



**LARISSA LANGSDORFF PIMENTA**

**EFEITO DA LIMITAÇÃO DE LUZ E NUTRIENTES NA  
ALOCÇÃO PARA ESTRUTURAS ADAPTATIVAS EM  
CIANOBACTÉRIAS ASSOCIADAS EPIFITICAMENTE ÀS  
RAIZES DE *Salvinia auriculata***

**LAVRAS-MG**

**2020**

**LARISSA LANGSDORFF PIMENTA**

**EFEITO DA LIMITAÇÃO DE LUZ E NUTRIENTES NA ALOCAÇÃO PARA  
ESTRUTURAS ADAPTATIVAS EM CIANOBACTÉRIAS ASSOCIADAS  
EPIFITICAMENTE ÀS RAIZES DE *Salvinia auriculata***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração ecologia e conservação de recursos em paisagens fragmentadas e agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Flávia de Freitas Coelho

Orientadora

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pimenta, Larissa Langsdorff.

Efeito da limitação de luz e nutrientes na alocação para estruturas adaptativas em cianobactérias associadas epifiticamente às raízes de *Salviniaauriculata* / Larissa Langsdorff Pimenta. - 2020.

35 p. : il.

Orientador(a): Flávia de Freitas Coelho.

Coorientador(a): Marcelo Gomes Gomes Marçal Vieira Vaz.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cianobactérias. 2. Estruturas adaptativas. 3. Macrófita aquática. I. Coelho, Flávia de Freitas. II. Vaz, Marcelo Gomes Gomes Marçal Vieira. III. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**LARISSA LANGSDORFF PIMENTA**

**EFEITO DA LIMITAÇÃO DE LUZ E NUTRIENTES NA ALOCAÇÃO PARA  
ESTRUTURAS ADAPTATIVAS EM CIANOBACTÉRIAS ASSOCIADAS  
EPIFITICAMENTE ÀS RAIZES DE *Salvinia auriculata***

**EFFECT OF LIGHT AND NUTRIENT LIMITATION ON ALLOCATION FOR  
ADAPTIVE STRUCTURES IN CYANBACTERIA EPIFITICALLY ASSOCIATED  
TO THE ROOTS OF *Salvinia auriculata***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração ecologia e conservação de recursos em paisagens fragmentadas e agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 02 de março de 2020.

Dr. Cleber Cunha Figueredo UFMG

Dra. Grazielle Sales Teodoro UFPA

Dra. Vanessa Leite Rezende UFLA

Profa. Dra. Flávia de Freitas Coelho

Orientadora

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2020**

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais por todo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, principalmente minha querida mãe que sempre batalhou muito pra eu chegar até aqui, sei do seu amor e da sua grande torcida para que todos meus projetos de vida fossem concluídos com êxito, você é minha inspiração de mulher guerreira e batalhadora!

À minha irmã Melissa pelo companheirismo e todo apoio e amizade de sempre. Você é minha companheira de todas as horas, me vê sorrir e me vê chorar, e independente da ocasião está sempre comigo!

A toda minha família pelo carinho e incentivo.

Às amigas de casa pela convivência, pelos momentos juntos de risadas, jogos, de cantoria.

À minha amiga Gabi por todo o carinho, pelas horas de conversa, pela amizade incondicional, pelos conselhos, pelas viagens e passeios, enfim, por tudo!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Biologia pela oportunidade concedida, ao Departamento de Botânica Aplicada por toda estrutura, equipamentos, e ao Departamento de Microbiologia pelo suporte fornecido.

À professora Dra. Flávia Freitas Coelho por todos os ensinamentos, orientação, dedicação e amizade. Agradeço e serei eternamente grata por tudo que aprendi com você, tanto no sentido profissional quanto pessoal, você é uma pessoa incrível e é muito bom ter a sua amizade, cada conversa, cada café, almoço compartilhado, idas na sala “pra falar de coisa séria” tudo foi e continuará sendo muito importante para mim.

Ao meu coorientador Marcelo por todas as colaborações e ensinamentos, sua ajuda foi essencial e extremamente significativa para a execução deste trabalho.

Aos amigos do LEC por toda amizade e trabalho. Cada um de vocês, com seu jeito de ser colaborou para este trabalho. Ao Gustavo pelas inúmeras conversas, risadas e por horas de microscópio juntos, foi muito bom poder contar contigo sempre que precisei! Ao Michel pelos momentos de laboratório em que discutimos nossos trabalhos, trocamos ideias, pelo companheirismo no experimento e fora dele também! À Aninha pelas conversas tanto de trabalho quanto pessoais, pela mão amiga sempre disposta a ajudar! À Grécia pelas conversas, cafés e assuntos de estatística, é sempre bom conversar e enxergar uma luz no fim do túnel rsrs! Ao Luís pela companhia de laboratório, conversas e café!

