Shannon	Simpson	
B1	18,0 <sup>a</sup>	1,8	0,6	0,99
B2	17,0 <sup>a</sup>	2,7	0,8	0,99
B3	16,0 <sup>a</sup>	1,7	0,6	0,99
B4	15,0 <sup>a</sup>	2,9	0,8	0,99
B5	15,0 <sup>a</sup>	1,5	0,4	0,99
G1	14,5 <sup>b</sup>	2,6	0,8	0,99
G2	14,0 <sup>b</sup>	3,0	0,8	0,99
G4	13,5 <sup>b</sup>	1,3	0,8	0,99
G5	13,5 <sup>b</sup>	1,2	0,4	0,99
G6	14,0 <sup>b</sup>	2,8	0,5	0,99
E1	12,0 <sup>c</sup>	2,4	0,7	0,99
E2	11,0 <sup>c</sup>	2,6	0,8	0,99
E3	10,0 <sup>c</sup>	1,9	0,6	0,99
E4	9,0 <sup>c</sup>	2,1	0,7	0,99
E5	8,0 <sup>c</sup>	2,0	0,7	0,99

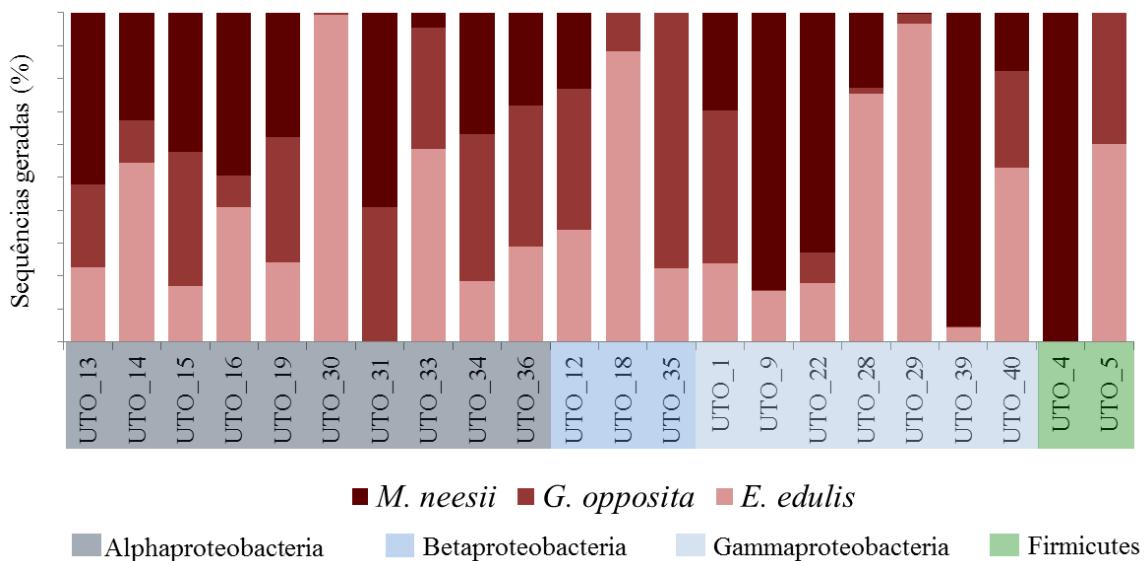
Letras iguais indicam que não houve diferença entre os valores comparados no teste de Tukey ( $p<0,05$ ). B = *M. neesii*; G = *G. opposita*; E = *E. edulis*. C = Cobertura estimada da amostra:  $C = 1/(Nx/n)$ , onde Nx é o número de sequências únicas e n o número total de sequências.

Para se determinar o valor de corte (*cutoff*) que permitisse melhor interpretação dos resultados gerados, foram testados em nosso trabalho também os valores de corte de 90 e 97% de identidade de sequência. O que observamos foi que ao agrupar sequências considerando uma maior identidade, o efeito da espécie de planta sobre a comunidade diazotrófica se mantém apenas para *M. neesii* a 90% e desaparece para todos os tratamentos a 97%. Optamos pelo valor de corte de 80% baseando-se em literatura (DIAS et al., 2012), e por ser este o que nos permitiu uma melhor visualização do efeito da espécie hospedeira sobre a comunidade diazotrófica. Pereira e Silva e colaboradores (2013) utilizaram valor de corte de 90% em análises baseadas em sequências de aminoácidos, nível de menor variação intrínseca.

O efeito de seleção da comunidade microbiana pela espécie de planta já foi reportado na Mata Atlântica (LAMBAIS, 2006; GONÇALVES, 2011; GOMÉZ, 2012). Nossos dados mostram haver também uma seleção funcional (da comunidade diazotrófica) exercida pela espécie de planta, de modo que as condições químicas (nutricionais e interacionais) e físicas (conformacionais e ambientais) às quais esses grupos são expostos no ambiente de filosfera de cada uma dessas espécies, module a sua ocorrência e, consequentemente, suas taxas de FBN. Contudo, outro estudo desenvolvido em filosfera de floresta tropical mostrou que a complexidade da comunidade diazotrófica não teve relação com as taxas de FBN e que a espécie de planta influenciou pouco a comunidade diazotrófica, de modo que as variações taxas de FBN foram atribuídas apenas à fatores ambientais (FURNKRANZ et al., 2008). Essas informações contrastantes indicam que mais estudos são necessários para o completo entendimento das vias de seleção e distribuição da comunidade diazotrófica da filosfera de diferentes espécies.

Para se determinar quais os grupos diazotróficos presentes, sequências representativas de cada UTOs foram selecionadas e comparadas com o banco de dados do NCBI (Blastx). Observou-se haver uma alta similaridade entre as sequências geradas e organismos não cultivados de diversos ambientes, tendo níveis de cobertura variando de 97 a 99% e identidade de 82 a 100% nas análises de Blast.

A maioria das UTOs (90%) afiliou-se ao filo Proteobacteria (Figura 26). Organismos desse filo já foram reportado como possíveis responsáveis por maiores taxas de FBN em ambiente de filosfera (FURNKRANZ et al., 2008; GOMÉZ, 2012). Goméz (2012) observou uma maior ocorrência de sequências de 16S rRNA oriundas de grupos diazotróficos afiliadas à esse filo em *M. neesii*, sugerindo que a diversidade desse filo esteja associada aos altos valores de FBN observados.



**Figura 26** - Distribuição e afiliação taxonômica das UTOs formadas a partir de mais de 5 sequências de *nifH* agrupadas a 80% de identidade de nucleotídeos, nas três espécies de planta estudadas.

Gaby e Buckley (2012) discutem a representatividade da comunidade diazotrófica em relação aos conjuntos de iniciadores disponíveis para o gene *nifH* e mostram as limitações de seu uso dependendo do grupo que se pretende acessar, assim como do ambiente em questão. Segundo os autores, os iniciadores PolF e PolR (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001) utilizadas em nosso estudo, têm baixa afinidade com os genes *nifH* cianobacterianos, de modo que os dados gerados subestimaram a diversidade de cianobactérias diazótroficas presente.

A não ocorrência de UTOs afiliadas ao filo Cyanobacteria, associada ao reduzido número de UTOs geradas (baixa riqueza) nos remete a questão da seletividade dos iniciadores utilizados para representar essa comunidade. No estudo conduzido por Gómez (2012) na filosfera da Mata Atlântica, mais de 150.000 sequências parciais de 16S rRNA foram geradas utilizando iniciadores universais, e dessas, apenas 1 a 2% corresponderam à cianobactérias. Paralelamente, Gonçalves (2011) descreveu uma rica e diversa comunidade cianobacteriana no mesmo ambiente, utilizando iniciadores grupo-específicos. Do mesmo modo, a combinação de iniciadores utilizada no presente estudo para a amplificação do gene *nifH* tem sido eficiente para representar a diversidade de diazotróficos em solo, onde *Proteobacteria* é dominante (DIAZ et al., 2012; PEREIRA; SILVA et al., 2013). Diversos estudos têm demonstrado que outros grupos bacterianos, além dos identificados neste estudo, podem ter papel relevante na FBN em ecossistemas tropicais. Dentre esses, as cianobactérias epífíticas hospedadas nas folhas e na casca, ou em associação com musgos e líquens (DELUCA, 2002; FREIBERG, 1998; FURNKRANZ et al., 2008).

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo gerou informações inéditas acerca dos micro-organismos que colonizam a filosfera de quatro espécies da Mata Atlântica brasileira:

- O isolamento e a análise da sistemática das linhagens isoladas permitiu a caracterização dos grupos de Cyanobacteria presentes nesse ambiente, incluindo novos táxons; além disso, gerou um banco de culturas específico da filosfera da Mata Atlântica.
- A busca por moléculas bioativas conhecidas selecionaram linhagens com potencial de produção de hormônios vegetais, toxina e inibidores de proteases, que poderão ser exploradas em estudos subsequentes.
- A caracterização das linhagens isoladas foi multidisciplinar, de modo que agregou informações fisiológico-funcionais às caracterizações e novidades taxonômicas (APÊNDICE E).
- A análise filogenética do gene *nifH*, associada à caracterização da sistemática das linhagens, demonstrou a necessidade de cautela no uso do gene *nifH* como marcador filogenético aplicado aos níveis taxonômicos inferiores (genéricos); além disso, esse conjunto de dados nutrirá o banco de dados públicos com sequências curadas oriundas de organismos cultivados da filosfera de um ambiente tropical.
- A análise da FBN por *Desmonostoc* sp. CENA362 evidenciou a eficiência desse gênero no processo e demonstrou que as estimativas de FBN devem ser sempre realizadas considerando-se a fase de desenvolvimento da linhagem.
- O pirosequenciamento do gene *nifH* contribuiu para o entendimento da distribuição da comunidade diazotrófica na filosfera da Mata Atlântica, tendo identificado uma relação entre riqueza e taxas de FBN, além da ocorrência de uma seleção espécie-específica da comunidade de Proteobacteria; além disso, esses dados também nutrirão o banco de dados públicos.

## REFERÊNCIAS

- ABRIL, A.B.; TORRES, P.A.; BUCHER, E.H. The importance of phillosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 21, p. 103-107, 2005.
- ACINAS, S.G.; MARCELINO, L.A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 2629–2635, 2004.
- 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.
- ALBERTANO, P.; KOVÁCIK, L. Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophyte) a homogeneous taxon? **Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 37-51, 1994.
- ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 4, p. 1-4, 1968.
- ALTSCHÜL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVARENGA, D.O. **Análise polifásica de cianobactérias da filosfera de Avicennia schaueriana**. 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 1. Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38-39, p. 291-302, 1985.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3. Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 50-53, p. 327-472, 1988.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- ANAHAS, A.M.P.; GAYATHRI, M.; MURALITHARAN, G. Isolation and characterization of microcystin-producing *Microcystis aeruginosa* MBDU 626 from a freshwater bloom sample in Tamil Nadu, South India. **Microbiological Research In Agroecosystem Management**, Cham, Switzerland, v. , p. 235-248, 2013.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145–180, 2000.
- ARAÚJO, L.L.A. **Complexidade da acumulação de elementos químicos por árvores nativas da Mata Atlântica**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Mata Atlântica:** as árvores e a paisagem. Porto Alegre: Paisagem do Sul, 2004. 393 p.

BAHL, J.; LAU, M.C.Y.; SMITH, G.J.D.; VIJAYKRISHNA, D.; CARY, S.C.; LACAP, D.C.; LEE, C.K.; PAPKE, R.T.; WARREN-RHODES, K.A., WONG, F.K.Y.; MCKAY, C.P.; POINTING, S.B. Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. **Nature Communications**, London, v. 2, art. 163, 6 p., 2011. DOI: 10.1038/ncomms1167.

BALDOTO, L.E.B.; OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 918-931, 2008.

BARRON, A.R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; WRIGHT, S.J.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geosciences**, v. 2, p. 42–45, 2008. DOI: 10.1038/ngeo366.

BEATTIE, G.A. Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 533–555, 2011.

BEN-PORATH, J.; ZHER, J. P. Detection and characterization of cyanobacterial *NifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 880-887, 1994.

BENTLEY, B.L. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St Louis, v. 74, p. 234-241, 1987.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.-B.; KÜPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, DC, v. 294, n. 5546, p. 1534-1537, 2001.

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.

BERTUGO, S.E.B. **Fixação biológica de nitrogênio e diversidade de bactérias diazotróficas numa floresta de restinga.** 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BILLI, D.; FRIEDMANN, E.I.; HOFER, K.G.; CAIOLA, M.G.; OCAMPO-FRIEDMANN, R. Ionizing-Radiation Resistance in the Desiccation-Tolerant Cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, n. 4, p. 1489–1492, 2000.

BISHOP, P.E.; JOERGER, R.D. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 109-125, 1990.

BISTER, B.; KELLER, S.; BAUMANN, H.I.; NICHOLSON, G.; WEIST, S.; JUNG, G.; SUSSMUTH, R.D.; JÜTTNER, F. Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of *Microcystis* PCC 7806. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, p. 1755–1757, 2004.

BOLD, H.D.; WYNNE, M.J. **Introduction to the algae, structure and reproduction**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 720 p.

BOLHUIS, H.; SEVERIN, I.; CONFURIUS-GUNS, V.; WOLLENZIEN, U.I.A.; STAL, L.J. Horizontal transfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 121-130, 2009. DOI: 10.1038/ismej.2009.99.

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, p. 783-790, 2010.

BOURRELY, P. **Les algues d'eau douce. Iniciação à la sistématic**. Tome III: Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptonomadines. Paris: Boubée & Cie, 1970. 512 p.

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.

BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3256–3263, 1998.

BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3614–3621, 2002.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 840–849, 2010.

BRUNO, L.; BILLI, D.; BELLEZZA, S.; ALBERTANO, P. Cytomorphological and genetic characterization of troglobitic *Leptolyngbya* strains isolated from Roman hypogea. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 608–617, 2009.

BUNSTER, L.; FOKKEMA, N.J.; SCHIPPERS, B. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, p. 1340–1345, 1989.

BURJA, A.M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteria – a profilic 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.

CAMPOS, M.C.R. Relação da composição e estrutura do componente arbóreo com variáveis microtopográficas e edáficas da Floresta Ombrófila Densa do Núcleo Picinguaba/PESM, Ubatuba/SP. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTTI, E.A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CAPONE, D.G.; ZEHR, J.P.; PAERL, H.W.; BERGMAN, B.; CARPENTER, E.J. Trichodesmium, a globally significant marine cyanobacterium. **Science**, Washington, DC, v. 276, n. 5316, p. 1221-1229, 1997.

CAPORASO, J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 7, p. 335–336, 2010.

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

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.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria, In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING,N.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Riverwoods, Ill: Williams & Wikkins, 1989. v. 3, p. 1710-1799.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford v. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.

CHOI, H.; OH, S.K.; YIH, W.; CHIN, J.; KANG, H.; RHO, J-R. Cyanopeptoline CB071: a cyclic depsipeptide isolated from the freshwater cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 56, p. 1191-1193, 2008.

CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S.; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H. GrassBase - The Online World Grass Flora. West Sussex: Kew Royal Botanical Gardens. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acesso em: 05 fev. 2014.

CLEVELAND, C.C. et al. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 13, n. 2, p. 623-645, 1999.

COCKELL, C.S.; STOKES, MD. Widespread colonization by polar hypoliths. **Nature**, London, v. 431, p. 414-415, 2004.

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

COMPAORÉ, J.; STAL, L.J. Oxygen and the light-dark cycle of nitrogenase activity in two unicellular cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 54-62, 2010.

CREWS TE. 1999. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: evolutionary versus ecological considerations. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, p. 233-246, 2009.

CUSACK, D.F.; SILVER, W.; McDOWELL, W.H. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystemlevel patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystems**, New York, v. 12, p. 1299-1315, 2009.

CZARNECKI, O.; HENNING, M.; LIPPERT, I.; WELKER, M. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2006.

DARRASSE, A.; DARSONVAL, A.; BOUREAU, T.; BRISSET, M.N.; DURAND, K.; JACQUES, M.A. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, p. 6787-6796, 2010.

DAUBIN, V.; MORAN, N.A.; OCHMAN, H. Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. **Science**, Washington, DC, v. 301, p. 829-832, 2003.

DELUCA, T.H.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.-C.; SELLSTEDT, A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. **Nature**, London, v. 419, p. 917-920, 2002.

DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. Nova Deli: ICAR Monographs, 1959. 686 p.

DIAS, A.C.F.; PEREIRA E SILVA, M.C.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JUNIOR, F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; VAN ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, n. 22, p. 7960–7967, 2012.

DOJANI, E.; LAKATOS, M.; RASCHER, U.; WANEK, W.; LUETTGE, U.; BUDEL, B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Kusterdingen, v. 202, n. 7, p. 521-529, 2007.

DOR, L.; CARL, N.; BALDINGER, I. Polymorphism and salinity tolerance as a criterion for differentiation of three new species of Chroococcidiopsis (Chroococcales). **Algological Studies**, Stuttgart, v. 64, p. 411–421, 1991.

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

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 2, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

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.

ELTINK, M.; TORRES, R.B.; RAMOS, E. *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. Biblioteca Digital de Ciências. Guia de Árvores da Mata Atlântica. Campinas: Instituto de Biologia, 2008. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/lte/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=670>. Acesso em: 05 fev. 2014.

ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R.; HANESSION, S. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. **Angewandte Chemie International**, Weinheim, v. 47, p. 1202-1223, 2008.

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DOHREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium Fischerella sp. CENA 19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, p. 237–243, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, 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, n. 3, p. 175-185, 1998.

FANTINI, A.C.; RIBEIRO, R.J.; GURIES, R.P. Produção de palmito (*Euterpe edulis Martius* - Arecaceae) na floresta ombrófila densa: potencial, problemas e possíveis soluções. *Sellowia*, n.49/52, p.256-80, 2000.

FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n.14, p. 4744–4749, 2010.

FARNELID, H.; ANDERSSON, A.F.; BERTILSSON, S.; AL-SOUD, W.A.; HANSEN, L.H.; SØRENSEN, S.; STEWARD, G.F.; HAGSTROM, A.; RIEMANN, L. Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 4, e.19223, 2001.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.

FAY, P.; LYNN, J.; MAJER, S.C. Akinete development in the planktonic blue-green alga *Anabaena circinalis*. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 163-173, 1984.

FETT, W.F.; OSMAN, S.F.; DUNN, M.F. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, p. 1839–1845, 1987.

FEWER, D.; FRIEDL, T.; BÜDEL, B. *Chroococcidiopsis* 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.

FEWER, D.P.; JOKELA, J.; PAUKKU, E.; ÖSTERHOLM, J.; WAHLSTEN, M.; PERMI, P.; AITIO, O.; ROUHIAINEN, L.; GOMEZ-SAEZ, G.V.; SIVONEN, K. New structural variants of aeruginosin produced by the toxic bloom forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, e.73618, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0073618.

FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183-193, 2007.

FOIRE, M.F.; ALVARENGA, D.O.; GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.D.; HAUER, T.; KOMÁREK, J. *Dactylothamnos* gen. nov. A novel member of Microchaetaceae isolated from extreme environments. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESEARCH, 19., 2013, Cleveland, Ohio.

FOIRE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N<sub>2</sub> por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (Ed.). **Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guáiba: Agrolivros, 2008. p. 69-95.

FOIRE, 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.