**A todos que sempre torceram por mim,**

Obrigada!

## RESUMO

Cianobactérias são organismos procariontes, pertencentes ao grupo das bactérias, que realizam fotossíntese oxigênica e, algumas linhagens, são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da enzima nitrogenase. Possuem arranjos celulares variados, podendo ser unicelulares, coloniais ou filamentosas, sendo que estas últimas podem produzir estruturas adaptativas como heterócitos, acinetos e hormogônios, dependendo das condições e recursos do ambiente. São encontradas em diversos habitats, tanto aquáticos fazendo parte do fitoplâncton, quanto terrestres em solos, fazendo partes de associações com outros organismos como na samambaia aquática *Azolla*, quanto fazendo parte do perifiton como em *Salvinia auriculata*. Esta é uma samambaia aquática conhecida por ocupar rapidamente corpos d'água em condições favoráveis para seu crescimento. Entender como as cianobactérias epifíticas às raízes desta samambaia podem produzir estruturas adaptativas frente às mudanças de fatores ambientais abióticos, como luz e nutrientes, pode ser importante para compreender as estratégias que esses organismos podem desenvolver para crescer e se reproduzir. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar os efeitos da limitação por luz e nutrientes na produção de heterócitos, acinetos e hormogônios pelas cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* e isolá-las, além de verificar o crescimento clonal (rametes) desta macrófita aquática. Para isto, foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando-se sombrite (70%) para a manipulação de luz e Solução de Hoagland (força 50%) para manipulação de nutrientes. Os resultados mostraram que os fatores luz e nutrientes afetam a produção dos três tipos de estruturas adaptativas. Os heterócitos são produzidos em maior número quando há ausência de nutrientes e sob sol pleno. Já os acinetos são produzidos principalmente na ausência de nutrientes e na sombra. Os hormogônios foram produzidos nos tratamentos com nutrientes e principalmente na sombra. A produção de acinetos foi negativamente correlacionada à produção de hormogônios, nos dois tratamentos com escassez de nutrientes, o número de acinetos produzidos foi de 630 contra apenas 11 hormogônios. Durante os sete meses de repicagem e plaqueamento das cianobactérias obtivemos 13 linhagens morfolologicamente distintas em processo de isolamento. Sobre o crescimento clonal de *S. auriculata*, medido pelo aumento no número de rametes, observou-se um aumento no número dos mesmos nos tratamentos com nutrientes, independente do fator luz, corroborando a hipótese de que esta macrófita cresce vigorosamente em ambientes eutrofizados.

**Palavras-chave:** Acinetos, Cianobactérias filamentosas, Estratégias adaptativas, Heterócitos, Hormogônios, Samambaia aquática.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic organisms, belonging to the group of bacteria, which perform oxygen photosynthesis and, some strains, are able to perform biological nitrogen fixation (FBN) through the enzyme nitrogenase. You can organize different cell phones, be single-celled, colonizers or filaments, the latter being able to produce adaptable structures such as heterocystes, akinets and hormogonium, depending on the conditions and resources of the environment. They are found in several habitats, both aquatic as part of the setting, as well as terrestrial in the sun, forming part of groups with other organisms such as the *Azolla* aquatic fern, and being part of the peripheral as in *Salvinia auriculata*. This is an aquatic fern known for quickly occupying bodies of water in conditions favorable to its growth. Understanding how the cyanobacteria associated with the roots of this fern can produce structures adaptable to changes in environmental factors, such as light and nutrients, can be important for understanding how these actions can be used for growth and reproduction. Thus, the objective of the work was to verify the effects of limitation by light and nutrients on the production of heterocystes, akinets and hormogonium by the epiphytic cyanobacteria in the roots of *S. auriculata* and isolated them, in addition to verifying the clonal growth (branches) of this macrophyte. aquatic. For this, an experiment was carried out in the greenhouse using sombrite (70%) for manipulating light and Hoagland's Solution (force 50%) for manipulating nutrients. The results demonstrated that light and nutrient factors affect the production of three types of adaptive structures. Heterocystes are used in the greatest number when there is a lack of nutrients and in full sun. Akinets are used mainly in the absence of nutrients and in the shade. The hormones were used in procedures with nutrients and mainly in the shade. The production of amino acids was negatively correlated with the production of hormogonium, in the two treatments with a shortage of nutrients, the number of akinetes produced was 630 against just 11 hormogonium. During the seven months of cyanobacterial stripping and plating, we obtained 13 morphologically distinct strains in the isolation process. Regarding the clonal growth of *I*, as measured by the increase in the number of branches, there was an increase in the number of them in treatments with nutrients, regardless of the light factor, corroborating the hypothesis that this macrophyte grows vigorously in eutrophic environments.

**Keywords:** Akinetes; Filamentouscyanobacteria; Adaptative strategies; Heterocyst, Hormogonium; Water fern

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1	<i>S. auriculata</i> e cianobactérias epifíticas.....	13
2.2	Experimento em casa de vegetação.....	13
2.3	Observação das cianobactérias e contagem das estruturas adaptativas....	14
2.4	Amostragem e isolamento das cianobactérias epifíticas.....	15
2.5	Análise de Dados.....	15
3	RESULTADOS.....	16
4	DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÕES.....	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## 1 INTRODUÇÃO

O gás nitrogênio ( $N_2$ ) é amplamente disponível na atmosfera, porém a maioria dos seres vivos não consegue incorporá-lo em seu metabolismo por ele ser um gás inerte (HOFFMAN et al., 2014). ON é um importante constituinte na composição de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, além de possuir diversas funções celulares (THAMDRUP, 2012). No entanto, apenas alguns microrganismos procarióticos, conseguem converter através da enzima nitrogenase, o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ).Esse processo é denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (DE VRIES; DE VRIES, 2018; FOWLER, et al., 2013; HOFFMAN et al., 2014; ZHENG et al., 2019).

A conversão do  $N_2$  requer a quebra de uma ligação tripla covalente muito estável e uma grande energia é gasta neste processo. Estima-se que para cada molécula de  $N_2$  fixada o gasto é de 15 a 16 moléculas de ATP (RAYMOND et al., 2004; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011; THOMPSON; ZEHR, 2013).Dentre os microrganismos capazes de realizar a FBN estão algumas bactérias anaeróbicas, microaerófilas (que crescem apenas em quantidades baixas de oxigênio), actinobactérias(grupo de bactérias gram positivas filamentosas), e as cianobactérias (pertencentes às bactérias gram negativas)(SPRENT; SPRENT, 1990; MAZHAR;COHEN; HASNAIN, 2019).

A classificação taxonômica das cianobactérias vem passando por reestruturação e revisão nos últimos anos, com o avanço nos campos de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares (KOMÁREK et al., 2014). No sistema de classificação proposto por Komárek et al., (2014) são descritas 8 ordens: Gloeobacterales, Synechococcales, Spirulinales, Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Chroococcidiopsidales e Nostocales. As cianobactérias podem ser encontradas fazendo parte do fitoplâncton, fazendo parte do perifiton, em solos e em associação com outros organismos(EVANS; BURRIS, 1992). Em associação, podem ser encontradas dentro de algum tecido do organismo associativo (endofítica) ou estarem no entorno (associação epifítica) (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO, 1998).Elas realizam fotossíntese oxigênica e contribuem de forma substancial para os ciclos globais de nitrogênio(ELBERT et al., 2012; GONZALEZ et al., 2019).

A espécie *Anabaena azollae* é simbiote, e vive dentro das cavidades das folhas da samambaia aquática *Azolla* (KOLLAH; PATRA; MOHANTY, 2016), a qual é pertencente à família Salviniaceae. Em outras espécies da mesma família, como as pertencentes ao gênero *Salvinia*, por exemplo, não foram descritas relações endofíticas com cianobactérias. O

nitrogênio fixado pelas cianobactérias funciona como um fertilizante natural para o crescimento de *Azolla*, liberando a planta de sua dependência do nitrogênio disponível no ambiente, e permitindo um maior crescimento populacional nos corpos d'água (KOLLAH; PATRA; MOHANTY, 2016). É bem conhecido que as macrófitas aquáticas desempenham funções ecológicas importantes, como na ciclagem de nutrientes, no acúmulo de metais pesados presentes em corpos d'água, e no fornecimento de matéria orgânica para a cadeia detritívora, sendo assim responsáveis muitas vezes por mais de 50% do material orgânico dos ambientes aquáticos através dos processos de decomposição (BIANCHINI JR., 2003; BRUM; ESTEVES, 2001; ESTEVES, 2011; MEDEIROS et al., 2017).