FOIRE, M.F.; NEILAN, B.A.; COPP, J.N.; RODRIGUES, J.L.M.; TSAI, S.M.; LEEB, H.; TREVORS, J.T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, New York, v. 39, p. 5017-5026, 2005.

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

FOSTER, R.A.; KUYPERS, M.M.M.; VAGNER, T.; PAERL, R.W.; MUSAT, N.; ZEHR, J.P. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. **The ISME Journal**, London, v. 5, p. 1484-1493, 2011.

FRANGEUL, L. et al. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC7806, an ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 274, 2008.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. **Oecologia**, Berlin, v. 117, p. 9-18, 1998.

FRITZ-SHERIDAN, R.P.; PORTÉCOP, J. Nitrogen fixation on the tropical volcano, La Soufrière (Guadeloupe): a survey of nitrogen fixation by blue-green algal microepiphytes and lichen endophytes. **Biotropica**, Washington, DC, v. 19, p. 194-199, 1987.

FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 75, p. 532-536, 1989.

FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAGANAWA, E.; HARADA, K. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. **Tetrahedron**, London, v. 56, p. 725-733, 2000.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 1995-2000**: Relatório final. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; INPE, 2013. 61 p.

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. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 561-570, 2008.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (Ed.). **Mata Atlântica**: biodiversidade, ameaças e perspectivas. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 3-11.

GALLOWAY, J.N.; DENTENER, F.J.; CAPONE, D.G.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R.W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VOROSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: Past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153-226, 2004.

GAMA JUNIOR, W.A. **Cianobactérias unicelulares e coloniais de ambientes terrestres de áreas da mata Atlântica no estado de São Paulo, Brasil.** 2012. 172 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2012.

GEHRING, C.; VLEK, P.L.G.; SOUZA, L.A.G. DENICH, M. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 111, p. 237-252, 2005.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: GRUNOW, A.; HAUCK, F.; LIMPRICHT, G.; LUERSSEN, Ch.; RICHTER, P.; WINTER, G. **Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland: Österreich und der schweiz.** Leipzig: Akademische Verlag, 1932. v. 14, p. 1-1196.

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

GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.; VAZ, M.G.M.V.; FIORE, M.F. Phylogeny of Nostocales cyanobacteria isolated from saline-alkaline lakes in Brazilian Pantanal wetlands. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESEARCH, 19., 2013, Cleveland, Ohio.

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

GENUÁRIO, D.B.; VAZ, M.G.M.V.; HENTSCHEKE, G.S.; SANT'ANNA, C.L.; FIORE, M.F. Antarctic Nostoc-like strains: phylogenetic coherent group distant related to the true Nostoc genus. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESEARCH, 19., 2013, Cleveland, Ohio.

GESNER-APTER, S., AND S. CARMELI. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 72, p.1429–1436, 2009.

GOLDBERG, R. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagem, v. 50, p. 261–264, 1980.

GÓMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica.** 2012. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GONÇALVES, N.J.N. **Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo.** 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GUNASEKERA, T.S.; SUNDIN, G.W. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 1073–1083, 2006.

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.

HALSEY, J.A. 2012. **Diversidade de bactérias associadas á cogumelos de Mata Atlântica no estado de São Paulo**. 2012. 114 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HARDY, R.W.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R. D. Application of acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 47-81, 1973.

HAUER, T.; MARES, J.; BOHUNICKÁ, M.; JOHANSEN, J. R. 2013. Cyanobacterial family Microchaetaceae: the next victim of the molecular era. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESEARCH, 19., 2013, Cleveland, Ohio.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1–21, 1998.

HICKS, D.; DUNCAN, M.J; JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, n. 10, p. 885-895. 1997.

HIROTA, M.M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (Ed.). **The Atlantic Forest of South America**: biodiversity status, trends and outlook. Washington: Island Press, 2003. p. 60-65.

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

HOFF-RISSETI, C. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Candidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HROUZEK, P.; LUKEŠOVÁ, A.; MAREŠ, J.; VENTURA, S. Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. **Fottea. Olomouc**, Praha, v. 13, n. 2, p. 201–213, 2013.

HROUZEK, P.; LUKESOVÁ, A.; SIMEK, M. Comparison of light and dark nitrogenase activity in selected soil cyanobacteria. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 49, n. 4, p. 435-440, 2004.

HROUZEK, P.; VENTURA, S.; LUKEŠOVÁ, A.; MUGNAI, M.A.; TURICCHIA, S.; KOMÁREK, J. Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and phenotypic variability. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 1-14, 2005.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

ININBERGS, K.; BAY, G.; RASMUSSEN, U.; WARDLE, D.A.; NILSSON, M.C. Composition and diversity of *NifH* genes of nitrogen-fixing cyanobacteria associated with boreal forest feather mosses. **New Phytologist**, London, v. 192, p. 507-517, 2011.

ISHIDA, K.; CHRISTIANSEN, G.; YOSHIDA, W.Y.; KURMAYER, R.; WELKER, M.; VALLS, N.; BONJOCH, J.; HERTWECK, C.; BÖRNER, T.; HEMSCHEIDT, T.; DITTMANN, E. Biosynthesis and structure of aeruginoside 126A and 126B, cyanobacterial peptide glycosides bearing a 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. **Chemistry & Biology**, London, v. 14, p. 565-576, 2007.

ISHIDA, K.; WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; CADEL-SIX, S.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E.; HERTWECK, C.; DE MARSAC, N.T. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 2017-2026, 2009.

ISHITSUKA, M.O.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 112, p. 8180-8182, 1990.

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

JACOBS, J.L.; CARROLL, T.L.; SUNDIN, G.W. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, p. 104-113, 2005.

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

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. **Composição florística, estrutura e funcionamento da floresta ombrófila densa nos núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia do Parque estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP.** III Relatório Anual da FAPESP. São Paulo: FAPESP, 2008. (Biota/FAPESP Processo n. 03/12.595-7).

JORDAN, C.; CASKEY, W.; ESCALANTE, G.; HERRERA, R.; MONTAGNINI, F.; TODD, R.; UKL, C. Nitrogen dynamics during conversion of primary Amazonian rain forest to slash and burn agriculture. **Oikos**, Copenhagem, v. 40, p. 131–139, 1983.

JORDANO, P. Geographical ecology and variation of plant-seed disperser interactions: southern Spanish junipers and frugivorous thrushes. In: FLEMING T.H.; ESTRADA, A. (Ed.). **Frugivory and Seed Dispersal: Ecological and Evolutionary Aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. v. 107/108, p. 85-104.

JUNGBLUT, A.D.; LOVEJOY, C.; VINCENT, W.F. Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 191–202, 2010.

KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, Tokyo, v. 14, p. 247-256, 2007.

KAPUŚCIK, A.; HROUZEK, P.; KUZMA, M.; BÁRTOVÁ, S.; NOVÁK, P.; JOKELA, J.; PFLÜGER, M.; EGER, A.; HUNDSBERGER, H.; KOPECKÝ, J. Novel Aeruginosin-865 from *Nostoc* sp. as a Potent Anti-inflammatory Agent. **Chembiochem**, Weinheim, v. 14, n. 17, p. 2329-2337, 2013. DOI: 10.1002/cbic.201300246.

KLAPPENBACH, J.A.; SAXMAN, P.R.; COLE, J.R.; SCHMIDT, T.M. RRNDB: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 181–184, 2001.

KOMÁREK, J. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. **Algae**, Korea, v. 21, p. 349-375, 2006.

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

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustave Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

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

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4 – Nostocales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 56, p. 247-354, 1989.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz** - On-line database of cyanobacterial genera. Word-wide electronic publication, University of South Bohemia & Institute of Botany AS CR. Disponível em: <http://www.cyanodb.cz>. Acesso em: 15 jun. 2011.

KOMÁREK, J.; ZAPOMELOVÁ, E.; HINDÁK, F. *Cronbergia* gen. nov., a new cyanobacterial genus (Cyanophyta) with a special strategy of heterocyte formation. **Cryptogamie, Algologie**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 321–341, 2010.

LAGESEN, K.; HALLIN, P.F.; RØDLAND, E.; STÆRFELDT, H.H.; ROGNES, T.; USSERY, D.W. RNammer: consistent annotation of rRNA genes in genomic sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 9, p.3100-3108, 2007.

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.

LAMMERS, P.J.; HASELKORN, R. Sequence of the *nifD* gene coding for the alpha subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 80, p. 4723-4727, 1983.

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

LATYSHEVA, N.; JUNKER, V.L.; PALMER, W.J.; CODD, G.A.; BARKER, D. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 603–606, 2012.

LEITÃO-FILHO, H.F. Diversity of arboreal species in Atlantic Rainforest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 91-96, 1994.

LESSER, M.P.; MAZEL, C.H.; GORBUNOV, M.Y.; FALKOWSKI, P.G. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. **Science**, Washington, DC, v. 305, n. 5686, p. 997-1000, 2004.

LEVEAU, J.H.J. Microbial communities in the phyllosphere. In: RIEDERER, M.; MÜLLER, C. (Ed.). **Biology of the plant cuticle**. Oxford: Blackwell, 2006. p. 334–367.

LI, Z.; YU, J.; KIM, K.; BRAND, J. Nitrogen fixation by a marine non-heterocystous cyanobacterium requires a heterotrophic bacterial consort. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 1185–1193, 2010.

LIMA, J.E. **Diversidade de bactéria e Archaea em solos de mata Atlântica no estado de São Paulo**. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 1875-1883. 2003.

LINDOW, S.E.; DESURMONT, C.; ELKINS, R.; MCGOURTY, G.; CLARK, E.; BRANDL, M.T. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 1149-1157, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 357 p.

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

LUKEŠOVÁ, A.; JOHANSEN, J.R.; MARTIN, M.P.; CASAMATTA, D.A. *Aulosira bohemensis* sp. nov.: further phylogenetic uncertainty at the base of the Nostocales (Cyanobacteria). **Phycologia**, Berkeley, v. 48, p. 118-129, 2009.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 177 p.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 11, p. 634-642, 1998.

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

MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUEK, P.M.; CUEVAS, E.; McDOWELL, W.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C.; TRESEDER, K. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 45-65, 1999.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serrapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, Estado de São Paulo**. 2010. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MATERN, U.; SCHLEBERGER, C.; JELAKOVIC, S.; WECKESSER, J.; SCHULZ, G.E. Binding structure of elastase inhibitor scyptolin A. **Chemistry & Biology**, London, v. 10, p. 997-1001, 2003.

MATZEK, V.; VITOUEK, P. Nitrogen fixation in bryophytes, lichens, and decaying wood along a soil-age gradient in Hawaiian montane rain forest. **Biotropica**, Washington, DC, v. 35, p. 12-19, 2003.

MAZUR, B.J.; CHUI, C.F. Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 79, p. 6782-6786, 1982.

MAZUR-MARZEC, H.; KACZKOWSKA, M.K.; BLASZCZYK, A.; AKCAALAN, R.; SPOOF, L.; MERILUOTO, J. Diversity of Peptides Produced by *Nodularia spumigena* from Various Geographical Regions. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, p. 1-19, 2013. doi:10.3390/md11010001.

MCFADDEN, G. I. Chloroplast Origin and Integration. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 125, p. 50-53, 2001.

MECHABER, W.L.; MARSHALL, D.B.; MECHABER, R.A.; JOBE, R.T.; CHEW, F.S. Mapping leaf surface landscapes. **Proceedings of the National of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 93, p. 4600-4603, 1996.

MEVARECK, M.; RICE, D.; HASELKORN, R. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *NifH* gene coding for nitrogenase reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 77, p. 6476-6480, 1980.

MEYER, K.M. LEVEAU, J.H. Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts. **Oecologia**, Berlin, v. 168, p. 621–629, 2012.

MIRANDA, C.C.; CANELLAS, L.P.; TRINDADE NASCIMENTO, M. Caracterização da matéria orgânica do solo em fragmentos de Mata Atlântica e em plantios abandonados de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 905-916, 2007.

MISCOE, H.L.; JOHANSEN, J.R.; PIETRASIAK, N.; SHERWOOD, A.R. 2013. Strenomitos rutilans Miscoe et Johansen gen. et sp. nov.: a new táxon from Waikapala‘e cave, Kauai, Hawaii. In: In: **SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESEARCH**, 19., 2013, Cleveland, Ohio.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 134–143, 1996.

MORRIS, C.E.; KINKEL, L.L. Fifty years of phylosphere microbiology: significant contributions to research in related fields, p. 365–375. In: LINDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOTT, V. (Ed.). **Phyllosphere microbiology**. St. Paul: APS Press, 2002.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.-M.; JACQUES, M.-A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4789–4795, 1998.

MURAKAMI, M.; SUN, Q.; ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; OKINO, T.; YAMAGUCHI, K. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). **Phytochemistry**, Lancaster, v. 45, p. 1197–1202, 1997.

MURRAY, R.G.B.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; DE VOS, P.; GOODFELLOW, M.; GRIMONT, P.A.D.; PFENNIG, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARZIN, G.A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 40, p. 213–215, 1990.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 373-384, 1996.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; STOTTS, R.R.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. **Journal of Organic Chemistry**, Baltimore, v. 57, p. 866-872, 1992.

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.

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, p. 3227-3332, 1997.

OHKI, K.; ZEHR, J.P.; FUJITA, Y. *Trichodesmium*: Establishment of culture and characteristics of N<sub>2</sub>-fixation. In: CARPENTER, E.J.; CAPONE, D.G.; RUETER, J.G. (Ed.). **Marine pelagic cyanobacteria: Trichodesmium** and other diazotrophs. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. p. 307-318.

OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, London, v. 51, p. 10679-10686, 1995.

OLSON, J.B.; STEPPE, T.F.; LITAKER, R.W.; PAERL, H.W. N<sub>2</sub>-Fixing Microbial Consortia Associated with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 231-238, 1998.

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.

ORME-JOHNSON, W.H. Nitrogenase structure: Where to now? **Science**, Washington, DC, v. 257, p. 1639-1640, 1992.

PAPAEFTHIMIOU, D.; HROUZEK, P.; MUGNAI, M.A.; LUKESOVA, A.; TURICCHIA, S.; RASMUSSEN, U.; VENTURA, S. Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 553-564, 2008.

PARIS, R.; LAMATTINA, L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 8, p. 753-760, 1999.

PAUL, S.; DUTTA, A.; BAG, S.K.; DAS, S.; DUTTA, C. Distinct, ecotype-specific genome and proteome signatures in the marine cyanobacteria Prochlorococcus. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 103-117, 2010.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, p. 1650-1680, 2010. doi:10.3390/md8051650.

PEREIRA E SILVA, M.C.; SCHLÖTER-HAI, B.; SCHLÖTER, M.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, e. 74500, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0074500.

PEREIRA E SILVA, M.C.; SCHLÖTER-HAI, B.; SCHLÖTER, M.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, e. 74500, 2013.

PERKERSON III, R.B.; JOHANSEN, J.R.; KOVÁCIK, L.; BRAND, J.; KASTOVŠKÝ, J.; CASAMATTA, D.A. A unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen.nov. based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 47, p. 1397–1412, 2011.

POINTING, S.B.; CHAN, Y.; LACAP, D.C.; LAU, M.C.Y.; JURGENS, J.A.; FARRELL, R.L. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, p. 19964–19969, 2009.

POLY, F.; MONROZIER, J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, p. 95–103, 2001.

PRINSEP, M.R.; CAPLAN, F.R.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L.; HONKANEN, R.E.; BOYNTON, A.L. Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. **Phytochemistry**, Lancaster, v. 31, p. 1247-1248, 1992.

RADAU, G.; SCHERMULY, S.; FRITSCHE, A. New cyanopeptide-derived low molecular weight inhibitors of trypsin-like serine proteases. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 336, p. 300-309, 2003.

RAI, A.N. **CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 253p.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHAINEN, 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.

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, p. 2885–2893, 2010.

REDFORD, A.J.; FIERER, N. Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 189–198, 2009.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. **Biotropica**, Washington, DC, v. 39, p. 585–592, 2007.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. **Ecology**, Brooklyn, v. 89, p. 2924–2934, 2008.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GUERRA, M.P.; MANTOVANI, A. Management and conservation of natural populations in Atlantic rain forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**, Washington, DC, v. 32, n. 4b, p. 894-902, 2000.

REITZ, R. Nictagináceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1970. 52 p.

RESHEF, V.; CARMELI, S. New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, London, v. 62, p. 7361–7369, 2006.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?: implications for conservation. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, p. 1144-1156, 2009.

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; CAVALCANTE, A.; DIAS, F.; MELO, I.S.; KENT, A; FIORE, M.F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove Forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 312–322, 2012.

RIOS RUIZ, W.F. **Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica**. 2010. 108p. 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.

ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L.; PASSAGLIA, L.M.P.; SELBACH, P.A.; SACCOL, D.E.; SA, E.L.; OLIVERIA DE CAMARGO, F.A. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 967–974, 2006.

ROGGY, J.C.; PREVOST, M.F.; GARBAYE, J.; DOMENACH, A.M. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using delta N-15. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 15, p. 1–22, 1999.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; HANSEN, P.E.; ZHANG, W.; CZARNECKI, O.; HENNING, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; NEILAN, B.A.; KAEBERNICK, M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1757–1770, 2003.

ROSKOSKI, J.P. Nitrogen fixation in hardwood forests of the northeastern United States. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 54, p. 33–44, 1980.

ROUHAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIAINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 156–167, 2000.

ROUND, T.B.; ROHRLACK, T.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Comparison of cyanopeptolin genes in *Planktothrix*, *Microcystis*, and *Anabaena* strains: evidence for independent evolution within each genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 7322–7330, 2007.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, T.M.P.; FIORE, M.F.; LORENZI, A.S.; KAŠTOVSKÝ, J.; KOMÁREK, J. Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 51–62, 2011.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, T.M.P.; KAŠTOVSKÝ, J.; KOMÁREK, J. Two form-genera of aerophytic heterocytous cyanobacteria from Brasilian rainy forest; Mata Atlântica. **Fottea**, Praha, v. 10, n. 2, p. 217–228, 2010.

SCHATTNER, P.; BROOKS, A.N.; LOWE, T.M. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. W686–689, 2005.

SCHINNER, F.; OHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. **Methods in soil biology**. Heidelberg: Springer, 1995. 426 p.

SCHIRRMEISTER, B.E.; ANISIMOVA, M.; ANTONELLI, A.; BAGHERI, H.C. Evolution of cyanobacterial morphotypes: Taxa required for improved phylogenomic approaches. **Communication and Integration Biology**, v. 4, n. 4, p. 424–427, 2011.

SCHLESINGER, W.H.; PIPPEN, J.S.; WALLENSTEIN, M.D.; HOFMOCKEL, K.S.; KLEPEIS, D.M.; MAHALL, B.E. Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, southern Mojave Desert. **Ecology**, Brooklyn, v. 84, p. 3222–3231, 2003.

SCHOPF, J.W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 112, p. 13-32, 1996.

SCHOPF, J.W.; WALTER, M.R. Origin and early evolution of Cyanobacteria: the geological evidence. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. (Ed.). **The biology of Cyanobacteria**. Oxford: Blackwell, 1982. p. 543-564.

SCHREIBER, L.; KRIMM, U.; KNOLL, D.; SAYED, M.; AULING, G.; KROPSENSTEDT, R.M. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. **New Phytologist**, London, v. 166, p. 589–594, 2005.