*Salviniaauriculata* é uma macrófita aquática flutuante muito comum em água doce, e em condições favoráveis coloniza extensas superfícies de água em um curto período (MEDEIROS et al., 2017; PEIXOTO; PIMENTA; ANTUNES, 2005). Pode, ainda, ser considerada como bioacumuladora em ecossistemas aquáticos, uma vez que é capaz de remover e acumular compostos orgânicos e inorgânicos presentes na água (SUÑE et al., 2007). Entretanto, apesar das importantes funções ecossistêmicas realizadas por esta macrófita, ela pode ocupar rapidamente os corpos d'água, devido ao seu crescimento clonal, tornando-se prejudicial a esses ambientes (JULIEN; CENTER; TIPPING, 2002; JULIEN; HILL; TIPPING, 2009; ROOM, 1983).

Do mesmo modo que muitas espécies de plantas, quando expostas a estresses ambientais, apresentam respostas em seu desenvolvimento, morfologia ou reprodução (COELHO; LOPES; SPERBER, 2000; MEDEIROS et al., 2017; SCHLICHTING, 1986), as cianobactérias também desenvolveram uma série de adaptações fisiológicas e morfológicas que permitem com que elas ocupem vários habitats (POSTIUS et al., 2001). Dentre essas estruturas adaptativas, produzidas por linhagens filamentosas, tem-se o heterócito (célula especializada em FBN), acineto (células de resistência semelhantes a esporos) e hormogônios (fragmento de filamentos, geralmente móveis que auxiliam na dispersão) (MEEKS et al., 2002; GONZALEZ et al., 2019).

As cianobactérias heterocitadas fixam o N mesmo na presença de oxigênio ( $O_2$ ), pois têm uma separação espacial com o meio externo devido à espessa parede celular (ADAMS; DUGGAN, 2003), a qual impede o contato do  $O_2$  com a enzima nitrogenase, o que a inativaria; e ao mesmo tempo realiza a fotossíntese oxigênica pelas células vegetativas. Os heterócitos se diferenciam a partir das células vegetativas em intervalos geralmente em condições de falta de nitrogênio e em intervalos regulares ao longo do filamento (MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014; WOLK; ERNST; ELHAI, 1994). Eles são

morfologicamente distintos das células vegetativas; pode possuir tamanho maior seu formato é variável (formas mais arredondadas, retangulares e quadráticas) aspecto amarelado devido à perda de pigmentação, e possuem grânulos de cianoficina (CP), geralmente nos pólos adjacentes às células vegetativas (KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010). A diferenciação dos heterócitos envolve alterações metabólicas e morfológicas complexas, pois esta célula impede o contato da nitrogenase com o  $O_2$  atmosférico, e também do  $O_2$  produzido pelas células vegetativas adjacentes durante a fotossíntese (MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014; PETER WOLK, 1996).

Nas cianobactérias homocitadas, ou seja, as que não possuem heterócito, a FBN pode ocorrer principalmente na ausência de luz, quando a célula vegetativa não realiza a fotossíntese (POSTIUS et al., 2001). Bergman et al., (1997) relataram cerca de 70 linhagens de cianobactérias homocitadas capazes de realizar FBN, mas apenas algumas poderiam realizar esse processo na presença de  $O_2$ , pois a maioria necessita de condições micro-oxiais ou anóxicas (POSTIUS et al., 2001; RIPPKA; WATERBURY, 1977; WEISSHAAR; BÖGER, 1983). Além disso, existem também espécies de cianobactérias unicelulares que fixam o  $N_2$  na presença de oxigênio e na ausência de luz (CARPENTER; CAPONE, 1992; GRIFFITHS; GALLON; CHAPLIN, 1987; HUANG; CHOW, 1988; POSTIUS et al., 2001; SROGA, 1997).

Em contraste com o conhecimento que se tem sobre a diferenciação de heterócitos em condições de cultivo isolado obtido nas últimas décadas (KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010; PEREZ et al., 2016) pouco se sabe sobre o processo de diferenciação de acinetos (PEREZ et al., 2016) e hormogônios, os quais são essenciais para o estabelecimento de simbioses planta-cianobactéria e fungo-cianobactéria formando líquens. Tais simbioses contribuem significativamente para a fixação biológica global de nitrogênio (ELBERT et al., 2012; KLUGE et al., 2002; MEEKS, 2005).