SECKBACH, J. **Enigmatic microorganisms and life in extreme environments**. Heidelberg: Springer, 2003. 687 p. (Series Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, 1).

SERGEVA, 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.

SHERMAN, L.A.; MEUNIER, P.; COLÓN-LÓPEZ, M.S. Diurnal rhythms in metabolism: a day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 58, p. 25-42, 1998.

SHIN, H.J.; MURAKAMI, M.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, K. Microviridins D-F, serine protease inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agarghii* (NIES-204). **Tetrahedron**, London, v. 52, n. 24, p. 8159-8168, 1996.

SILVA-STENICO, M. E.; RIGONATO, J.; LEAL, M.G.; VAZ, M.G.M.V.V.; ANDREOTE, A.P.D.; FIORE, M.F. Non-Ribosomal Halogenated Protease Inhibitors from Cyanobacterial Isolates as Attractive Drug Targets. **Current Medical Chemistry**, Schiphol, v. 19, n. 30, p. 5205-5213, 2012.

SILVA-STENICO, M.E.; PACHECO, F.T.H.; RODRIGUES, J.L.M.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 429-436, 2005.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 166, p. 161-175, 2011.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.

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.

SINGH, A.; AGRAWAL, M. Acid rain and its ecological consequences. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 29, n. 1, p. 15-24, 2008.

- SMITH, A.J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. **Annals of Microbiology**, Paris, v. 134B, p. 93-113, 1983.
- SODERLAND, R.; ROSSWALL, T. The nitrogen cycle. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **The natural environment and biogeochemical cycles**. New York: Springer, 1982. p. 61-81.
- STACKEBRAND, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: a proposal for place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 44, p. 846-849, 1994.
- STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 179-211, 1997.
- STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DE WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 9, p. 5157-5169, 2003.
- TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 42, p. 1257-1270, 2006.
- TER BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO reference manual and CANOCODraw for Windows user's guide**: software for canonical community ordination. IthacaNY: Microcomputer Power, 2002. 500 p.
- TOOMING-KLUNDERUD, A.; ROHRLACK, T.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. **Microbiology**, Reading, v. 153, p. 1382-1393, 2007.
- TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 11, p. 13-52, 1997.
- VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, Dordrecht, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, 2004.
- VAZ, M.G.M.V. **Diferenciação celular em *Nostoc* spp.**: efeito da intensidade luminosa e do padrão de sobreposição dos filamentos. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

VETROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, e. 57923, 2013.

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.; SPREN, J. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 58, p. 1–45, 2002.

VITOUSEK, P.M.; HOWARTH, R.W. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.

VITOUSEK, P.M.; SANFORD, R.L. Nutrient cycling in moist tropical forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 137–167, 1986.

VON ELERT, E.; OBERER, L.; MERKEL, P.; HUHN, T.; BLOM, J.F. Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA Cya 43. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 68, p. 1324–1327, 2005.

VORHOLT, J.A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 828-840, 2012.

WARREN-RHODES, K.A. et al. Hypolithic bacteria, dry limit of photosynthesis and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 389–398, 2006.

WATERBURY, J.B. The cyanobacteria – isolation, purification and identification. In: DWORAKIN, 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.

WATERBURY, J.B.; STANIER, R., Patterns of Growth and Development in Pleurocapsalean Cyanobacteria. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 42, p. 2–44, 1978.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHESKY, M.I.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRAND, E.; STARR, M.P.; TRÜPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 37, p. 463–464, 1987.

WELKER, M.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I.; VON DÖHREN, H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 1785–1796, 2004.

WELKER, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H. Applications of MALDI-TOF MS Analysis in Cyanotoxin Research. **Environmental Toxicology**, New Jersey, v.17, p. 367–374, 2002.

WELKER, M.; VON DOHREN, H. Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 530–563. 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.
- WILKINSON, C.R.; FAY, P. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. **Nature**, London, v. 279, p. 527–529, 1979. doi:10.1038/279527a0.
- WOLK, C.P.; ERNST, A.; ELHAI, J. Heterocysts metabolism and development. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **Molecular biology of the Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 769-823.
- WRIGHT, E.S.; YILMAZ, L.S.; NOGUERA, D.R. DECIPHER - A search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 2012. doi:10.1128/AEM.06516-11.
- YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere population is more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, p. 3889-3894, 2001.
- YOUNG, J.P.W. Molecular evolution in diazotrophs: do the genes agree? In: Pedrosa, F. O.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 161-164.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. London: Chapman & Hallp, 1992. p. 43-86.
- YU, J.; PENALOZA-VAZQUEZ, A.; CHAKRABARTY, A.M.; BENDER, C.L. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 712–720, 1999.
- YUNES, J.S.; SUZUKI, M.T.; SILVERA, A.G.; CAMARGO, M.; WERNER, V.R. Cianobactérias fixadoras d nitrogênio do estuário da lagoa dos Patos, RS: *Nostoc muscorum*. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 375-383, 1990.
- ZAIDI, S.H.E.; HUI, C.-C.; CHEAH, A.Y.L.; YOU, X.-M.; HUSAIN, M.; RABINOVITCH, M. Targeted overexpression of elafin protects mice against cardiac dysfunction and mortality following viral myocarditis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 103, p. 1211–1219, 1999.
- ZAMMIT, G.; BILLI, D.; ALBERTANO, P. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 47, n. 4, p. 341-354, 2012.

ZEHR, J.P.; CARPENTER, E.J.; VILLAREAL, T.A. New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 68-73, 2000.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539-554, 2003.

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

ZEHR, J.P.; TURNER, P.J. Nitrogen fixation: nitrogenase genes and gene expression. In: PAUL, J.H. (Ed.). **Methods in marine microbiology**. New York: Academic Press, 2001. p. 271-286.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; LIAIMER, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming cyanobacteria. **Angewandte Chemie International**, Weinheim, v. 47, p. 7756-7759, 2008.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; WEIZ, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Exploiting the Natural Diversity of Microviridin Gene Clusters for Discovery of Novel Tricyclic Depsipeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, p. 3568-3574, 2010.

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

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A – Sequências do gene 16S RNAr e 16S-23S ITS das linhagens isoladas  
nesse estudo**

> *Leptolyngbya* sp. CENA350 16S RNAr (1415 nt)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCTCGGATTCTAGTGGCGGACG  
GGTAGTAACACGTGAGAATCTGCCCTAGGACGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGA  
TGTGCCGAGAGGTAAAATCTAATTGGCCTGAGGATGAGCTCGCAGTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTA  
ATGGACTACCAAGGCAGCATCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAG  
ACCGCGTGTGGAGGAAGGCCTACTGGTTAAACCACCTTGATAGGAAGAACACAATGACGGTAC  
CTATCGAATCAGCCTCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCC  
GGAATTATTGGCGTAAAGCGTCCGTAGTGGATGTTCAAGTCAGTTAAAGCGTGGAGCTTAAC  
CCATAAGGGCAATTGAAACTGAGCGTCTGGAGTGCGATAGGGCAAGGGGAATTCCAGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCAGCAGCGCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGAG  
GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCTGAAACGATGGATACTA  
GGCGCTGTCCGTATCGACCCGGGAGCAGTGTCTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGAGTACGC  
TCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTG  
ATGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGACTTGACATGTCGCAATCCTTGTGAAAGCAGGGAGTGCCTC  
GGGAGCGCAACACAGGTGGTCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCG  
CAACGAGCGAACCCCTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGCACTCTGAAGAGACTGCCGTGAC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTTCTGGGCTACACACGTACTA  
CAATGCTACGGACAAGGGCAGCAAGCTCGCAGAGAGCAAGCTAACCCATAAACCGTGGCTCAGTTCA  
GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGTAGTAATCGCAGGTAGCATACTGCGGT  
GAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCAGCGGTACACCATGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTT  
ACTCCAACCCGAAGGGAGGAGGACGCCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> *Pleurocapsa* sp. CENA351 16S RNAr (1416 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTTCTGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGGTGAGAATCTGCCCTCAGGATGGGACAACAACGAGAAATCGGTCTAAAACCCAATG  
TGCAGAAAGGTGAAATACTTGTAGCCTGAAGAGGAGCTCGCGTCCGATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAG  
AGCCTACCAAGGCAGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
CGCGTGGGGAGGAAGATTGGATTGTAAACCTCTTTAAAGGAAGAACAGGTGACGGTACTT  
TAAGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGGAGGATGAGCGTTATCCGG  
AATCATTGGCGTAAAGCGTCCCGAGGTGGCTGTTCAAGTCTGTTAAAGACAGAACGCTCAACTTC  
TGAAAAGCAGTGGAAACTGGACGGCTAGAGTACGGTAGGGTTGAGGGAAATTCCAGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTAACCTGGCGTAACTGACACTCAGGG  
ACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTAGCTGTTAAACGATGAACACTAGG  
CGTTGCTGTATCGACCCGAGCAGTGCCTAGCCAACCGTTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGCAC  
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGAT  
GCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGACTTGACATCTCGAGAACTGAACCTAACAGTGTAGCGGT  
GAACCTCGAAGACAGGTGGTCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGAACCCCTCGTTATTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGACTTTAGGAAGACTGCCGGTGACAA  
ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTAACGTTCTGGGCTACACACGTACTACA  
ATGGTTGGGACAAAGGGCAGCGAGCTCGCAAGAGTAAGCGAATCTCATCAAACCCAGCCTAGTTCA  
ATTGCGAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTAGCATACTGCGGT  
AATTGCGTCCCAGGCTTGTACACACCAGCGTACACCATGGAAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTA  
CCCTAACCGATTATCGGAGGGGATGCCAGGGCTGGTACTAGGGTGAA

> *Nostocaceae* CENA352 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTTCTAGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGGTGAGAATCTGCCCTCAGGCTGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAACACCGGATG  
TGCCGAGAGGTGAAAGATTAATTGCCTGAAGATGAGCTCGCTGTAGTAGCTAGTTGGTAGTGTAAT

GGACTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTGTAACCTCTTCTCAGGGAAGAAAACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTT  
 GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGGCAGAGGGAAATCCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAGGCCTACTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCCTGGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTCTGAAAGGGGAGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTCATGGCTGCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGCAACCCTCGTTTAGTTGCCAGCACTAGGGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTTACGCCCTGGGCTACACACGTACTAC  
 AATGTTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCATAAACCGGAGCTCAGTCAG  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAAGGTAGCAGCATACTGCAGTG  
 AATTGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCGAAGTCATTA  
 CTCCAACCTTCGGGGGGAGGATGCCATAAGGCAGGACTGGTAGTGGACTGGGTGAA

> *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 16S rRNA (1417 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCTTTCGGAGCTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACCGGTGAGAATCTGCCTTGGACGGGGACAACCTGCTGGAAACGGCAGCTAACCGGGA  
 TGTGCCTGCGGGTGAATATTATAGCCAAAAGAGGAGCTCGCGACCGATTAGCTAGTTGGTGGGTA  
 AGAGCCTACCAAGGCTGCGATCGGTAGCCGCTGAGAGGAGCACCGGCCACACTGGACTGAGACAC  
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCCGCGAGGGAGGAAGGCTTGGTCGTAAACCTCTTCTCAGGGAAGAAACAAATGACGGTAC  
 CTGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCC  
 GGAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGCGGCACATCAAGTCTGCTGCAAAGCCCCAGCTTAAC  
 GGGAGAGGCGGTGGAAACTGGTAGAGCTAGAGAGCAATAGGGTAGAGGGAAATCCCGGTAGCGGT  
 GAAATCGTAGAGATCGGAAGAACACCAGTGGCAGACGCTCTAGGTTGCAACTGACACTGAG  
 GGACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTA  
 GGCCTTCTCGTATCGACCCGAGGAGTGCAGCCAAACGCGTTAAGTATCCGCCTGGGAGTACGC  
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTG  
 ATGTAACCGGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGGAACCGTGGAAACTATGGGTGCCGAA  
 AGGAGCCAGAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
 CAACGAGCGAACCCCTCGTGTGTTAGTTGCCATTCAGTTGGGACTCTAGACAGACTGCCGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTTACGTCCCTGGCGACACACGTACTA  
 CAATGCTACGGACAACGGGAAGCCAACCAGCGATGGGAGCAAAGCCCAGCAAACCGTAGCTCAGTTC  
 AGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAGGCGGAATCGCTAGTAATGCCGGTCAGCCATACGGCG  
 GTGAGTACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGTTGCCACGCCGAAGTCA  
 TTACTCTAACCTTCGAGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> Microchaetaceae CENA354 16S rRNA + ITS (16S rRNA: 1-1460, tRNA Ile 1584-1657)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACCGGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGAA  
 TGTGCAGAAATGTAAAAAATTATTGCTGAAGATGAGCTCGCTGTGATTAGCTAGGTGTGGTA  
 AGAGCGCACCTAGGCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAGTACGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCCGCGAGGGAGGAAGGCTTGGGTGAAACCTCTTCTCAGGGAAGAAAAAAATGACGGTAC  
 CTGAGGAATAAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCC  
 GGAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAATAGTGAGGCTCAACC  
 TCATAAAGGCAGTGGAAACTACATATGCTAGAGTACGTTGGGGCAGAGGGAAATCCTGGTGTAGCGG  
 TGAAATCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAACGACTGAC  
 GGGACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACT  
 AGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCCTGGGAGTACG

CAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCTCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCC  
GATGCAACCGAAGAACCTTACCGAGACTTGACATGTCGCGAATTCAAGGTGAAAGCTGAAGTGCCTT  
CGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACCTCC  
GCAACCGAGCGAACCCCTCGTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGA  
CAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTTCTGGCTACACACCGTACT  
ACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCCTAGCTCAGTTC  
AGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAAGGTAGCATACTGCAG  
TGAATTGCTCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTACACACCACGGAAGCTGGTAGTGCCGAAGTCAT  
TACCCCCAACCTGCAAGGGAGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTGAAGTCGTAACAAGG  
TAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTAAAGGAGACCTACCCACTCGAATATTGAAAG  
CAATTGAGCAATTAAATATTGAGTTGGTCATCCTAAAGTCGGTCGCGTCAAATTGACTTACTTCAA  
ACTATATTTGGTCTAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTC  
CCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCCACCTGAAAAAAAGTAAAAGTCAAAGTAAAAGTAAAACAAAG  
AATTATTTATTTGACTTTGGCTCTAATTTTACTTAGATGTGGGTGAATGTAATAGTAGGTTGG  
TATGTGAGCAGACCAGCGAAGCTCTAACCGAGCTAGGAAAATAAGGAAAATTCAAGCAACTGAGCATT  
GCCAGACTGCTGGATGTATTCCAGCAACAGAACCTGAAAAGTGCATAGTGAAGCGAATAAGCAGGC  
AGACAAACAATAGAAGACATTCTTGAGTTATGTTGTGCTAGATACAATTGTGTGGTCAAGCTAA  
TAAGGGCTAACCGTGGAT

> *Leptolyngbya* sp. CENA355 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1458, tRNA: Ile 1580-1653, Ala 1742-1814)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTCCTCGGGACTTAGTGGCGGACGGTGAGTAACACGTGAGAATCTACCTTCAGGTTGGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAGTACCCATTGTGCCAGAGGGTAGCTGCCTGAAGAAGAGCTCGCAGTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTATGGACTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGAGGAAAGGCTCTTGGTTGTAACACCTCTTATTGGGAAAGAAGATCTGACGGTACCGAATGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATAAGTCTGTTAACCGTGGGCTTAACCTCATACAGGCAGTGGAAACTGTAAAGCTAGAGTCTGGTAGGGGTACCGGAAATCCAGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATTGGGAAAGAACACCAGCGCGAAAGCGCGTGACTIONGCCGGAACTGACACTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGAGTCCTAGCTGTAACCGATGGATACTAGGTGTTGCCCGTATCGACCCGGGCAGTGCCTAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGAGTAGCGACCGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGATGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTAGCCCTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTGTTCTAGTGCCATCATTTAGTTGGGACTCTGGAGAGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCTACACACGTACTAAATGCTCGGACAGAGGGTTGCAGCACGCGAGTGCAAGCTAACCGAGGCTCAGTTCAAGGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCCGGTAAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCAGCCGCCACACCATGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTAATCCCAACCGCTTGCAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTTGAAGTCGTAACAAGGTAAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCTACCCACTCTTAAGCCGAAAGCACAGAGCGAATAAGCAAGAGTTGGTCATCCCAAGGTCGAGTTAGATGTTGGCTTCAAACATTACAGGTTGGTTTATGGACTATTAGCTCAGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTCAGTCCAGGATGCCACCTTGAGGGAAAGGCTGAAGTATAGAGGGTGAGGCTAGAAGTTTAAAGAATTCTTATCCTTATTCTTAAGCCTTGATCCTTTATCTGGGGTTAGCTCAGTGGTAGAGCGCTGCTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTGAGTCCGCTAACCTCCACTGGTAAAGCTGCTAGTGATGACTAGCAGGGATAGCGATAGGGAAAGACTTCAGCAACTAAGCTAACGTTGAGAGATTAGAGGCCTGCTGGAGTTGGTCAGTCAAACCTGAAAAGTCATAACTTGTCAGGTAGAAAGCTAGAGGATAAGTCATAGGAGAAAGGTGAGAGGGTAACCCAGAGCGAACTTCTAAGACTTGAAATCTAGTGATCACAGACACCAATGTGCAACTTGAGAAAGTTGTTGAAAGTGGTCAAGCTATCAAGGGCTGATGGTGAT

> *Nostoc* sp. CENA356 16S RNAr (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACTTGGAGTTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGAATCTGGCTTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGAAAGGTTAAAGGTTAACTGCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAAGTGTAAAT  
 GGACTCCAAGGCAGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAAC  
 CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGCGTAAACCTCTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGTAAACGGGACTTGGGAGTTAAAGGAGTGTAA  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAG  
 ATAGAACAGTGGAAACTACATAGCTAGACTACGTTGGGAGCAGAGGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCCTCTGCTAGGCCGTAACGACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCGTAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAAGTATCCGCTGGGAGTACGCCG  
 GCAACGGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTGATGAAAGTTGAGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAAGTCCGCA  
 ACGAGCGCAACCTCGTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGACTCTAGAAAAGACTGCCGTGACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGCCCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCGGGCGACCGCAAGCAAATCCGTAACACGGAGTCAGTCAGA  
 TCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTCACTGCAGTGA  
 ATTGCTCCGGCCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCTGAAGTCATTAC  
 TTCAACCTGCAAAGGAGAAGGATGCCAACGGACTGGTAGTGGGTGAA

> *Nostocaceae* CENA357 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCTTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGAAAGGTTAAAGGCTTGCGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGTGGGTAAA  
 AGCCTACCTAGGCAGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAGTGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAAC  
 CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACCTCTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGTAAACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGGAGCTAACCTC  
 ATAAGAGCAGTGGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTGGGAGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCGTAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGACTGACATGTCGCGAATCCCTGAAAGGAGGAAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAAGTCCGCA  
 ACGAGCGCAACCTCGTTTAGTTGCCAGCACTCGGGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCATAAAACCGTAGCTCAGTCAG  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTCACTGCAGTGA  
 ATTGCTTCCGGAGAGGAGGATGCCAACCATGGAAGCTGGTACGCCGAAGTCATTA  
 CTCCAACCTTCGGAGAGGAGGATGCCAACGGACTGGTAGTGGGTGAA