Os acinetos são células de paredes espessas, semelhantes a esporos, que se diferenciam das células vegetativas em resposta a diversas condições ambientais desfavoráveis (como limitação por temperatura, luz e nutrientes), dependendo das espécies de cianobactérias (KAPLAN-LEVY et al., 2010). São células dormentes que não se assemelham aos endósporos na estrutura e no mecanismo de diferenciação e não são resistentes ao calor extremo; são maiores e possuem uma parede mais espessa que as células vegetativas e contêm grande quantidade de materiais de reserva (KAPLAN-LEVY et al., 2010). A forma e a posição no filamento diferem entre as espécies, e, em alguns casos, o heterócito influencia em sua localização (WOLK, 1965). Eles podem germinar e produzir novos filamentos sob

condições favoráveis ao desenvolvimento, portanto, os acinetos fornecem às cianobactérias um meio de encistar ou sobreviver a períodos com condições não favoráveis ou flutuantes (ADAMS; CARR, 1981; KAPLAN-LEVY et al., 2010; MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014). A diferenciação dos acinetos, normalmente, difere da formação dos heterócitos, principalmente em relação ao sinal ambiental que induz sua formação, mas, também em sua morfologia, estrutura do envelope celular e função (ADAMS; DUGGAN, 1999; MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014).

A formação de hormogônios pode ser considerada uma estratégia reprodutiva, uma vez que eles são fragmentos curtos originados da quebra de tricomas vegetativos (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993), possuindo geralmente formato menor e diferente das células vegetativas (MEEKS; ELHAI, 2002). Esse tamanho menor é resultante de divisões celulares sem aumento na biomassa celular (HERDMAN; RIPPKA, 1998). São estruturas que podem apresentar motilidade a curta distância e consideradas unidades infectantes das associações simbióticas de cianobactérias com briófitas, fungos e outros organismos eucariontes (ADAMS; DUGGAN, 2008; MEEKS, 1998). Nas associações simbióticas com espécies heterocitadas, a indução do hormogônio parece ser feita pelo parceiro associado na falta de nitrogênio fixado, o qual emite um sinal químico chamado fator indutor de hormogônios (HIF) (MEEKS; ELHAI, 2002; TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993). Nas cianobactérias de vida livre, e nas linhagens homocitadas, a indução do hormogônio ocorre, principalmente, por mudanças na intensidade, ou na qualidade da luz, mas a disponibilidade de nutrientes também é um fator importante (MEEKS; ELHAI, 2002; TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993).

Quanto aos mecanismos de movimento do hormogônio que atuará na dispersão da cianobactéria existem dois modos, um envolvendo as estruturas pili que são encontradas dispostas em anéis adjacentes à junção septal (DUGGAN; GOTTARDELLO; ADAMS, 2007; KHAYATAN; MEEKS; RISSER, 2015), e o outro é através da secreção de polissacarídeo, em que as cianobactérias deslizam deixando um rastro mucilaginoso (HOICZYK; BAUMEISTER, 1998).

Devido à importância ecológica das cianobactérias nos ecossistemas aquáticos, pois estas podem formar “blooms”, que podem afetar a comunidade no geral, tanto pelo fornecimento de  $O_2$  e de nitrogênio, através da FBN (DIEZ; ININBERGS, 2014), faz-se necessário aumentar o conhecimento de suas estratégias adaptativas. Assim, o objetivo deste estudo foi examinar como fatores abióticos, como luz e nutrientes, afetam a diferenciação de estruturas adaptativas, como heterócitos, acinetos e hormogônios (ADAMS;

DUGGAN, 1999; MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014), os quais atuam na sobrevivência, crescimento e reprodução, bem como realizar o cultivo das cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculatae* avaliar o crescimento clonal desta macrófita. Focamos nas cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata*, tanto devido à importância ecológica desta macrófita para os ecossistemas aquáticos, quanto pela escassez de conhecimento desta associação (BERGMAN; RAI; RASMUSSEN, 2007).