> *Nostocaceae* CENA358 16S RNAr (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACACAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGAAAGGTTAAAGGCTTGCGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGTGGGTAAAG  
 AGCCTACCTAGGCAGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAAC  
 CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAGAAAAAAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGTAAACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGGAGCTAACCTC

ATAAGAGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTCGTTGGGGCAGAGGGAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATACGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCAGAGCGCTCTGCTAGGCCAAGTACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCTTAAGTATCCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGAT  
 GCAACCGCAAGAACCTACCAAGACTGACATGTCGCGAATTCTGAAAGAGAAAAGTGCCTCGG  
 GAGCGCGAACACACAGGTGGTGATGGCTGTCAGCTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGTGACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCCTAACACGGAGCTCAGTCAG  
 TCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCACTGCAGTGA  
 ATTGCTCCGGCCTTGTACACACCCTCACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
 TCCAACCTTCGGAGAGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAA

> Pseudanabaenaceae CENA359 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1455, tRNA: Ile 1582-1655, Ala 1669-1741)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCTTCTGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGTGAGAATCTGCCCTTGGACGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCGATG  
 TGCGGAGAGGTGAAACAAGCTTGCCTAAAGGATGAGCTCGCTCAGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAA  
 GGACTACCAAGGCAGCATCTGTAGCTGGCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACCGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
 CGCGTGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCCCTTGACTGGGAAGAACACAATGACGGTACCA  
 GTCGAATCAGCCTCGGCTAACCTCCGTCGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGAAGCGTTATCGG  
 ATTTATTGGCGTAAAGCGTCCCGCAGGTGGTTACAAGTCTGTCCTAAAGCGCGGTGCTAACACCC  
 GTACAGGCCGTGAAACTGTAAGACTGAGTGTGATAGGGCAGAGGAAATTCCCAGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATTGGGAGAACACCCGTCGGCAGCGCTCTGCTGGGTATGACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGAGTCCTAGCCGTAACAGATGGGTACTAGG  
 CGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCAGCTAACGCGTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTC  
 GCAAGAGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGAT  
 GCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGGCTGACATGTCGCAACCTTGTGAAAGCAGAGGGTGCCTCGG  
 GAGCGCAACACAGGTGGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGACTCTGGAGAGACTGCCGTGACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAAAGGGTTGCCAACAGCAATGGTGCCTAACACCGTGGCTCAGTTGAG  
 TTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCCAATCGCTAGTAATGCCGGTCACTACGGCGGTGA  
 ATACGTTCCGGCCTTGTACACACCCTCACACCATGGGAGTTGCCACGCCGAAGTCGTTAC  
 TCCAACCGCAAGGAGGAGGGCGCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC  
 GTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCTTAAGGGAGACCTACCCAGTTGCTGAAGATGAGTCCA  
 TACAGGTTGCTATCGGCAACAGGTCAACCCAGGTGCTAGGGTGGATTAATGCTTGGCTTCAAGGCTT  
 GTCTAGGCAGGGCAATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTAGGGTCCC  
 TGGTCGAGTCCAGGATGGCCACCATGATCAAGTTGGGGTATGGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCT  
 TTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTGAGTCCGTTACCTCCACTTAGACTGATAGTGATTGATTAAGAA  
 GACAGCAGCACCTAGCTAGTAATTCGACTAGTGGACGTGCTGGAAATTGTTCCAGCGAGAACCT  
 TGAAAATGCAAGAACAAATGAAATTCTGTCAGGTAGGAGCTGTCAGGGTCTCAAATTGAGCA  
 AGTGGCGGCAACACAGAACACTAAGAAAAAGCGCAATCATGGTCAAGCGACCAAGGGCTACGGTGG  
 AT

> Brasilonema sp. CENA360 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTCTGGAACTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACCGTGTGAGAATCTGGCTCAGGTTGGGACAACAGTCGAAACGATTGCTAATACCGGA  
 TGTGCCCTAACGGTGAAGGATTTATCACCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTA  
 AGAGCGCACCAAGGCACCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTAAACCTCTTCAGGGATAAGTACTGAAGGTAC  
 TGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 GAATGATTGGCGTAAAGCGTCCCGCAGGTGGTTATTCAAGTCTGCTGAAAGAATCTGGCTCAACCAG

ATAAAGGCAGTGGAAACTGAGTGACTAGAGTATGGTAGGGGTAGAGGAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCAAAGCGCTCTGCTGGACAAAAGTACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCGTAAACGATGGATACTAGG  
 CGTTGCCGTATCGACCCGGCAGTGTGCTAGCCAACCGTTAAGTATCCCCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATCGAT  
 GCAACCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCCGAATCTCTGGAAACCGAAGAGTGCCTACGG  
 GAGCCGAAACACAGGTGGTCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTGTTAGTGCAGCAATTAGGTTGGCACTATAGGGAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTGTGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCAATAGCAAGCAAATCCCATAAACACGGCTCAGTCAG  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTACGCTACTGCAGTG  
 AATTGTTCCCGGGCCTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCGTTA  
 CCCTAACCTTCGAGGAGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTACTGGGTGAA

> *Brasilonema* sp. CENA361 16S rRNA (1415 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTCTCGGAACTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTCGGGACAACAGTCGAAACGATTGCTAATACCGGA  
 TGTGCCTTATGGTGAAGATTATCACCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTA  
 AGAGCGCACCAAGGCACCGATCAGTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGAAATAAGTACTGAAGGTACC  
 TGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 GAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTGTCAAGTCTGCTGTCAAAGAATCTGGCTAACCCA  
 GATAAAGGCAGTGGAAACTGAGCGACTAGAGTATGGTAGGGTAGAGGAAATTCTGGTAGCGGT  
 AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCAAAGCGCTCTGCTGGACATAACTGACACTGAGG  
 GACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGAAACGATGGATACTAG  
 GCGTTGCCGTATCGACCCGGCAGTGTGCTAGCCAACCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCA  
 CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGA  
 TGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCCGAATCTCTGGAAACGGAAGAGTGCCTACG  
 GGAGCGGAACACAGGTGGTCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
 AACGAGCGAACCCCTGTTAGTGCAGCAATTGGTTGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGGAGGTGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTA  
 CAATGCTGTGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCAATAGCAAGCAAATCCCATAAACACGGCTCAGTC  
 GATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAGTCGCTAGTAATTGCAGGTACGCTACTGCAGT  
 GAATTGTTCCCGGGCCTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCGTT  
 ACCCTAACCTTCGAGGAGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTACTGGGTGAA

> *Desmonostoc* sp. CENA362 16S rRNA (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCAGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCGAAAGGTGAAGGCTGCTGCTGAAGATGAGCTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCAAGGCACGATCAGTAGCTGGCTGAGAGGATGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTAACCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTAAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTC  
 GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGGCAGAGGAAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAAAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAGGGCCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAACCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTGACATGTGCGAATCTAGTGAAGCTGGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTCATGGCTGCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACCGC  
 ACGAGCGAACCCCTGTTAGTGCAGCATTAAGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTACGCCCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCGTGGCTCAGTCAGA

TCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGA  
ATTCGTCCGGCCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
TCCAACCATTGTTGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAA

> *Desmonostoc* sp. CENA363 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1457, tRNA: Ile 1587-1660, Ala 1724-1796)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGTATAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGGTGAGAACATCTAGCTCAGGTCAAGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
TGCGAAAGGTGAAAGGCTTGCCTGAAGATGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAG  
AGCCTACCAAGGCAGCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
CGCGTGGGGAGGAAGGCTTGGTTGAAACCTCTTCTCAGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
GAGGAATCAGCATCGGTAACCTCGTGCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCGG  
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGCAAAGAGCGAAGCTCAACTTC  
GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTCGGGCAGAGGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
ACGAAAGCTAGGGAGGGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGG  
CGTGGCTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGAATCCTAGTCAAAGCTGGAGTGCCTTCGG  
GAGCGCAACACAGGTGGCATGGCTGTCAGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGAACCCCTCGTTTAGTGCACAGCATTAAAGTTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAA  
ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGCCTGGGCTACACACGTACTACA  
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAAACCCATAAACCGTGGCTCAGTCAGA  
TCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGA  
ATTGTTCCGGCCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
TCCAACCATTGTTGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAAGTCATAACAGGTAG  
CCGTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCTTGTAGGGAGACCTACCCAACCTCAGGAGTCGAAAAAC  
ACAGTGTAAATAGATACTGAGAACGGTCAAACCCAAGGTGGCGAGACATTGTTGGAAGCTTCA  
AACTATGATTGGTTCGTTAAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAG  
GTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGCCACCTGAAAATAATTGTAATTCTAATTAGTAATTAACTGC  
GAATTAAAAGTTACGAATTATGGGGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGTTGCAAGCAGGAT  
GTCAGCGGTTCGAGTCCGTAACCTCCACCTGATAGCGTTAGCTAGAAAGATAAGGATCAGATTCA  
CAAAGTGGCATACAACCGCATTAGAGTGTAGATGTCAGACTGCTGGGTATCCAGCCAGAACCATGAA  
AACTGCATAGGAATGCAAGGAGCAGACACAGACATTGAATGTGTTGCAATGTAAGCCGAA  
TTATCAAGTGGTCAAGCTAATAAGAGCTGACGGTGGAT

> *Leptolyngbya* sp. CENA364 16S RNAr (1416 nt)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTGCCTCGGCACCTAGTGGCGGACG  
GGTAGTAACCGGTGAGGATCTGGCCTAGGAGGGGATAACGACTGGAAACGGTGCCTAATACCGCA  
TATGCCGAGAGGTGAAATGATTAGCTGAGGATGAACTCGCTGATTAGCTAGTTGGAGTGGT  
AACGGCACACCAAGGCAGCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGGCA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA  
GACCGCGTGGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGAAACCTCTTGTAGAGGAAGAACACAATGACGGTA  
CCTATCGAATCAGCCTCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATC  
CGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATCAAGTCAGTTAAAGCGTGGAGCTTAAC  
TCCATAAGGGCAATTGAAACTGATAGGCTAGAGTGCAGTAGGGCAAGGGAAATTCCAGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGA  
GGGACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGCGTTAGTATCCGCT  
AGGCCTGGTGTATCGACCCGGACAGTGCCTAGCTAACGCGTTAGTATCCGCTGGGAGTACG  
CTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATT  
GATGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAATCTGGCGAAAGTTGAGAGTGCCTT  
CGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTGTCAGTGGAGATGTTGGGTTAAGTCCC  
GCAACCGAGCGAACCCCTCGTTTAGTGGCATCTAACGAGGACTCTGAAGAGACTGCCGGTGA  
CAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCCTGGCTACACACGTACT  
ACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTAACCTCGCAGAGCAAGCTAACCCATAAACCGTGGCTCAGTTC

AGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTACGCATACTGC GG  
TGAATACTGTTCCCGGGCCTTGTACACACCAGCCCACACCAGGGAGTTGCCACGCCAAGTCGT  
TACCCCAACCCTCGCGGAGGGGACGCCAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> *Desmonostoc* sp. CENA365 16S rRNA (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACAGTGTCTCGGACACAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCTGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
TGCCCTGGGTGAAAGGCTTGCTGCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGGTGAA  
AGCCTACCTAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGGTGTAACACCTCTTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCATTGTAAGTCTGCTGCAAAGAGCGAAGCTCAACTTC  
GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTCGGGCAGAGGGAAATTCTGGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCTGTAACAGATGGATACTAGG  
CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCAGCTAACCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCAATTCTGTGAAAGCAGGAAGTGCCTTCGG  
GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCA  
ACGAGCGCAACCTCGTTTAGTGCAGCATTAAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACCAA  
ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCCTGGGCTACACACGTACTACA  
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCCATAAACCGTGGCTAGTCAGA  
TCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTCAAGCATACTGCAGTGA  
ATTGCTCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAAGCTGGCAACGCCAAGTCATTAC  
TCCAACCTTCGGAGAGGAGGATGCTAACCGAGTGTGGTAGGGTGAATGGGTGAA

> *Brasilonema* sp. CENA366 16S rRNA + ITS (16S rRNA: 1-1459, no tRNA)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACAGGAGTTCTCGGAACTTAGTGGCGGACG  
GGTGAGTAACCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTTGGGACAACAGTCGGAAACGATTGCTAATACCGGA  
TGTGCCCTGGGTGAAAGATTATCACCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTA  
AGAGCGCACCAAGGCTCCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
ACCGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCAGGGAATAAGTACTGAAGGTACC  
TGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
GAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTGCCTAGTCTGCTGCAAAGAGTCTGGCTAACCA  
GATAAAGGCAGTGGAAACTGATCGACTAGAGTGTGGTAGGGCAGAGGGAAATTCTGGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGCGCTCTGCTGGACCGCAACTGACACTGAGG  
GACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAG  
GCGTGGCCGTATCGACCCGGGCAGTGTCTGAGCCAACCGTTAACAGCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCA  
CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGA  
TGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGGAATCTCTGGAAACCGGAAGAGTGCCTACG  
GGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCA  
AACGAGCGAACACCTCGTTAGTGCAGCAATTGGTGGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTAC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCTACACACGTACTA  
CAATGCTGTGGACAACAGGCAGCAAGCTAGCAATAGCAAGCAAACCGCTAACCGGCTCAGTTCA  
GATCGCAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAAGCATACTGCAGT  
GAATTGTTCCGGCCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCAGGCCGAAGTCGTT  
ACCCTAACCCCTCGGGAGGGGATGCCAGGTAGGACTGGTACTGGGTAAGTCGTAACAAAGGT  
AGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCCACTTTGAGTTAGTTAGAAG  
CAGTTAGTTAGTAACGATAACTCAAGAGCTATCCAAGGTGGCATTAGTCAGAGTGCAAGCCTT  
CAAACATTTGGTTCTCCTCAATTCTAGCGTCAACTCAAACAAATTTAATTGTTAGCTATG  
CCTAACATATTGATTGTGAATATTAAAGTAACGGCTAGACTATTACTGACAGACAGTATATTAA  
AAAGGATAATGTTCAGCATCTGTGAAGATAAGCAAGAATGCTGGAAATTCCAGCAAAAGAACCT  
TGAAAAGTGCATAGAAACCGAAAAATGTCAGGTAGTTAAGTACACAAACAGTTAACACTCCAAGCA  
AAAGCAGCAATGATTGTTGTAGTCAGCAAGAAAAGCGAATGGTGGAT

> Chroococcidiopsis sp. CENA367 16S RNAr (1415 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCTTCGGAGCTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTTGGACGGGACAACCTGCTGGAAACGGCAGCTAACGACCGA  
 TGTGCCTCGGGGTGAAATATTATAGCAAAGAGGAGCTCGCAGCGATTAGCTAGTTGGTGGGTA  
 AGAGCCTACCAAGGCTGCGATCGTAGCCGGTTGAGATGGACGAGCGGCCACACTGGACTGAGACCG  
 CCCCAGACTCNTACGGGAGGCAGCAGTGGAAATTTCCGAAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGCTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAGAAACAAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCCGCAGGTGGCACATCAAGTCTGCTGTCAAAGCCCCAGCTTAACCTGG  
 GAAGAGCGGTGAAACTGGTAGAGCTAGAGAGCAATAGGGTAGAGGGAAATTCCCGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCGGAAGAACACACCAGTGGCGAAAGCGCTACTAGGTTGCAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAGG  
 CGTTCTCGTATCGACCCGAGGAGTGCGGAGCCAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAT  
 GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCTGGAAACCGTGGGAAACTATGGGTGCCGAAAG  
 GAGCCAGAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTGTGTTAGTGCCATCATTCAAGTGGGACTCTAGACAGACTGCCGGTACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCGACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAACGGGAAGCCAACCAGCGATGGGAGCAAAGCCCAGCAAACCGTAGCTCAGTTCA  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATGCCGGTCAGCCATAACGGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGTGGCACGCCGAAGTCATT  
 ACTCTAACCTTCGAGGAGGAGTGCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> Nostocaceae CENA368 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTCAGGTGGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAACCGGATG  
 TGCCGCAAGGTAAAAGGCTTGCCGCTGAAAGATGAGCTCGCTGTGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCTAGGCAGCGATCAGCAGCTGGCTGAGAGGATGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGAAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAGAAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATAAGCATCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGTTAAAGAGTGAGGCTAACCTC  
 ATAAGAGCAGTGGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTGGGGTAGAGGGAAATTCCGTGAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGAAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTGTATCGACCCGAGCCGTGCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAT  
 GCAACGCGAACACCTTACCAAGACTGACATGCGAATTCCCTGAAAGGAGGAAGTGGCTTCGG  
 GAGCGCAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTGTGTTAGTGCCAGCACTCGGGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTACGGACAACAGGAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCATAACCGTAGCTCAGTTCA  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGAGGTGAGCATACTGAGTG  
 AATTGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCAGCCGAAGTCATTA  
 CTCCAACCTTCGGAGGAGGAGTGCGTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTGAA

> Nostocaceae CENA369 16S RNAr (1412 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGTCTTCGGACACAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTCAGGTGGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAACCGGATG  
 TGCCGCAAGGTAAAAGGCTTGCTGCTGAAAGATGAGCTCGCTGTGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCTAGGCAGCGATCAGTAGCTGGCTGAGAGGAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGAAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAGAAAAAAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCCGCAGGTGGCTGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTAACCTC

ATAAGAGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTCGCTCGGGCAGAGGAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCAAGTGACACTGAGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGATTAGATACCCAGTAGCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCGCACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTGATG  
 CAACCGAAGAACCTTACCAAGACTGACATGTCGCAATTCTGAAAGAGAAAAGTGCCTCGGG  
 AGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTGCCTCGGG  
 CGAGCGCAACCCTCGTTTAGTGCAGCATTAAGTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGTGACAAA  
 CCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCTACACACGTACTACAA  
 TGCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCGTAACCGGAGCTCAGTCAGAT  
 CGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTACGACTGAGTGAA  
 TTCGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTACT  
 CCAACTTTCGGAGAGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAA

> *Oculatella* sp. CENA370 16S rRNA (1411 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAAACGGCTTCTCGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGGATCTGCCTACAGGACTGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAAAACGGATG  
 TGCCGAGAGGTGAAATATTATAGCTGTAGATGAGCTCGCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAG  
 GGCTCACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGGGAGGAAGGTCTGGATTGTAACACCTCTTGTAGGGAAGAATAATGACGGTACCTAT  
 CGAACATCAGCATCGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAA  
 TTATTGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTCAAGTCTATTGTCAAAGCCTGGGCTTAACCTGG  
 AGAGGCGGTGAAACTGGATGACTAGAGTGGCTAGGGGAGGAAATTCTCAGTGTAGCGGTGAAA  
 TGCCTAGATATTGGGAGAACACCGGTGGCAGCGCTCTGCTGGGCTGCACACTGAGGGAC  
 GAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGAGACTAGGTG  
 TTGCACGTATCGACCGTGCAGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTCTCCGCTGGGAGTACGCTCGC  
 AAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAACCGATGC  
 AACCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCGGAATCCTCTGAAAGGGAGGAGTGCCTACGGG  
 GCGCGAGCACAGGTGGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAAC  
 GAGCGCAACCCACGTTTAGTGCAGCATTAAAGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGACAAAC  
 CGGAGGAAGGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAAT  
 GCTCggCACAAAGGGCAGCGAGCAGCGATGCCAGCCAATCCATAAACCGAGGCTCAGTCAGATT  
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTACGACACTGCGGTGAAAT  
 ACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGGCACGCCGAAGTCGTACTC  
 CAACCGTTCGCGGAGGAGGACGCCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> *Desmonostoc* sp. CENA371 16S rRNA (1411 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAAACGGTGTCTGGGACATAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCAAGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCTGAAGATGAGCTTGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACACCTCTTCTAGGGAAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTAAAGTCTGCTGTAAAGAGCAAAGCTCAACTT  
 GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGAGGAAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCAAGGCCTCTGCTAGGCCAAGTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGATTAGATACCCAGTAGCCTAGCTGTAAAGCAGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGAT  
 GCAACCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCGGAATCCCTGAAAGGAGGAGTGCCTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACGCGCA  
 ACGAGCGCAACCTCGTTTAGTGCAGCATTAAGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGCCCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCGTGGCTCAGTCAGA

TCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTACGCATACTGCAGTGA  
ATTCGTCCGGGCTTGTACACACCAGCCCACACCATGGAAGCTGGCAACGCCAAGTCATTAC  
TCCAACCCTGGGGGAGGATGCCAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAA

> *Leptolyngbya* sp. CENA372 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1 - 1456, tRNA: Ile 1579-1652, Ala 1728-1800)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTCGGACTTAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGCGTGAGAACATCGCCTCAGGTGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCAATG  
TGCCGAGAGGTGAAAGCTTAGTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGTGGGTAAAT  
GGCCTACCAAGGCAGCAGTCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGAAACCTCTTATCAGGAAAGAAGTCTGACGGTACCTG  
ATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGA  
TTTATTGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGTTATTCAAGTCTGTTAAAGCGCAGGGCTTAACCTCG  
TACAGGCAGTGGAAACTGGATGACTAGAGTATGGTAGGGTAGCGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAA  
ATCGTAGATATTGGGAGAACACCAGCGCAGAAGCGCCTACTGGGCATTACTGACACTCATGGA  
CGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCAGTGTAAACGATGGGTACTAGGT  
GTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCTAGCTAACCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTATGCACCG  
CAAGTGTGAAACTAAAGGAAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGATG  
CAACCGCAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAATCTCTGTGAAAGTGGAGAGTGCCTCGG  
AGCGCAACACAGGTGGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
CGAGCGCAACCCCTGTTTAGTGCAGCATTGAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTAACGTCTGGCTACACACGTACTACAA  
TGCTCGGACAAAGGGTTGCGAGCTAGTGTAGCAAGCTAACCGCTAACCGAGGCTCAGTTAGAT  
TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATGCAGGTACGCATACTGCAGTGA  
TACGTTCCGGCCTTGTACACACCAGCCCTCACACCAGGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACT  
CCAACCGCTGCGGAGGAGGATGCCAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTTAAGTGTAAACAGGTAGC  
CGTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCATTAGGGAGACCTACCCGATTGAAGGCTTGAACACGT  
TTTGTACTAGAGCAATGTTGGTCATCCCAAGGTGTTAGGAATAAGTGTGGCTTCAAACACTAGC  
TAGGTTGGTTATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGG  
TTCGAGTCCAGGGTGGCCACCTTGAGAGCGGTCAACCCTAGTCGTCAGAGTTCTATTGAGGGTT  
TGATAACTGAGCGTTGGTAGCTTCTGGGGTTAGCTCAGGTGGTAGAGCGCCTGCTTGTCAAGCA  
GGATGTCAGCGGTCAGTCCGCTAACCTCACTGAGTGAATGGTTACTGAAGCCATTAACTTGG  
AAGCGTTAGCAACTCGCTAGTGTACCTAGAGAGCCTGCTGGATTGTTCCGGCAGAACCTTGAA  
AACTGCATAGTACTTGTAGGTAGAAAGAGCAACGTGTGCACTGCTCTGATTTAGTCGTCAGTGT  
TGGGTTCAAGAGCCAGAGCATGTGTTGAAATCATAGACACCAATGAATTGTAAGTGGTCAAGCTA  
CAAAGGGCTGATGGTGGAT

> Nostocaceae CENA373 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACCGCGTGAGAACATCGCCTCAGGTGGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
TGCCGCAAGGTGAAAGATTATTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGTAAAG  
GGACTACCTAGGCAGCAGTCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCACCGCAAGCCTGACGGAGCAATAC  
CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTAAACCTCTTCTCAGGAAGAAGACAATGACGGTACCT  
GAGGAATAAGCATGGCTAACCTCGTGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGTTAAAGAGTGTAGGCTCAACCTC  
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGTTAAAGAGTGTAGGCTCAACCTC  
ATAAGAGCAGTGGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTGGGGTAGAGGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
AATCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGG  
CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGCTTAAGTATCCGCTGGGGAGTACGCAC  
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGAT  
GCAACCGCAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCAACCTCCTGAAAGGGAGGGTGCCTTCGG  
GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCCCTCGTTTAGTTGCGCAGCACTTAGGGTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGACA  
AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTTGGCTACACACGTACTAC

AATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCACAAACCGTAGCTCAGTCAG  
ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTAGCATACTGCAGTG  
AATTGTTCCCGGGCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTA  
CCCCAACTTTCCGGAGAGGGGGATGCCAACGGCAGGACTGGTACTGGGTGAA

> Pseudanabaenaceae CENA374 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1 - 1459, tRNA Ile 1581 - 1654, Ala 1743 - 1815)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTCCTTCGGACTTAGTGGCGGACG  
GGTGAGTAACACGTGAGAATCTACCTTCAGGTTGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCAA  
TGTGCCGAGAGGTGAAAGGGGAGCTGCCTGAAGAAAGAGCTCGCAGTCACCTATAAAGGGTAGTGTA  
ATGGACTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAGTGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA  
TACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACCTTTATTGGGAAGAAGATCTGACGGTAC  
CGAATGAATCAGCATGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTATCC  
GGATTATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATAAAGTCTGCTGTTAAAGCGTGGGCTTAAC  
CCATACAGGCAGTGGAAACTGTAAAGCTAGAGTCTGGTAGGGGTACGGGAATTCCCAGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGCGAAAGCGCGTACTGGACCGGAACGACACTCAT  
GGACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGAGTCCTAGCTGTAACAGATGGATACTA  
GGTGGTGCCTGATCGACCCGGCAGTGCCTAGCTAACCGTTAAAGTATCCGCCTGGGAGTACGC  
ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTG  
ATGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGAATCTCTTGAAGGGAGGAGTGCCTTC  
GGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
CAACGAGCGAACCCCTCGTTCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGACTCTGGAGAGACTGCCGGTAC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCCTGGCTACACACGTACTA  
CAATGCTTCGGACAGAGGGTTGCGAGCACCGAGTGCAAGCTAACCGTAAACCGAGGCTCAGTTCA  
GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTAGCATACTGC  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGGAGTTGCCACGCCGAAGTC  
ACTCCAACCGCTTGCAGGAGGAGCGCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTAAGTCGAACAAGGT  
AGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTGTAGGGAGACCTACCCACTCTTAAGCCGAAAGC  
ACAGAGCGAATAAGCAAGAGTTGGTCACTCCAAAGGTCGTTAGGTTAGATGTTGGCTTCAAGCTAT  
TCAGGTTGGTTTATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCC  
GGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTTGAGGGAAAGGCTGAAGTATAGAGGGTAAGGCTAGAAGTT  
TAGAATTTCATCCTTATTGTTAACGCTTGATCCTTATCTGGGGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCG  
CTGCTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTGAGTCGCTAACCTCCACTGGGAAAAGCTGTTAGTGA  
TTGGCTAGCAGGGATAGCGATAGGGAAAGACTTCAGCAACTAAACTAACGTTGAGAGATTAG  
AGAGCCTGCTGGAGTTGGTCCAGTCAGAACCTGAAACTGCATAACTTGTCAAGGTAGAAAGCTAG  
AGGAAAGGAATAGAGGAAAGGTGAAAGGGCAACCCAAAGCGAACCTCAAGACTTGAATCTAGT  
ATCACAGACACCAATGTGCAACTTGAGAAAGTTGTGAAAGTGGTCAAGCTATCAAGGGCTGATGGT  
GAT

> Leptolyngbya sp. CENA375 16S RNAr (1412 nt)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGACATAGTGGCGGACGG  
TGAGTAACCGTGTGAGAATCTGCCTTCAGGTTGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCAA  
TGCCGAGAGGTGAAAGCTTACTGCTGAGGATGAGCTCGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAC  
GGCCTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
CGCGTGGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACCTCTTATCAGGGAAAGAAGATCTGACGGTACCTG  
ATGAATCAGCATCGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTACCGGA  
TTTATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTCAAGTCTGCTGTTAAAGCGCGAGGCTTAAC  
TACAGGCAGTGGAAACTGGGAGACTTGAGTATGGTAGGGTAGCGGGAAATCCAGTGTAGCG  
ATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGCGAACAGCGCCTACTGGGCCATTACTGACACT  
CGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGAGTCCTAGCTGAAACGATGGGTACTAG  
GTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCTAGCTAACCGTTAAAGTACCCGCCTGGGAGTATGC  
CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTG  
CAACCGCAAGAACCTTACCAAGGGCTGACATGTCGAATCTGTGAAAGTGGAGAGTGCCTCG  
AGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA

CGAGCGCAACCCCTGTTTAGTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAAA  
 CCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGCTACACACGTACTACAA  
 TGCTCGGACAAAGGGTTGCAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCGTAAACCAGGGCTCAGTTCAAGAT  
 TGCAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCCCAGGTACGCATACTGGGGTGAA  
 TACGTTCCGGGCTTGTACACACCAGGTACACCATGGAGTTGGCACGCCAGTCAGTACGTTACT  
 CCAACCTTCGAGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGTGTAGACTGGGTGAA

> Nostocaceae CENA376 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1457, tRNA: Ile 1584-1657 Ala 1737-1809)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACACAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGTGAGAATCTGCCTCAGTTGGACAACCACGGAAACGGTGGCTAATACCGAATG  
 TGCGGAGAGGTGAAAGGCTTGCCTAAAGAAGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAG  
 AGCGCACCTAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAAACCTCTTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGCAAAGAGCAAAGCTCAACTTT  
 GTAAAGGCAGTGGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTCGGGGAGAGGAAATTCCCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAGGCCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCCGCCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAACCTTGTGAAAGCAGAGGGTGCCTCGG  
 GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTGTGAGATGTTGGTTAACCGCA  
 ACGAGCGCAACCCCTCGTTTAGTGCCAGCATTAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCGTAGCTCAGTTCA  
 TCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTACGCATACTGCAGTGA  
 ATTGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
 TCCAACCCCTCGGGGGAGGATGCTAACCGCATGTCAGTGGTGAACGGTTAACAGGTAG  
 CCGTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCTACCCCTCAAATATCGAAAG  
 CAGACAGTAAATAGATATTGAGATGGTCAAACCCCTAGGTCGGCGCAGCACTTGAGGTGAGCTTCAA  
 ACTATGATTGGTTGATATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTC  
 CCTGGTTGAGTCCAGGATGGCCACCTGAAGATAATTAGTAATTGTAATGCGTAATTGTAATTAA  
 TTACGAACTACGAATTAGAAATTACGAATTATTAGGGGGTTAGCTCAGTTGGTAGAGGCCCTGCT  
 TTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTGAGTCCGTAACCTCCACCTGTCAGCTAAAGATAAGTGA  
 GGATGAAATTCAACATGACATGTAACGGAGACACAGACATTCAATTGAAAGAATTGTGTT  
 TGCAGTGGTGAACACCACCTGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTAACGGTGGAT

> Leptolyngbya sp. CENA377 16S RNAr (1418 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGACTTTCGGAGTCCTAGTGGCGGA  
 CGGGTGAGTAACCGTGAGAACGTGCCTTGTAGATTGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAACCG  
 AATGTCGCTTGTAGGGTGAAGGATTGATTGATTGCTAGAGATCGGCTCGCGTACATTAGCTAGTTGGTGG  
 GGTAAACGGCTCACCAAGGCAGCATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGACCAGGCACACTGGAACTGAG  
 ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGGGCAACCTGACGGAG  
 CAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTGGTTGTAAACCTTTATCAGGGAAGAATCAATGACGG  
 TACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTA  
 TCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTCTCAAGTCTGTTGCAAAGCGTGCCTCA  
 ACCGCATACGGCGATGGAAACTGAGGAGCTAGAGTGCAGTAGGGGTACAGGAATTCCCAGTGTAGC  
 GGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGCGAACAGCGTGTGACTGGGTCTGCACGTACACT  
 GAGGGACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGAGTCTAGCCGAAACGATGACAA  
 CTAGGCCTGGTCTGATCGACCCGAGCCGTAGCCAACCGCTTAAGTTGTCGCCTGGGAGTA  
 CGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGCTGACATCCTCGGAACCGTGTAGGAGATGTTGGTTAAGTC  
 TCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTGACATCCTCGGAACCGTGTAGGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 TTCGGGAACCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC

CCGCAACGAGCGAACCCACGTTTAGTGCAGCATTGAGTTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGT  
 GACAAACCAGGAGGAAGGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCATACGCCCTGGGCTACACACGTA  
 CTACAATGCACTGGACAGAGAGCTGCAAGTCAGCGATGGCAAGCCAATCTCGCAAACCAAGTGCTCAGT  
 TCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCAGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAAGCATACTGC  
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTCAGGCCGAAGTC  
 GTTACTCTAACCGTTCGCGAGGAGGATGCCAAGGTGGGCTGATGACTGGGTGAA

> Pseudanabaenaceae CENA378 16S RNAr + ITS (16S RNAr:1-1458, tRNA: Ile 1580-1653, Ala 1742-1814)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTCCTCGGGACTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACACGTGAGAATCTACCTCAGGTGGGACAACGACTGGAAACCGTCGCTAATACCCAA  
 TGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTAGCTGCCTGAAGAAGAGCTCGCAGTATTAGCTAGTTGGTAGTGT  
 ATGGACTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACCTCTTATTGGGAAAGAAGATCTGACGGTACCC  
 GAATGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 GATTATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTACAGTCTGTTAAAGCGTGGGCTTAACCTC  
 CATAACAGGCAGTGGAAACTGTAAAGCTAGAGTCTGGTAGGGTCACGGGAATTCCAGTGTAGCGGTG  
 AAATCGTAGATATTGGGAAACACCAGCGCGAAAGCGCGTACTGGACCGGAACGTGACACTCATG  
 GACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCTGAAACGATGGATACTAG  
 GTGTTGCCGTATGACCCGGCAGTGCCTAGCTAACCGCTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCA  
 CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCG  
 TGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAATCCTCTGAAAGGGAGGAGTGCCTCG  
 GGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACCG  
 AACGAGCGAACCCCTCGTTAGTGCATCACCCCTGAGCTGGGACTCTGGAGAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTCGGACAGAGGTTGCGAGCACGCGAGTGCAGCTAACCGTAAACCGAGGCTCAGTCAG  
 ATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAAGCATACTGCCGTG  
 AATACGTTCCGGCCTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGGCAGCAGCGAACGTCGTTA  
 CTCCAACCGCTTGCAGGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTAAGTCGTAACAAAGTA  
 GCCGTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCTACCCACTCTAACCGGAAAGCA  
 CAGAGCGAATAAGCAAGAGTTGGTCATCCCAAGGTGTTGAGTTAGATGTTGGCTTCAAACATT  
 CAGGTTGGTTTATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGAGGCTG  
 GTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTTGAGGGAAAGGCTGAAGTATAGAGGGTGGAGGCTAGAAGTT  
 AGAATTATCCTTATTAAAGCCTTGATCCTTATCTGGGGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGC  
 CTGCTTGCAAGCAGGATGTCAGCGTTGAGTCCGCTAACCTCACTGGTAAAGCTGTTAGTGA  
 TTGGCTAGCAGGGATAGCGATAGGGAAAGACTTCAGCAACTAAACTAACGAGGCTAGAAGTT  
 AGAGCCTGCTGGAGTTGGTCAGTCAGAACCTGAAAAGTCATAACTTGTCAAGGTAGAAAGCTAG  
 AGGATAAGGAATTAGGGAAAGGTGAGAGGGCAACCCAGAACCGAAACTCTAAGACTTGAAATCTAG  
 TGATCACAGACACCAATGTCAACTTGAGAAAGTTGTTGAAAGTGGTCAGCTATCAAGGGCTGATGG  
 TGGAT

> Nostocaceae CENA379 16S RNAr (1414 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGGTGAGAATCTGGCTTCAGGTGGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGCAAGGTGAAAGATTATTGCTGAAGATGAGCTCGCTGATTAGCTAGTAGGTGGTGTAAA  
 GGACTACCTAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGAGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGGAAAGAAGACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATAAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGGAGGCTAACCTC  
 ATAAGAGCAGTGGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTGGGGTAGAGGGAAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTTAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCG

GCAACCGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAACCTTCTGAAAGGGAAAGGGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTTTAGTTGCCGGCACTTAGGGTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTTGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCACAAACCGTAGCTCAGTCAG  
 ATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTG  
 AATTGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTA  
 CCCAACTTTGGAGAGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTGAA

> *Desmonostoc* sp. CENA380 16S rRNA (1412 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCAAGGACAACCACGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGGCGAAAGGTGAAAGGCTTGCCTGAAGATGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGAGGGAGGAAGGCTTGGTTGTAACCTCTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGGTAAACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCCGAGGTGGCTGTGTAAGTCTGTCGAAAGAGCAAAGCTCAACTTT  
 GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGGCAGAGGGAAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAGGCCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTAGCTGAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGGTTAATTCGAT  
 GCAACCGCGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCCTCTGAAAGGAGGGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTTTAGTGCCAGCATTAAAGTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGCCCTGGCTACACACGTACTAC  
 AATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCGTGGCTCAGTTCCAG  
 ATCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTG  
 AATTGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTA  
 CTCCAACCCCTGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGGTACTGGGTGAA

> *Brasilonema* sp. CENA381 16S rRNA + ITS (16S rRNA: 1-1459, no tRNA)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTCTCGGAACTTAGTGGCGGACG  
 GGTGAGTAACCGGTGAGAATCTGGCTCAGGTTGGGACAACAGTCGAAACGATTGCTAATACCGGA  
 TGTGCCCTATGGTAAAGATTTATCACCTGAAGATGAGCTCGCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTA  
 AGAGCGCACCAAGGCACCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
 ACCCGTGGAGGAGGAAGGCTTGGTTAAACCTCTTCTCAGGGATAAGTACTGAAAGGTAC  
 TGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCGTGCAGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 GAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTATTCAAGTCGCTGTCAGGAAATCTGGCTCAACCA  
 GATAAAGGCAGTGGAAACTGAAAGACTAGAGTATGGTAGGGTAGAGGGAAATTCTGGTAGCGGTG  
 AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGACCATAACTGACACTGAGG  
 GACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAG  
 GCGTTGCCGTATCGACCCGGGAGTGTGCGTAGCCAACCGTTAACGCGTTAAGTGTCCCCTGGGAGTACGCA  
 CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGGTTAATTCGA  
 TGCAACCGCGAACACCTCGTTAGTTGCCAGCAATTGGTGGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTGAC  
 GGAGCCGGAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
 AACGAGCGAACCCCTCGTTAGTTGCCAGCAATTGGTGGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTGAC  
 AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGCCCTGGGCTACACACGTACTA  
 CAATGCTGTGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCAATAGCAAGCAAATCCATAAACACGCCAGTTCA  
 GATCGCAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGT  
 GAATTGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGTAGCAGGCCGAAGTCGTT  
 ACCCTAACCGTTCGCGAGGGGACGCCAGGTTAGGACTGGTACTGGGTGAAAGTCGAACAGCTT  
 AGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAGGGAGACCCACTTTGAGTTAGTAA  
 TAGTTAGTTAAACTAATAATTCAAAAGCCATCCCGAGGTGATCATTAGTCACAGTGCAAGCTT