Baseados na premissa de que a limitação de luz e nutrientes afeta as estratégias adaptativas das cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata*, testamos as hipóteses de que: (1) haverá uma maior produção de heterócitos em condições de escassez de nutrientes e sob sol pleno, pois estas fixam o  $N_2$  suprindo a falta do nitrogênio; como a produção de heterócitos consome muita energia é provável que sob sol pleno sua produção seja favorecida. (2) Acinetos serão, predominantemente, produzidos em condições limitantes ao crescimento, como sob escassez de nutrientes e sombra. (3) Hormogônios serão produzidos abundantemente na sombra, pois são estruturas de reprodução que dispersam para locais iluminados; um maior número deles também será encontrado em condições com disponibilidade de nutrientes. (4) o crescimento clonal, através da produção de novos rametes de *S. auriculata* será favorecido sob condições de abundância de nutrientes, entretanto, de acordo com Medeiros et al., 2017; 2019, apesar do aumento no número de rametes ser maior na sombra, em condições de sol pleno o crescimento clonal não é afetado.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 *S. auriculata e cianobactérias epifíticas*

*Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae) é uma samambaia aquática livre-flutuante, muito comum em lagoas temporárias em planícies de inundação (COELHO et al. 2005; MIRANDA; SCHWARTSBURD, 2019), sendo, sob condições favoráveis, rapidamente disseminadas por propagação vegetativa colonizando extensas áreas em poucos dias (MEDEIROS et al., 2019; MEDEIROS et al., 2017). Nas espécies de *Salvinia* os rametes são conectados por rizomas, formando colônias, e compostos pelo nó, por dois folíolos aéreos responsáveis pela fotossíntese, e por folhas submersas, finamente dissecadas, com função de raiz pois são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (ROOM, 1983; SCULTHORPE, 1967).

Nas folhas submersas de *S. auriculata* foram encontradas linhagens filamentosas homocitadas e heterocitadas de cianobactérias epifíticas (LLANGSDORFF, UFLA pesquisa não publicada). Esta associação, conhecida como perifiton-macrófita, é descrita como uma unidade ecológica nos ecossistemas aquáticos (CAMARGO; FERRAGUT, 2014; GOLDSBOROUGH; MCDOUGAL; NORTH, 2005).

### 2.2 *Experimento em casa de vegetação*

Para a montagem do experimento foram coletadas colônias de rametes de *S. auriculata* em uma lagoa permanente localizada na região sudeste do Brasil (21°08'56"S, 44°52'53"W). Após a coleta, as plantas foram levadas para uma casa de vegetação, lavadas para que fossem retiradas as partículas de solo e partes mortas, e passaram por um período de aclimação de dez dias. Em seguida, foi montado o experimento, que teve duração de 28 dias.

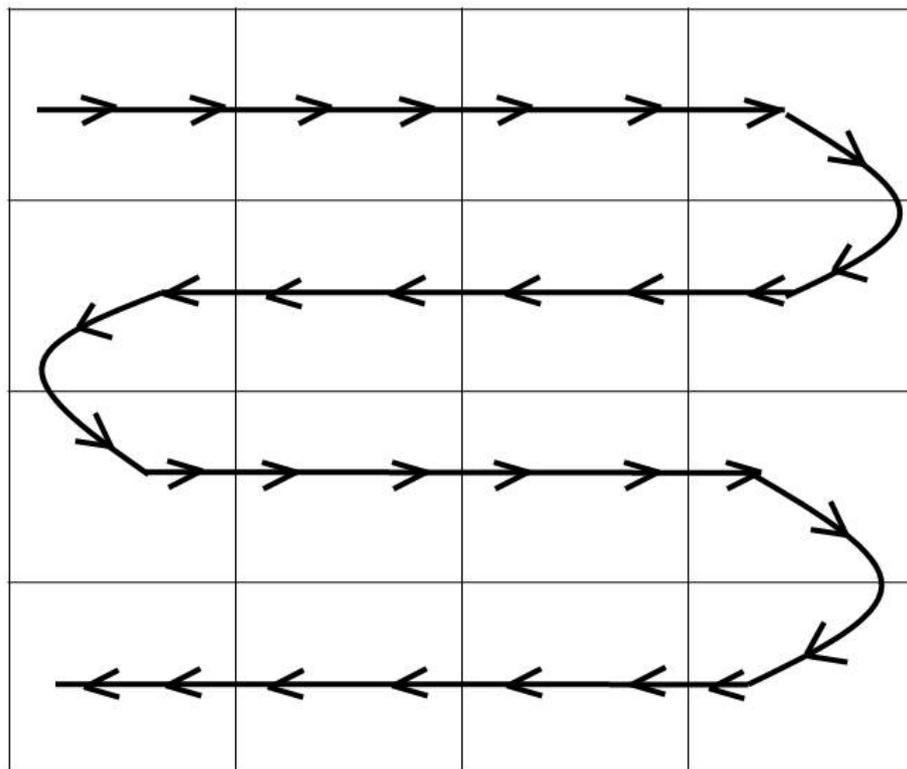
Foram colocados dez rametes de *S. auriculata* de tamanhos similares em bandejas plásticas, com capacidade para três litros, e submetidos a quatro tratamentos - com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) (HOAGLAND; ARNON, 1950) sob sol pleno (sem sombrite) (CN/SP); sem adição de nutrientes, sob sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (cobertos com sombrite) (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS). Cada tratamento teve quatro repetições totalizando 16 bandejas (N = 16). A cada sete dias foram feitos espremidos das raízes para coleta das cianobactérias epifíticas. O espremidido foi feito retirando-se pequenos fragmentos