CAAACATTTGGTCACTCAATTGCTAACATAGATTACAATAAAAATTAATTTTACCTCTG  
GATAACAGACTAAGCTATTAATTTAACTTATAAGTAGATTGTTTTAACAGTATTATA  
AGGAAATAAAGTTCAGCATCTGTGAGCGAAAGCAAGAATGCTGGATATTCCAGCAAAGAACCT  
TGAAAATGCATAGAAACCGAAAAATGTCAGGTAGTTAATCAGTTAACACTCCGAACA  
AAAACAGCAATGATTGTTAGTCAGCAATGAAAGGCAGTGGGAT

> *Brasilonema* sp. CENA382 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1459, no tRNA)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTCTCGGAACATTAGTGGCGGACG  
GGTAGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTCGGGACAACAGTCGAAACGATTGCTAACACCGGA  
TGTGCCTAACGGTGAAAGATTATCACCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTA  
AGAGCGCACCAAGGCACCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAT  
ACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACACCTCTTCTCAGGAATAAGTACTGAAGGTACC  
TGAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
GAATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTATTCAAGTCTGCTGTCAAAGAATCTGGCTAACCCA  
GATAAAGGCAGTGGAAACTGAGTGACTAGAGTATGGTAGGGTAGAGGAAATCCTGGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCAGAAGCCTGCTGGACCAAAACTGACACTGAGG  
GACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAG  
GCGTTGCCGTATCGACCCGGCAGTGTCTAGCCAAACGCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCA  
CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGA  
TGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCCGGATCTCTGGAAACGGAAGAGTGCTACG  
GGAGCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
AACGAGCGAACCCCTCGTCTTAGTGCCAGCAATTAGGTTGGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTGC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCCCTGGCTACACACGTACTA  
CAATGCTGTGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCAATAGCAAGCAAATCCCATAAACACGGCTCAGTTCA  
GATCGCAGGCTGCAACTCGCTGCGTAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAAGGTGAGCATACTGCAGT  
GAATTGCTTCCGGGCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGTACGCCGAAGTCGTT  
ACCCCTAACCTTCGAGGAGGGGGACGCCAAGGTTAGGACTGGTACTGGGTAAGTCGTAACAAGGT  
AGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCCGACTCAATTCAAAGTCAAA  
ATTCAAAGTTCAAAACAGAAAGAGTTTTGAAATTGGATTATCATAAAACTTGAATTGGTT  
TATCCCGAGGTGATCATTAGTCAACAGTCAAGCTTCAAACATTGGTTCACTTCAATTGTCT  
AACATATACTTACAATAAAAAAAATTAAATTGTTACCTCTGGATAACAGACTAAACTTATTAAATT  
CAAATAATAATAGATTGTTGCTATTGACAGTATTATAAGCTAGTAAAGTTTCAGCATCTGTGG  
GCGAAAGCAAGAATGCTGGAAAATTCCAGCAAAAGAACCTGAAAATGCACTAGAAACCGGAAAG  
GTCAGGTAGTTAATGTTAACAGTTAACACTCCAAGCAAAACAGCAATGATTGTTAGTC  
GCAATGAAAGGCAGTGGGAT

> *Desmonostoc* sp. CENA383 16S RNAr (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCAAGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAACACCGGATG  
TGCGAAAGGTGAAAGGCTGCTGCTGAAGATGAGCTGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAG  
AGCCTACCAAGGCACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGGCAATAC  
CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACACCTCTTCTACCGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
GAGGAATCAGCATCGGCTAACCTCCGTACCAAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTAAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTC  
GTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCGTCCGGCAGAGGGAAATCCTGGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCAAGGGCGCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGG  
ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCTGAAACGATGGATACTAGG  
CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAACCGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTGACATGTCGAATCCTAGTGAAGCTGGAGTGCCTTCGG  
GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACCGC  
ACGAGCGCAACCCTCGTTTAGTTGTTAACAGTCAAGCTAGCAGCATGCCCTACACACGTACTACA  
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAACCCATAAACCGTGGCTCAGTTCA  
GCAATGAAAGGCAGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACACACGTACTACA

TCGAAGGCTGCAACTCGCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTACGCATACTGCAGTGA  
ATTCGTCCGGGCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
TCCAACCATTGTTGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAA

> Pseudanabaenaceae CENA384 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1455, tRNA: Ile 1578-1651, Ala 1681-1753)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCTCGGATCTAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTCAGGAGGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCATA  
TGCGGAGAGGTGAAATGTTTATCGCCTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAA  
GAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGAAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
CGCGTGGGGATGAAGGTCTGTGGACTGTAAACCGCTTGTACAGGGAAGAACAAATGACGGTACCTGT  
CGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGAA  
TTATTGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTCAAGTCTGCTGTCAAAGCGCGGAGCTTAACCTCGT  
AAAGGCAGTGGAAACTGGTCAGCTAGAGTCAGTAGGGGTCGCGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAA  
TGCCTAGAGATTGGGAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCGCAGTGGCTGTAACTGACACTGAGGGAC  
GAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCG  
TTGACCGTATCGACCCGGGAGTCCGTAGCTAACCGTTAAAGTATCCCGCTGGGAGTACGCTCGC  
AAGAGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATCGATGC  
AACCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAACCCCTCATGAAAGTGAGGGTGCCTCGGGA  
GCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCCTGTTCTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAAAC  
CGGAGGAAGGTGGGATGATGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTACAAT  
GCTCGGACAAAGGGCAGCAAGCAGCGATGGCAAGCCAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTCAGATT  
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGAATCGTAGTAATCGCAGGTACGCATACTGCCGTGAAT  
ACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTACGCCGAAGTCGTTACTC  
TAACCGCAAGGGAGGAGGATGCCGAAGGAGGTGATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC  
GTACCGGAAGGTGGCTGGATCACCTCTTAAGGGAGACCTACCCGCTCTAGAGTTGAACGCACTC  
AGCTAATAGACTCAGAGTTGGTCATCCCAGGGTCGAAACGAGTTACAGAAGATGGCTTCAAACATT  
TGGTTCGGTCATGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTAGGTCCCTGGT  
TCGAGTCCAGGATGGCCACCTTAACGCTCAGAGATGAGGCATAAAATGGGGTTAGCTCAGTTGGT  
AGAGCGCTGCTTGCAAGCAGGATGTCAGGAGTTCAATCTCTAACCTCCACTCAGTAAGTTGGT  
ATCTTGCATCGGCTTACTTATTGGACGTTACGGATATAGTAGAGCGAAAGCATTATAACTTCGAG  
CTTCATCTTCGAGCATCAGAACACCTCAGCAACTGGTCTAGCAAATTGCTAAGCTAGAGAGCCTGC  
TGGAGGTATTCCAGTCAGAACCTGAAAAGTGCCTAGTAATTGTCAGGTAGAGCGTTAGGCAAGCGA  
TTCAACTGCGCAGGCGTGGAAAACATCCTACAGCTACAGGTGATTCAATTGGCTAACACTCACAGA  
CACCAATGATTGTTAGTGGTCAAGCTAACAGGCTAATGGTGGAT

> Pseudanabaenaceae CENA385 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1455, tRNA: Ile 1582-1655, Ala 1669-1741)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTCTCGGAGCTAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTTGGACGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCGATG  
TGCGGAGAGGTGAAACAAGCTTGCCTAGGATGAGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTCGGTAGTGTAAAT  
GGACTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
CGCGTGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAACCCCTTTGACTGGGAAGAACACAATGACGGTACCA  
GTCGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTATCCGG  
ATTTATTGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGTTTACAAGTCTGCTCAAAGCGCGGTGCTCAACACC  
GTACAGGCCGTGGAAACTGTAAGACTTGAGTGTAGAGGGCAGAGGGAAATTCCAGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATTGGGAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGTATGACTGACACTGAGGG  
ACGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACAATGGGTACTAGG  
CGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCTGGAGCTAACCGTTAAAGTACCCGCTGGGAGTACGCTC  
GCAAGAGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATCGAT  
GCAACCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATGTCGCAATCTTGTGAAAGACGAGAGTGCCTCGG  
GAGCGCAACACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTGTCAGATGTTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGAACCCCTCGTCTTAGTTGCCAGCATTGAGCTGGGACTCTGGAGAGACTGCCGGTACAA

ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAAAGGGTTGCCAACCGCGATGGTGCCTAATCCCATAAACCGTGGCTAGTCAGA  
 TTGCAGGCTGCAACTGCCCTGCATGAGGGCGGAATCGCTAGTAATGCCGGTCAGCATACGGCGGTGA  
 ATACGTTCCCGGCCTTGACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGCCACGCCGAAGTCGTTAC  
 TCCAACCGCAAGGAGGAGGGCGCAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTAAGTCGTAACAAGGTAGCC  
 GTACCDDAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTAAGGGAGACCTACCCAGTTGCTGAAGATGAGTCCA  
 TACAGGTTGCTCATCGCAACAGGTCAACCAGGTCTAGGGTGGATTAATGCTTGGCTTCAAGACTT  
 GTCTAGGCAGGGCAATGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCC  
 TGGTCGAGTCAGGATGCCACCATGATCAAGTTGGGATGGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCT  
 TTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTGAGTCGTTACCTCCACTTAGACTGATAGTGATTGATTAAGAA  
 GACAGCAGCACCTAGCTAGTGAACCTGCACTAGTAGACGTGCTGGATTGTTCCAGCGAGAACCT  
 TGAAAACAGCATAGCAACAAACGAAATTCTGTCAGGTAGGAGCTGTCAGGTTGCTCAAGATTGAGC  
 AAGTTGACGGCAACACAGAACACTAAGAAAAGCGCAATCATGGTCAAGCGACCAAGGGTTACGGTG  
 GAT

> *Desmonostoc* sp. CENA386 16S RNAr (1411 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTCGGACATAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCAAGGACAACCAACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCTGAAGATGAGCTGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAG  
 AGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACACCTCTTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTAAAGTCTGCTATCAAAGAGCAAAGCTCAACTT  
 GTAAAGGCAGTGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGCGAGAGGAATTCTGGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAGGGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTTGTATCGACCCGAGCGTGCCTAGCTAACCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATCGAT  
 GCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCCTCTGAAAGGAGGGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCGAACACAGGTGGTCATGGCTGCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
 ACGAGCGCAACCCCTGTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTACCAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAGTGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCATAAACCGTGGTTAGTCAGA  
 TCGAAGGCTGCAACTGCCCTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAAGGTGCTAGCATGCACT  
 ATTGCTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
 TCCAACCTTGGGGGAGGATGCTAAAGGAGTGGTACTGGGTGAA

> *Leptolyngbya* sp. CENA387 16S RNAr (1412 nt)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCCTCGGACTTAGTGGCGGACGGG  
 TGAGTAACCGGTGAGAATCTGCCCTCAGGTGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCAATG  
 TGCCGAGAGGTGAAAGCTTAGTGCTGAAGATGAGCTGCGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAT  
 GGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGCAATGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGAC  
 CGCGTGAGGGAGGAAGGCTTGGGTTGTAACACCTCTTATCAGGGAAGAAGTTCTGACGGTACCTG  
 ATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGA  
 TTTATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTATTCAAGTCTGCTGTTAAAGCGCGAGGCTTAACCTCG  
 TACAGGCAGTGGAAACTGGATGACTAGAGTATGGTAGGGTAGCGGGATTCCAGTGTAGCGGTGAA  
 ATGCGTAGATATTGGGAGAACACCGAGCGCGAAAGCGCGCTACTGGCCATTACTGACACTCATGGA  
 CGAAAGCTAGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGCTAGCTGAAACGATGGGTACTAGGT  
 GTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCTAACCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTATGCACG  
 CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATCGATG  
 CAACCGGAAGAACCTTACCAAGGGCTGACATGTCGCGAATCTGTGAAAGTGGAGAGTGCCTTCGGG  
 AGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
 CGAGCGCAACCCTCGTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACCTAGAGAGACTGCCGGTACACACGTACTACAA

TGCTTCGGACAAAGGGTTGCGAGCTAGTGATAGCAAGCTAACCGTAAACCGAGGGCTCAGTCAGAT  
 TGAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTACGCATACTCGGGTGA  
 TACGTTCCCAGGGCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGGAGTTGCCACGCCGAAGTCGTTACT  
 CCAACCGCTTGCAGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGTGAA

> Nostocaceae CENA388 16S RNAr + ITS (16S RNAr: 1-1457, tRNA: Ile 1582-1655, Ala 1736-1808)

GATGAACGCTGGCGGTATGTTAACACATGCAAGTCAACGGTCTTCGGACACAGTGGCGGACGG  
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCGCAAGGTAAAAGGCTTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAAG  
 AGCCTACCTAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATTAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGGGAGGAAGGCTTGGTGTAAACCTCTTCTCAGGGATAAAGAAAGTGAAGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGGAGGCTAACCTC  
 ATAAAAGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGGCAGAGGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTGTATCGACCCGAGCGTGCAGCTAACGCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATCGAT  
 GCAACGCGAACCTTACCAAGACTGACATGTCGAATCTGCTGAAAGGTGGAGTGCCTTCGG  
 GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGACTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCA  
 ACGAGCGAACCTCGTTTAGTGCAGCATTAAAGTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAA  
 ACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTACGTCTGGCTACACACGTACTACA  
 ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCGTAACCGTAGCTCAGTCAGA  
 TCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAGGAGGAACCGCTAGTAATTGCAGGTACGCATACTGCAGTGA  
 ATTGTTCCGGGCTTGTACACACCAGCCGTACACCATGGAAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTAC  
 TCCAACCTTCGGGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTACTGGGTGAAGTCGAACAAGGTAG  
 CCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCTTTAGGGAGACCTACCCAACTTGAATATCGAAAGC  
 ACAGAGTGAATAGATATCAAGAAGGTATCTAGGTGGTGCAGCAATTGTGGTAGCTTCAAAC  
 TATGATTGGTCTTATGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGACCGCACCCCTGATAAGGGTAGGGTCCC  
 TGGTCGAGTCCAGGATGGCCACCTGAAAGTAATTGTAATTACTAATTCTGAGTGTGAACT  
 TATGAATAACGCATTACGAATTACGAATTATTCTGGGGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTT  
 TGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCGAGTCCGCTAACCTCCACCTATAGAGCAAGATAAGAATGAAGAGG  
 ATGCAATTCAAGCAACTAGACATACTATAGTGATGTCGGACTGCTGGGTATTATCCAGTCAGAACCT  
 TGAAAATGCAAGTAAACGCGATTAGCAGGAGACACAGACATTCAATAGATGAATTGTGTTGCA  
 GTGGTAGACACCAATGTAAGGCTAATTAGACAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCCATGG  
 TGGAT

> Nostocaceae CENA389 16S RNAr (1413 nt)

GATGAACGCTGGCGGTATGTTAACACATGCAAGTCAACGGTCTTCGGACACAGTGGCGGACGG  
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG  
 TGCGCAAGGTAAAAGGCTTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAAG  
 AGCCTACCTAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATAC  
 CGCGTGGGGAGGAAGGCTTGGTGTAAACCTCTTCTCAGGGATAAAGAAAGTGAAGGTACCT  
 GAGGAATCAGCATGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTATCCGG  
 AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGGAGGCTAACCTC  
 ATAAAAGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTGGGGCAGAGGGAAATTCTGGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGG  
 ACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACAGATGGATACTAGG  
 CGTGGCTGTATCGACCCGAGCGTGCAGCTAACGCGTTAAGTATCCGCTGGGAGTACGCAC  
 GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAT  
 GCAACGCGAACACAGGTGGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCA  
 ACGAGCGAACCCCTCGTTTAGTGCAGCATTAAAGTGGGACTCTAGAGAGACTGCCGGTACAA

ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGCTACACACGTACTACA  
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCGTAAACCGTAGCTCAGTCAGTA  
TCGCAGGCTGCAACTCGCCTCGGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTAGCATACTGCAGTGA  
ATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAAGCTGGCAACGCCCGAAGTCATTAC  
TCCAACCTTCGGGGGGAGGATGCCTAACCGAGTGCTGGTGACTGGGTGAA

## APÊNDICE B - Sequências obtidas para os genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC*

> *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 *mdnA* - frame +3 (178 nt)  
TAACATGGCATATCCAAACGATCAACAGGGTAAAGCACATCCTTCTTGCTCGTTCTTGTCCGTA  
AGCAAAGAGGAATCTTCATCAGGTCTCCTCCCCTGAGCATGAGTCGATAACGCAAATACCCTC  
TGACTGGGAAGGGTTTAAACTCAGATCACTGAGTAATTAC

> *Nostocaceae* CENA358 *mdnA* - frame +3 (181 nt)  
TAAATATGGCATATCCAAACGATCAACAAGGTAAAGCACTTCCCTTCTTGCTCGTTCTTGTCCGTA  
AGCAAAGAGGAATCTTCATCAAGTCTCCTCCCCTGAGCCTACCTACGGGGTACCTTAAATACCC  
TTCTGACTGGGAAGACTTTAAACTCAGGTGACTTGAGTAATTGC

> *Desmonostoc* sp. CENA365 *mdnA* - frame +3 (181 nt)  
TAAATATGGCATATCCAAACGATCAACAAGGTAAAGCACTCCCTTCTTGCTCGTTCTTGTCCGTA  
AGCAAAGAGGAATCTTCATCAAGTCTCCTCCCCTGAGCCTACCTACGGGGTACCTTAAATACCC  
TTCTGACTGTGAAGACTTTAAACTCAGGTGACTTGAGTAATTGC

> *Nostocaceae* CENA376 *mdnA* - frame +3 (178 nt)  
TAACATGGCATATCCAAACGATCAACAGGGTAAAGCACATCCTTCTTGCTCGTTCTTGTCCGTA  
AGCAAAGAGGAATCTTCATCAGGTCTCCTCCCCTGAGCATGAGTCGATAACGCAAATACCCTC  
TGACTGGGAAGGGTTTAAACTCAGATCACTGAGTAATTAC

> *Chroococcidiopsis* sp. CENA353 *mdnB* - frame +2 (603 nt)  
TTAAGGTAGCGCGTTGGTTAGTAATTAGCGCAAATTGAGAAGGCTAAAATAAGTTATTACAAC  
TTCGTTGGCCTCAGAACAGTTGGCTTAATTATTCCCCCTACCTTAGTGACCAATAATCCGATGCTGCC  
CGGGAGTTTTTCCCAGGTTAGGGAAAGATGGTAGTAAATTGTTAATTGCGATGCCAGAAGTAT  
GGAGTCGCCAGAACATTTCCTTATACCAGTAGGGTAGAAAGCAGAACCTTGAGGAAGCAGAACATT  
TACGCTATTGCTATGGTTTCAAGCGAAATTCCAAACAATTAGAATTGAGAGTTGCTGTGGTT  
AATGGACAGACATTGTGGAGCTTAGAACCTCTCAGTATAATAATTCAAGCCGTAGATTGGCGAAG  
ACCGGGTATTGATCCAGGTGCTGGCAACATCATACTTACCCGATTCACTATTGCAGCAACTTCAGA  
TTTTATGGCTAATATAGGGTTGAATTGGGGCAGTTGATTCTTAACTCCAGAGGGTGAATAC  
GTTTTTAGAAGTTAACCTGTGGTAGTGGGAATGTTAGAACGGGATTAGATT

> *Nostocaceae* CENA358 *mdnB* - frame +2 (603 nt)  
TTAAGGTAGCGCGTTGGTTAGATAATTAGCGCAAATTGAGAAGGCTAAAATAAGTTACTACAAC  
TTCGTTGGCCTCAGAACAGTTGGCTTAATTATTCCCCCTACCTTAGTGACCAATAATCCGATGCTGCC  
CGGGAGTTTTTCCCAGGTTAGGGAAAGATGGTAGTAAATTGTTAATTGCGATGCCAGAAGTAT  
GGAGTCGCCAGAACATTTCCTTATACCAGTAGGGTAGAAAGCAGAACCTTGAGGAAGCAGAACATT  
TACGCTATTGCTATGGTTTCAAGCGAAATTCTAAACAATTAGAATTGAGAATTGCTGTGGTT  
AATGGACAAACATTGTGGGTGCTTAGATTCTCTCAGTATAATCATTCAAGCCGTAGATTGGCGAAG  
ACCGGGTATTGATCCAGGTGCTGGCAACATCATACTTACCCGATTCACTATTGCAGCAACTTCAGA  
TTTTATGGCTAATTAGGGTTGAATTGGGGCAGTTGATTCTTAACTCCAGAGGGTGAATAC  
GTTTTTAGAAGTTAACCTGGGTGGTAGTGGGAATGTTAGAACGGGATTAGATT

> *Desmonostoc* sp. CENA365 *mdnB* - frame +2 (603 nt)  
TTAAGGTAGCGCGTTGGTTAGATAATTAGCGCAAATTGAGAAGGCTAAAATAAGTTATTACAAC  
TGCCTTGGCCTCAGAACAGTTGGCTTGATTATTCCCCCCTACCTTAGTGACCAATAATCCTGATGCTGTG  
CGGGAAATTCTTCCCAGTTAGGGACGAATGGTAGTAAATTGTTAATTGCGATGCCACAGTAT  
GGAGTCGCCAGAACATTTCCTTATACCAGTAGGGTAGAAAGCAGAACCTTGAGGAAGCAGAACATT  
TACGTTATTGCTATGGTTTCAAGCGAAATTCTAAACAATTAGAATTGAGAATTGCTGTGGTT  
AATGGACAAACATTGTGGGTGCTTAGATTCTCTCAGTATAATCATTCAAGCCGTAGATTGGCGAAG  
ACCGGGTATCGATCCAGGTGCTGGCAACATCATACTTACCCGATTCACTATTGCAGCAACTTCAGA  
TTTTATGGCTAATTAGGGTTGAATTGGGGCAGTTGATTCTTAACTCCAGAGGGTGAAGTAC  
GTTTTTAGAAGTTAACCTGGGTGGTAGTGGGAATGTTAGAACGGGATTAGATT

> Nostocaceae CENA376 *mdnB* - frame +2 (603 nt)

TTTAAGGTCAAGCGCGTGGTTAGATAATTAGCGCAAATTGAGAAGGCTAAAATAAGTTATTACAAC  
 TTCGTTGGCCTCAGAAGTTGGCTGATTATTCCCCCACTTAGTGACCAATAATCCTGATGCTGCC  
 CGGGAGTTTTCCCAGGTTCAAGGGACGAATGGTGAGTAAATTGTTACTCGCATGCCACAGTAT  
 GGAGTCGCCGAAATTTCTTATACAGTAGGGTCAAAGCAGAACCTGAGGGAGCAGAATCTT  
 TACGTTATTGTCCCAGGTTCAAGCGGAAATTCTAAACAATTAGAATTGAGAATTGTCGTGGTT  
 AATGGACAAACATTGTGGGTGTTAGATTCTCTCAGTATAATCATTAGCCGTAGATTGGCGAAG  
 GCCGGGTATTAATCCAGGTGCTGGCACATCATACTTACCCGATTCACTATTGCAGCAACTCAGA  
 TTTTATGGCTAATTAGGGTTGAATTGGGGCGTTGATTTATCTTAACTCCAGGGGGAGAATAC  
 GTTTTTAGAAGTTAACCTGTCGGTAGTGGGAATTGAGAACGGGATTAGATT

> Chroococcidiopsis sp. CENA353 *mdnC* - frame +1 (269 nt)

ATGACTTTCAGGAAAACATTCTAAAGCTTGGATTACGCATTACTATCGTCGGTGAACAAATATT  
 TACGGCAGCGATAATTCTCAACAATTAGACGGCGCTATCTACGATTGGCGAAAAGAGGGAAAGAGCGC  
 TCCATCAACAATGGCAACCCTACGATTACCGAAAACATTGAAAAACAACTACTTGAATTAAATGAAA  
 TATTCGGTCTTAATTATGGTCAATTGATATGATTGTTACACCAGATGAACGTTATCTTTT

> Nostocaceae CENA358 *mdnC* - frame +1 (268 nt)

ATGACTTTCAGGAAAACATTCTAAAGCTTGGATTACGCATTACTATCGTCGGTGAACAAATATT  
 TACGGCAGCGATAATTCTCAACAATTAGACGGCGCTATCTACGATTGGCGAAAAGAGGGAAAGAGCGC  
 CCATCAACAATGGCAACCCTACGATTACCGAAAACATTGAAAAACAACTACTTGAATTAAATGAAA  
 ATTCGGTCTTAATTATGGTCAATTGATATGTTACACCAGATGAACGTTATCTTTT

> Desmonostoc sp. CENA365 *mdnC* - frame +1 (269 nt)

ATGACTTTCAGGAAAACATTCTAAAGCTTGGACTACGCATCACTATCGTCGGTGAACAAATATT  
 TACGGCGCGATAATTCCAACAATTAGACGGCGCTATCTACGATTGGCGAAAAGAGGGAAAGAGCGC  
 TACATCAACAATGGCAACCCTACGATTACCGAAAACATTGAAAAAGCAACAACTTGAATTAAATGAAA  
 TATTCGGTCTTAATTATGGTCAATTGATATGATTGTCACACCGATGAACGTTATCTTTT

> Nostocaceae CENA376 *mdnC* - frame +1 (269 nt)

ATGACTTTCAGGAAAACATTCTAAAGCTTGGACTACGCATCACTATCGTCGGTGAACAAATATT  
 TACGGCGCGATAATTCCAACAATTAGACGGCGCTATCTACGATTGGCGAAAAGAGGGAAAGAGCGC  
 TACATCAACAATGGCAACCCTACGATTACCGAAAACATTGAAAAAGCAACAACTACTTGAATTAAATGAAA  
 TATTCGGTCTTAATTATGGTCAATTGATATGATTGTCACACCGATGAACGTTATCTTTT

## APÊNDICE C - Sequências do gene *nifH* das linhagens potencialmente diazotróficas isoladas nesse estudo

> *Leptolyngbya* sp. CENA350 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CTCAACTCGCTTAATGCTGCACAGCAGGGCTCAAACCACCGTTCTGCACCTGGCAGCCGAGCGTGGTG  
CCGTTGAAGATGTGGAACCTGAAGAAGTGTGCTGACCGGTTATCGCGATGTTGTTGAGTCG  
GGCAGGCTCTGAACCCGGTGTGGATGCGCTGGACGAGGCATCATCACTCCATCAACTCCCTGGAAGA  
GAATGGTGCTTACGAAGACCTCGATTCGTCCTATGACGTATTGGCGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCATTGGAAAGGCAAAGCTCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC
```

> *Nostocaceae* CENA352 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CTCCACCCGTTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACAACCGTTCTCACCTCGCCGCAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTAACCGGTTCCGCAACGTTGCGTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTCTAGAAGA  
AAATGGTGCTTACCAAGACCTAGACTTCGTATCTTACGACGTATTAGGTGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCATTCCGCGAAGGTAAGGCACAAGAAATCTACATCGTTACATCT
```

> *Microchaetaceae* CENA354 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CTCTACCCGCTTAATGTTACACAGTAAAGCTCAAACCAACCGTTCTCACCTCGCTGCTGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGACCTCGAACTACACGAAGTCATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTGCGTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTCTAGAAGA  
AAACGGTGCTTACCAAGACGTAGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCATTCCGTGAAGGCAAAGGCCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC
```

> *Nostoc* sp. CENA356 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CTCCACCCGTTGATGCTGCACAGCAAAGCTCAAACCAACCGTTCTCACCTCGCCGCAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTGAAGGTTCCGTGACGTTCTTGCCTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTCTAGAAGA  
AAACGGTGCTTACCAAGACGTAGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TTGCTATGCCATTCCGTGAAGGTAAGGCACAAGAAATCTACATCGTTACATCC
```

> *Nostocaceae* CENA357 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CTCCACCCGTTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCAACCGTTCTCACCTGGCTGCTGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGCTCCGTGGTGTGCGTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTCTAGAAGA  
AAATGGCGCATACCAAGACGTAGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCATTCCGTGAAGGTAAGGCACAAGAAATCTACATCGTTACCTCT
```

> *Nostocaceae* CENA358 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
CGATGTCACGATGTAGATTCTTGCTTACCTCACGAATAGGCATAGCGAAACCACCGCACACAA  
CGTCACCTAATACGTCGTAAGATACTGAAATCTAACGTTGGTAAGCACCCTTCTTAAGAAGTTG  
ATGGCGGTGATAATACCACGACCGGCACAAACCTACACCGGGTCTGGACCACGATTCTACGCAACG  
AACGTCACGGAAACCCCTGAGCATCACTCTTCAAGTTGATATCTTACTGCGCCACGTTCTGC  
CGAGGTGAAGAACGGTGGTTGAGCCTGCTATGCAGCATCAAACGGTGGAG
```

> *Brasilonema* sp. CENA360 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
TTCCACCCGTTGATGCTCCACAGCAAAGCCAAACCACCGTACTTCACCTCGCCGCTGAACGAGGCG  
CAGTAGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACCGGCTCCGTGGTGTGAAGTGCCTAGAATCT  
GGTGGTCCCGAACCTGGTGTGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTCTAGAAGA  
AAATGGTGCTTACCAAGACGTGGTTCTGTTAGCTACGACGTGTTGGTGACGTTGTTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCATTCCGTGAAGGTAAGGCACAAGAAATCTACATTGTGACCTCT
```

> *Brasilonema* sp. CENA361 *nifH* - frame +2 (325 nt)