das “raízes” de todos os rametes de *S. auriculata* e coletando o líquido espremido dos mesmos. Logo após, a amostra era fixada e preservada em solução de Transeau. Para cada 1 ml de espremido era colocado 1 ml de solução e as amostras eram mantidas em duplicatas. Após isto, os rametes novos foram contados, a fim de avaliar o crescimento clonal, e a solução de Hoagland, bem como a água nas bandejas foram completadas para manter o nível de três litros de líquido nas bandejas.

### 2.3 Observação das cianobactérias e contagem das estruturas adaptativas

Para cada tratamento, foram feitas 28 lâminas a fresco dos espremidos já fixados (sete lâminas por amostragem). Foram realizadas quatro amostragens durante todo o experimento (a cada sete dias), totalizando 448 lâminas preparadas e levadas ao microscópio óptico (Microscópio Binocular E100 LED Nikon). Cada lâmina foi examinada cuidadosamente, e as cianobactérias filamentosas presentes foram observadas em objetiva de 40X. A contagem das estruturas foi feita em objetiva de 100X, todos os heterócitos, acinetos e hormogônios (somente os que estavam dentro do filamento) foram contados percorrendo a lâmina de modo similar à câmara de Neubauer (FIGURA 1).

**Figura 1** – Critério para contagem das estruturas adaptativas (heterócitos, acinetos e hormogônios)



#### **2.4 Amostragem e isolamento das cianobactérias epifíticas**

As amostras (1 ml por bandeja) de espremido das raízes de *S. auriculata* foram retiradas de rametes advindos do experimento após os 28 dias e foram colocadas em 20 ml de meio BG-11 (com presença de N) e BG 11<sub>0</sub> (ausência de N) (ALLEN, 1998), em sua forma líquida para favorecimento de crescimento tanto de linhagens potencialmente fixadoras de N quanto de não fixadoras. Após um período de 15 dias, uma amostra de 100 µl foi transferida para placas de Petri contendo os mesmos meios, mas em condição sólida. As placas foram mantidas em uma bancada, mantendo sob controle um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, com luminosidade em torno de 30-40 micromoles de fótons/m<sup>2</sup>/s. Após um período de quatro semanas, as colônias crescidas em meio sólido foram transferidas para uma nova placa de Petri através da técnica de estria simples. Foi feito um acompanhamento, com visualizações de lâminas a fresco das colônias morfológicamente distintas em placa, para registro das linhagens obtidas antes de passar para uma nova placa de Petri com intuito de isolá-las. No início do isolamento as amostras coletadas do experimento foram mantidas durante 15 dias nos meios de cultivo em sua forma líquida, depois foram transferidas para o meio sólido e o procedimento de estriamento foi repetido a cada 30 dias por sete meses a fim de se obter culturas unialgais para a realização de experimentos futuros com as linhagens já isoladas.

#### **2.5 Análise de Dados**

Para verificar se existe efeito do tratamento (luz e nutrientes) na produção de heterócitos, acinetos, hormogônios e de rametes da samambaia aquática *S. auriculata*, utilizamos teste de Kruskal-Wallis, devido à não normalidade dos dados. Além disso, foi realizada uma análise de comparações múltiplas de médias similares (Stepwise e step-down) e foi feita uma correlação de Spearman entre a produção de acinetos e hormogônios. As análises foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics versão 22.

### 3 RESULTADOS

Tanto os nutrientes quanto a luz afetaram a produção de heterócitos, acinetos e hormogônios(TABELA 1).

**Tabela1** – Número total de heterócitos, acinetos e hormogônios em cada tratamento; com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) e sol pleno (CN/SP); sem adição de nutrientes e sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS).