```
TTCCACCCGTTGATGCTCCACAGCAAAGCCAAACCACCGTACTTCACCTCGCCGCTGAGCGGGGCG  
CAGTAGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACCGGCTCCGTGGTGTGCCTAGAATCT
```

GGTGGTCCAGAACCTGGTGCCTGGTCGCTGGCGTGGTATTATCACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAACGGTGCTTACCAAGACGTGGATTCTGTTAGCTACGACGTGGTGGTGAACGTTGTCTGCCTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTAAAGGTAAGCACAAGAAATCTACATTGTGACCTCT

> *Desmonostoc* sp. CENA362 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCGTTGATGCTACACAGCAAGGCTCAAACAACCAGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTGACCGGTTCCGTAACTGTTGTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTAGGTTGTGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAATGGTGCTTACCAAGACCTAGACCTCGTATCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTAAAGGTAAGGCAAGAAATCTACATCGTCACATCT

> *Desmonostoc* sp. CENA363 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCGACCGTTGATGCTACACAGCAAGGCTCAAACAACCAGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTGACCGGTTCCGTAACTGTTGTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTAGGTTGTGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAATGGTGCTTACCAAGACCTAGACCTCGTATCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTAAAGGTAAGGCAAGAAATCTACATCGTCACATCT

> *Desmonostoc* sp. CENA365 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCTACCGTTGATGCTCACAGTAAAGCTCAAACACAGTTCTCACCTAGCTGCTGAACGTGGTG  
CAGTAGAAAGATTAGAATTAGATGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGGGTGTTAAGTGCCTAGAGTCT  
GGTGGTCCAGAACCTGGTAGGTTGCACGGTGTGGTATCATACTGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AGCTGGTGCTTACCAAGACTTAGACCTCGTATCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTAAAGGTAAGGCAAGAAATCTACATCGTCACATCT

> *Brasilonema* sp. CENA366 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCTACCGCTTAATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACACCGTGCTTCACTGGCCGCTGAACGGGTG  
CTGTCGAAGATTAGAATCGAAGAAGTGTGCTCACCGGTTCCGTGGTGTAAAGTGCCTGGAAATCT  
GGTGGTCCCTGAACCTGGTAGGTTGCACGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAACGGTGCTTACCAAGACTTAGACCTCGTATCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTAAAGGTAAGGCAAGAAATCTACATCGTCACCTCC

> *Nostocaceae* CENA368 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCGTTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACACCCAGTTCTCACCTGGCTGCTGAACGTGGTG  
CAGTTGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTGCTGCTGAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTAGGTTGCACGGTGTGGTATCATACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAATGGCGCATACCAAGACGTAGACCTCGTATCTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGTGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATTGTAAAGGTAAGGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

> *Nostocaceae* CENA369 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCGACCGTTGATTCTGCACACGAAAGCTCAAACACCCAGTGCTGCACTTAGCTGCGGAACGAGGTG  
CTGTCGAAGACCTAGAACTTGTGAAGTGGTACTTGAAGGCTTCGAGGTATTAGATGCCTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCTGGTAGGTTGCACGGTGTGGTATCATACCGCCATCAACTTCTCGAAGA  
AAACGGCGCTTACAGTGGCGTAGATTCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TTGCTATGCCTATTGTAAAGGCAAGAAATTTACATTACCTCT

> *Desmonostoc* sp. CENA371 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCGTTGATGCTGCACAGCAAAGCTCAAACACCCAGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAAGATATCGAACTTGAAGAAGTGTGATGCTCAGGGGTTCCGTGACGTTAAGTGCCTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTAGGTTGTGCCGGTGTGGTATTATCACCGCCATCAACTTCTTAGAAGA  
AAACGGTGCTTACCAAGACCTAGACCTCGTATCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TTGCTATGCCTATCCGTAAAGGCAAGAAATCTACATCGTCACATCG

> *Nostocaceae* CENA373 *nifH* - frame +2 (325 nt)

TTCCACCGTTGATTCTGCACTGTAAGGCCAAACCACCGTGTACACCTCGCTGCTGAAAGAGGTG  
CAGTAGAAAGACCTGGAACTCGAAGAAGTGGTAATTAAATGGCTCCGAATATCAGATGCCTAGAATCT

GGTGGGCCAGAACCAAGGGTAGGCTGCGCCGTGAGGTATTATCACCGCCATCAACTCCTCGAAGA  
AAACGGTGCATATCAAGATGTAGATTCGTATCCTACGATGTGCTAGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TTGCTATGCCTATCCGTGAAGGAAAGGCACAAGAAATCTATACGTTACCTCT

> *Leptolyngbya* sp. CENA375 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGCTTGATGCTTACAGCAAAGCGAAACCACATTCTCACCTAGCAGCCGAGCGTGGCG  
CTGTGGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTGTGTTGACAGGTTATCGCGATGTCCGTTGCGTTGAATCC  
GGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGCGCTGGACGAGGCATTATCACGCCATCAACTCCTGGAAAGA  
AAATGGTGCCTATGAAGACCTCGACTCGTTCTTACGACGTATTGGCGACGTTGTGCGGTGGTT  
TTGCGATGCCATTGGAAAGGCAAAGCTCAGGAAATCTACATCGTACCTCC

> *Nostocaceae* CENA376 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGTTGATGCTGCACAGCAAAGCTCAAACAAACCGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CTGTAGAAGATCTAGAACTCGAAGAAGTAATGCTCACCGCTCCGTAATGTTGCGTGAATCT  
GGTGGCCCAGAACCCGGTGTGGTTGCGAGGCCGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAATGGTGCATACCAAGACGTTGACTCGTATCTTACGACGTATTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGGCAAAGAAATCTACATCGTACCTCT

> *Nostoc* sp. CENA377 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGTTGATGCTGCACAGCAAAGCTCAAACAAACCGTTACACCTCGCTGCTGAAAGAGGTG  
CAGTAGAGGCCCTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACGGTTCCGTGACGTTAAGTGCCTAGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCGTGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAACGGTCTACCAAGACTTAGACTCGTATCTTACGACGTATTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TTGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGGCAAAGCATAAGAAATCTACATCGTACATCA

> *Nostocaceae* CENA379 *nifH* - frame +2 (325 nt)

TTCCACCCGTTGATTCTGCACTGTAAGGCCAAACCACCGTGTACACCTCGCTGCTGAAAGAGGTG  
CAGTAGAGGCCCTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACGGCTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGAATCT  
GGTGGTCCCAGAACCTGGTGTGGTTGCGCTGGTGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAACGGTCTACCAAGACGTTGAGATTCTAGCTACGACGTGTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGGCAAAGCACAAGAAATCTACATTGTGACCTCT

> *Brasilonema* sp. CENA381 *nifH* - frame +2 (325 nt)

TTCCACCCGTTGATGCTCCACAGCAAAGCCAAACCACCGTACTTCACCTCGCCGCTGAGCGGGGCG  
CAGTAGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACGGCTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGAATCT  
GGTGGTCCCAGAACCTGGTGTGGTTGCGCTGGTGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAATGGTCTACCAAGACGTTGAGATTCTAGCTACGACGTGTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGGCAAAGAAATCTACATTGTGACCTCT

> *Brasilonema* sp. CENA382 *nifH* - frame +2 (325 nt)

TTCCACCCGTTGATGCTCCACAGCAAAGCCAAACCACCGTACTTCACCTCGCCGCTGAGCGAGGCG  
CAGTAGAAGATTGGAACCTCGAAGAAGTGTGATGCTCACGGCTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGAATCT  
GGTGGTCCCAGAACCTGGTGTGGTTGCGCTGGTGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAATGGTCTACCAAGACGTTGAGATTCTAGCTACGACGTGTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGGCAAAGAAATCTACATTGTGACCTCT

> *Desmonostoc* sp. CENA383 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGTTGATGCTACACAGCAAAGCTCAAACAAACCGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTGACCGGTTCCGTAACGTTGCGTTGCGTGAATCT  
GGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCGTGTGGTATTATCACGCCATCAACTCTTAGAAGA  
AAATGGTCTACCAAGACCTAGACTCGTATCTTACGACGTATTGGTGACGTTGTGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGCGAAGGTAAGGCAAAGAAATCTACATCGTCACATCT

> *Desmonostoc* sp. CENA386 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGTTGATGCTACACAGCAAAGCTCAAACAAACCGTTCTCACCTCGCCGAGAACGTGGTG  
CAGTAGAAGATATCGAAATCGAAGAAGTAATGCTGACTGGTTCCGCAACGTTGCGTTGCGTGAATCT

GGTGGTCCAGAACCGGTGAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATTATCACCGCCATTAACCTCTTAGAAGA  
AAATGGTGCTTACCAAGACCTAGACTTCGTATCTTACGACGTATTAGGTGACGTTGTGTGGTGGTT  
TCGCAATGCCAATCCCGAAGGTAAGGCACAAGAAATCTACATCGTTACATCA

> Nostocaceae CENA388 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCGACCCGTTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCACCGTTCTCACTTAGCTGCTGAACGC GGCG  
CTGTAGAAGACCTGGAAC TCGAAGAAGT GATGCTTACAGGCTTCCGTGGTGTGCTGGAAATCT  
GGTGGTCCAGAACCGGTGAGGTTGCGCCGGTGTGGTATTATCACCGCTATCAACCTCTTGGAAAGA  
AACGGCGCATACCAAGACGTTGACTTCGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTATGCGGTGGTT  
TCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCCAAGAAATCTACATCGTTACTTCC

> Nostocaceae CENA389 *nifH* - frame +2 (325 nt)

CTCCACCCGTTGATTCTGCATACGAAAGCTCAAACCACTGTACTGCACTTGGCTGCTGAAAGAGGTG  
CAGTAGAAGATTGGAAC TTGACGAAGTGGTACTTGAAGGCTTCCGAGGTATTAGATGCGTAGAATCT  
GGCGGCCAGAGCCTGGTAGGTTGCGCTGGTCGGGATCATCACCGCTATCAACTTCCTCGAAGA  
AACGGCGCTTACAGTGGGTAGATTCGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGGTGGTGGT  
TCGCTATGCCTATT CGTGAAGGTAAGCCAAGAAAGTCTACATCGTTACTTCC

**APÊNDICE D – UTOs (com mais de 5 sequências) obtidas no agrupamento considerando 80% de identidade de sequências de *nifH***

> UTO 1 - Dinitrogenase redutase (*nifH*) - frame +3 (266 nt)

CTCAGAACACCATCATGGAAATGGCTGCTGAAGCCGGTACGGTGAGGATCTGGAGCTGGAAGATGTT  
CTGAAAAGTAGGTTCGGTGGCGTCAAGTGCCTGAGTCGGTGGCCCAGAGCCAGGCCTGGTTGC  
TGGCCGTGGTGTGATCACCGCATTAACTTCTGGAAAGAAGAAGGCCTATGAAGACGATCTAGACT  
TCGTATTCTATGACGTACTGGGTGACGTTGTGCGGTGGCTCGCTATGCCATTGCGAA

> UTO 4 - Dinitrogenase redutase (*nifH*) - frame +3 (263 nt)

CGCAGCAGACCGTGCTTGACCTGCCGCCAACCGCGAACCGTAGAGAATCTGGAGCTGGAGGATGTC  
GTATCCTCCGGGTTCGGAGGCATCCTCTGCGTCGAGTCAGGCGGTCCCGAACCGGGTGTGCGCTGC  
CGGCCGCGGGATCATCACCTCGATCAATTCTGGAGGAGCAGGGCGCGTATGATGATGTCGATTTC  
TCTCCTATGATGCTTGGCGACGTCGTGCGCGATGCCATCCGCGAG

> UTO 5 - Dinitrogenase redutase (*nifH*) - frame +3 (263 nt)

CTCAACAAACTGTGCTTCACCTGCCGCTGAGCTCGGCTCAGTAGAGGATCTGGAACCTGGAGGATGTC  
CTGCAAAAGGCTTGGCAGACATTATCAACGTAGAGTGCAGGCGAACCTGAACCGGGTGTAGGCTGC  
TGGACGCGGTATTATTACCGCCATCAACTTCTGGAGCAGGAAGGCGCATATAACGGACCTGGATTTC  
TGTCTATGACGTACTTGGTGACGTTGTATGCCGGGCTTCGCAATGCCATCCGTGAG

> UTO 9 - Dinitrogenase redutase (*nifH*) - frame +3 (266 nt)

CCCAGAACTCGATCATGGAAATGCCGCCAACCGCGCAGCGTGGAAAGACCTCGAGCTCGAACGCTG  
CTCAAGGTTGGCTATCGCAGACATCAAGTGCCTGGAGTCGGCGGCCCTGAGCCGGCTTGGCTAGCG  
TGGCCCGGGCGTGTACAGCAGCAACTTCTCGAAGAAGAAGGCGCTACGACGAAGCCTGGACTT  
CGTGTCTACGACGTCTCGCGACGTGGTTGCGGTGGCTCGACGATGCCATCCGTGAA

> UTO 12 - Dinitrogenase redutase (*nifH*) - frame +3 (263 nt)

CTCAAGACACCATCCTGCGCTGGCTGCTGAAGCCGGTCGGTGAGGACCTGGAGCTCGAACGACGTC  
ATGAAGATCGGCTACAAGGACATCCGCTGCGTTGAGTCGGTGGCCCTGAGCCGGCGTCGGCTGC  
TGGCCCGGGCGTGTACACTCGATCAACTTCTGGAAAGAAAACGGCGCTACGACGGCGTGGACTATG  
TGTCTACGACGTGCTGGTGACGTGGTGCGCGGGCTCGCCATGCCATCCGTGAA

> UTO 13 - Dinitrogenase reductase (*nifH*) - frame +3 (263 nt)

GGCAGGACACGATCCTGAGCCTCGCGCGAATCGGGCAGCGTCGAGGACCTCGAGAGATCGAGGATGTC  
ATGAAGGTCGGCTATCGCAGACATCCGCTGCGTCGAGTCGGCGGTCCGGAGGCCGGCGTCGGCTGC  
AGGTCGCGGCGTGTACACTCGATCGACTTCTGGAAAGAGAATGGCGCTATGAGGACATCGACTACG  
TGTCTACGACGTGCTGGTGACGTGGTGCGCGGGCTCGCGATGCCATCCGTGAG

> UTO 14 - Dinitrogenase reductase (*nifH*) - frame +3 (266 nt)

CACAGAACACCATATGGAGATGCCGCCAACGTGGCTCGGTGGAGGACCTCGAGCTCGAACGATGTC  
CTGCAAATCGGCTACGGCAGCTGCGCTGCGCGAACATCTGGCGGCCGGAGCCAGGCCTGGCTGTG  
GGGTCGCGGGGTGATCACCGCAATCAACTTCTCGAGGAGGAAGGCGCTACGAGGACGATCTGACT  
TCGTGTTCTATGACGTGCTGGGACGTGGTCTCGCGGGCTCGCGATGCCATCCGTGAA

> UTO 15 - Dinitrogenase reductase (*nifH*) - frame +3 (279 nt)

CCGGCTCGGTGAGGATCTGGAACCTCGAACGACGTCATGAAGATCGGCTACAAGGGCATCAAGTGCACC  
GAATCGGGCGGTCCGGAGCCGGCGTCGGCTGCGCCGGCGTGGCGTTATCACCGCCATCAACTTCT  
GGAAGAGAACGGCGCTATGACGACGTGGACTATGTGTCCTACGACGTGCTGGCGACGTGGTGTGCG  
GCGGCTTCGCCATGCCATCCGTGAAAACAGGCCAGGAAATCTACATCGTCTGAGCAGGGCTGGCAAG  
GCGCATA

> UTO 16 - Dinitrogenase reductase (*nifH*) - frame +3 (263 nt)

CCCAGGACACGGTTCTGTCGCTTGCCTGCCGCCAGGAGGGCTCGGTGAGGACCTGGAACCTCGAAAACGTG  
CTGAAGATCGGCTACAAGGGATCAAGTGCCTGAGTCGGCGACCGGAACCGGGCGTTGGTTGTGCG

TGGTCGCGGTGTCATCACCTCGATCAACTCCTCGAGGAAAACGGCGCCTATGACGATGTCGACTACG  
TCTCCTACGACGTTCTCGGTGACATCGTCTCGGTGGTTGCCATGCCATCCCGAG

> UTO 18 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (266 nt)

CCCAAACCACAGTGCTACACGTAGCTGCTGAAAAAGGTGCTGTTGAAGATGTAGAACTCGAAGAACGTA  
CTGAAAACGGCTTGTGACATCCGTTGCGTTGAGTCCGGCGGTCCGGAGCCGGGTGTCGGTTGCGC  
CGGCCGCGCGTGTACCGCCATCAACTCCTGGAAAGAAGAACGGCGCCTACGACGAAGACCTCGACT  
TCGTGTTCTACGACGTGCTGGGTGACGTGGTGTGCGGTGCCATGTCGATCCCGCAA

> UTO 19 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (289 nt)

CGCAGGACACCATCCTCAGCCTGGCGCCAACGCCGGCGAGCGTCGAGGACCCCGAGATCGAGGACGT  
GATGAAGGTCGGCTACCGCGATATCCGCTGCGTGGCTGCGCCGCCGCGTACATCACCGCGATCA  
ACGTTCCTCGAAGAGAACGGCGCTATGAGGACGTCGACTACGTCCTACGACGTGCTCGGCACGT  
GGTGTGCGCGGGCTTCGCGATGCCGAGAACAAAGGCCAGGAAATCGTACATCGTCTGAGCG  
GGCTGGCAAGGCGCATA

> UTO 22 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (266 nt)

CTCAGGATACCATCATGCACCTGGCCCGATGCGGGCTCCGTGGAGGACCTGGAGCTCGACGACGTT  
CTTAAGACCGGCTACGCCGGCATCAAGTGCCTGAGTCCGGCGGCCCTGAGCCCAGGTGTCGGCTGTGC  
CGGGCGCGCGTACGCCGATCAACTTCTGGAAAGAGAACGGCGCTACGAGGAAGACCTCGACT  
TCGTCTCTACGACGTGCTGGCGACGTGGTGTGCGGGGGTTGCCATGCCATTCCGAG

> UTO 28 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (304 nt)

CCCAGAATACCATCATGGAAATGGCGGCTGAAGCCGGCTCTGTGGAAGATCTGAACTCGAAGATGTA  
CTGCAGATCGGTTACGGCAACGTCGGTGCAGAGTCAGGTGGCTCTGAGCCAGGAGTTGGTTGTGC  
CGTCGTGGTGTATCACCGCCATCAACTCTGGAAAGAGAACGGCGCTACGAAGAACATCTGACTT  
CGTATTCTACGACGTACTGGGTGACGTAGTGTGTGTTGCGATGCATCGNGAAACAAGCCAGAAATC  
TACATCGTCTGAGCGGGCTGGCAAGGCGCATA

> UTO 29 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (266 nt)

CTCAAGACACCATCCTGCGCTGGCTGAAAGCCGGTCGGTGAGGACCTGGAGCTGAAAGATGTA  
CTGCAAATTGGCTACGGCAATGTCGGTGTGAGAGTCAGGTGGCCCGAACGGGGGGTGGTTGCGC  
AGGACGCGGGGTATTACCGCCATTAACTCCTCGAAGAAGAGGGTGCCTATGAGGCGGATCTCGACT  
TCGTATTTATGACGTACTGGGGATGTGGTGTGGTGGGTTGCCATGCCATCCGTGAA

> UTO 30 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (264 nt)

CGCAGACCACGGTGATGCACCTGGCCGCTGAAGCCGGCTGGAGGACCTCGAACTCGAAGACGTG  
CTGTCCGTCGGCTACGGCGCGTGAAGTGCCTGCAATCCGGCGGTCCGGAGCCGGGTGTCGGTTGCGC  
CGGCCGCGCGTGTACCGCATCAACTCCTCGAAGAAGAACGGTGCCTACGACGGCGTGGACTATG  
TTCCCTACGACGTGCTGGGTGATGTGGTGTGCGGGCGGTTCGCAATGCCATTGACGAA

> UTO 31 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (263 nt)

CGCAGCTCTGTCCTGCAGATGGCCCGGGAAAAGGCTGGTCGAGGATCTGGAGGCCAGAGGAAGTC  
ATCCCGCTCGGCTTCAAAGGCATTGCGCTGAGTCGGCGGACCGGAGCCTGGCGTCGGCTGCGC  
CGGCCGCGCGTACGCCGATCAATTCTGGAGGAGAACGGCGCTACGACGACATGGATTATA  
TCTCCTATGACGTTCTCGGCGACGTGGTGTGCGGCGGTTGCCATGCCATCCCGCGAG

> UTO 33 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (263 nt)

CGCAGGATAACGGTGCTGAGCCTGGCGGGAGGCCGGTGGAGGATCTCGAACTCGAGCAGGTG  
CTCAAGATCGGCTACAAGGGATTAAATGCGCCGAATCCGGCGGCCAGAGCCCGGTGTTGGCTGCGC  
CGGCCGCGCGTTATTACCTCCATCAACTCCTGGAGGAGATGGCGCGTATGACGACGTGGATTACG  
TGTCTATGACGTGCTGGGCACGTGGTGTGCGGCGGTTGCCATGCCATTGCGCAA

> UTO 34 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (263 nt)

CGCAGGACACAATCCTGAGCCTCGCGGCCGCCAGGGCAGCGTCGAAGATCTGAACTTGAAAGACGTC  
CTGAAGATTGGTTACCGCGACATCAAGTGCCTGAGTCTGGCGGCCAGGCCGGCGTCGGCTGTGC

CGGCCGCGGGTTATTACTCGATCAACTCCTGGAAGAAAACGGCGCTTACGAAGACCTCGACTACG  
TTTCCTACGACGTACTCGGTGATGTGGTGTGCCGCTGCCATGCCATCCGCGAG

> UTO 35 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (266 nt)

CCCAGAATACCGTCATGCAGCTCGCTCGGACGCTGGTCGGTCAAGATCTTGAACGGACATGTG  
CTTGCAGTCGGTTCGGGTATCAAGTGCCTGGAATCGGGTGGTCCGGAGCCGGCGTCGGCTGC  
TGGCCGCGCGTGTACCGCGATCAACTCCTCGAAGAGGAAGGCCTACGACGAGGACCTCGATT  
TCGTCTTCTACGATGTGCTGGTGATGTGGTCTGCCGCTGCCATGCCATTGCGAA

> UTO 36 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (263 nt)

CCCAGGACACCACCTTGAGCCTGCTCGGGAGCAAGGCGCCGTCGAGGACCTTGAGCTCGAAGACGTG  
ATGAAGATCGGGTATAAGGGCATTAAGTGCACCGAATCCGGCGTCTGAGCCGGAGTGGGCTGC  
GGACCGCGCGTTATCACCGCCATCAACTCCTCGAAGAGAACGGTGCTTATGACGATGTCGACTACG  
TCTCCTACGACGTGCTGGCGACGTGGTGTGCCGCTCGCGATGCCATTGCGAG

> UTO 39 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (266 nt)

TGCAGGACACCGTGCTCAGCCTCGCGGCCAAGCCGGCTCCGTGGAAGATCTGGAACCTCGAAGACGTG  
CTGCAGATCGGTTACGGCGGTGCGCTGTGCCGAATCCGGTGGTCCGGAGCCAGGAGTAGGTTGTG  
CGGTCGTGGTGTATCACCGCCATCAACTCCTGGAAGAAGAACGGCGCTACTCAGACGATCTGGACT  
TCGTGTTCTATGACGTACTGGGGACGTAGTGTGGCGTTGCCATGCCATTGCGAA

> UTO 40 - Dinitrogenase reductase (nifH) - frame +3 (290 nt)

CTGACTCAACCCGCTGATTCTGCATGCAAAGCACAGAACACCATTATGAAATGGCGGCTGAAGTG  
GGCTCTGTGGAAGATCTGGAGCTGGAAGATGTGATGCAAATCGGCTACGGCGGCGTCCGTTGTGCCGA  
ATCCGGCGGCCCTGAGCCGGGTGAGGTTGTGCCGGCGTGGTGTATCACCGCCATCAACTCCTGG  
AAGAAGAACGGCGCGTATGTGCCGGATCTGGACTTCGTATTTACGACGTACGTGGGGACGTGGTGTG  
TGGCGGGTTCGCAACGCC

## APÊNDICE E – Quadro resumo

Caracterização das linhagens de Cyanobacteria isoladas nesse estudo

Linhagem	Caracterização	
	Taxonômica	Funcional/Fisiológica
CENA360	<i>Brasilonema</i> sp.	AER
CENA361	<i>Brasilonema</i> sp.	AER, <i>mdnA</i>
CENA366	<i>Brasilonema</i> sp.	<i>mdnA</i> , <i>mdnB</i>
CENA381	<i>Brasilonema</i> sp.	AIA, AER, <i>mdnC</i>
CENA382	<i>Brasilonema</i> sp.	AIA, AER, <i>mdnA</i>
CENA367	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	AIA, MCN, <i>mdnA</i> , <i>mdnC</i>
CENA353	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	<b><i>mdnA</i>, <i>mdnB</i>, <i>mdnC</i></b>
CENA362	<i>Desmonostoc</i> sp.	-
CENA363	<i>Desmonostoc</i> sp.	-
CENA365	<i>Desmonostoc</i> sp.	<b><i>mdnA</i>, <i>mdnB</i>, <i>mdnC</i></b>
CENA371	<i>Desmonostoc</i> sp.	MCY, AER
CENA380	<i>Desmonostoc</i> sp.	-
CENA383	<i>Desmonostoc</i> sp.	AIA, MCN
CENA386	<i>Desmonostoc</i> sp.	AER, <i>mdnA</i> , <i>mdnC</i>
CENA350	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>nifH</i>
CENA364	<i>Leptolyngbya</i> sp.	-
CENA372	<i>Leptolyngbya</i> sp.	AIA
CENA375	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<b>FBN</b>
CENA377	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>mdnA</i>
CENA387	<i>Leptolyngbya</i> sp.	AIA
CENA354	Michocheataceae	AER, MCY, <i>mdnA</i> , <i>mdnC</i>
CENA356	<i>Nostoc</i> sp.	-
CENA352	Nostocaceae	AIA, MCY, AER, <i>mdnA</i> , <i>mdnC</i>
CENA357	Nostocaceae	<i>mdnA</i>
CENA358	Nostocaceae	AER, <b><i>mdnA</i>, <i>mdnB</i>, <i>mdnC</i></b> ,
CENA368	Nostocaceae	AIA
CENA369	Nostocaceae	AER
CENA373	Nostocaceae	<i>mdnA</i>
CENA376	Nostocaceae	AIA, <b><i>mdnA</i>, <i>mdnB</i>, <i>mdnC</i></b>
CENA379	Nostocaceae	<i>mdnC</i>
CENA388	Nostocaceae	AIA
CENA389	Nostocaceae	-
CENA370	<i>Oculatella</i> sp.	-
CENA351	<i>Pleurocapsa</i> sp.	AIA, <i>mdnA</i> , <i>mdnB</i>
CENA355	Pseudanabaenaceae	MCN, <i>mdnA</i>
CENA359	Pseudanabaenaceae	AIA, <i>mdnA</i>
CENA374	Pseudanabaenaceae	AIA, <i>mdnA</i>
CENA378	Pseudanabaenaceae	<i>mdnA</i> , <i>mdnB</i>
CENA384	Pseudanabaenaceae	-
CENA385	Pseudanabaenaceae	<i>mdnA</i> , <i>mdnC</i>

AIA: ácido indol acético; AER: aeruginosina; MCN: cianopeptolina; MCY: microcistina; FBN: fixação biológica do nitrogênio; *em itálico*: genes amplificados; **em negrito**: genes sequenciados.