<b>Tratamentos</b>	<b>Heterócito</b>	<b>Acineto</b>	<b>Hormogônio</b>
(CN/SP)	135	31	25
(SN/SP)	3191	266	2
(SN/CS)	1440	364	9
(CN/CS)	41	39	95

Fonte: Do Autor (2020)

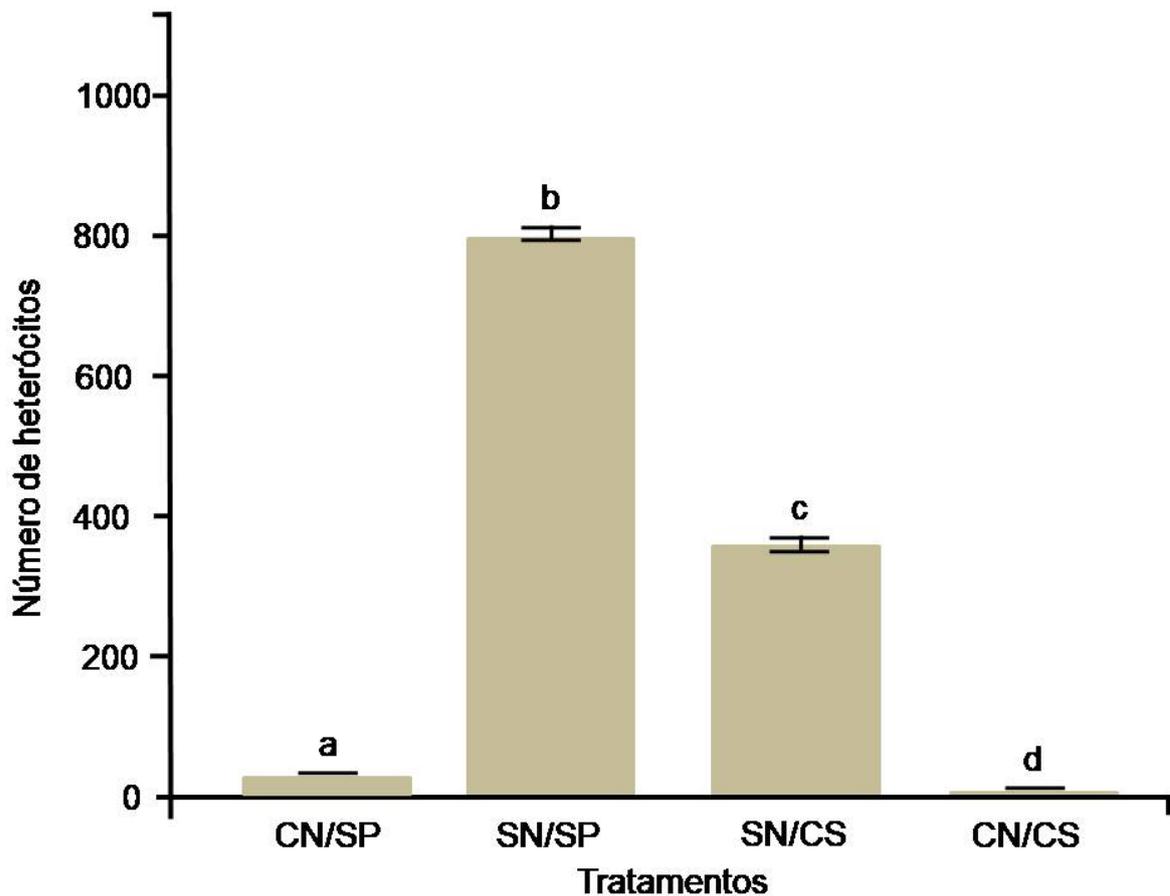
O número de heterócitos produzidos pelas cianobactérias diferiu entre os tratamentos (KW= 14,138; p= 0,003).Ao realizar a análise de agrupamento por médias, todos os tratamentos diferiram (FIGURA 2A). Sem adição de nutrientes e sob sol pleno (SN/SP), as cianobactérias produziram um número de heterócitos maior (3.191) comparado aos tratamentos (CN/CS), (SN/CS) e (CN/SP) (TABELA1; FIGURA 2A).

A produção de acinetos também foi afetada pelos tratamentos (KW= 13,701; p= 0, 003). Sob escassez de nutrientes e sob sombreamento o número total de acinetos produzidos foi de 364 contra apenas 31 sob abundância de nutrientes e sol pleno (SN/CS x CN/SP) (TABELA 1; FIGURA 2B).Houve diferença no número de acinetos produzidos nos tratamentos (SN/SP x SN/CS), o que não ocorreu nos tratamentos (CN/SP x CN/CS) com 31 e 39 acinetos (TABELA 1; FIGURA 2B).

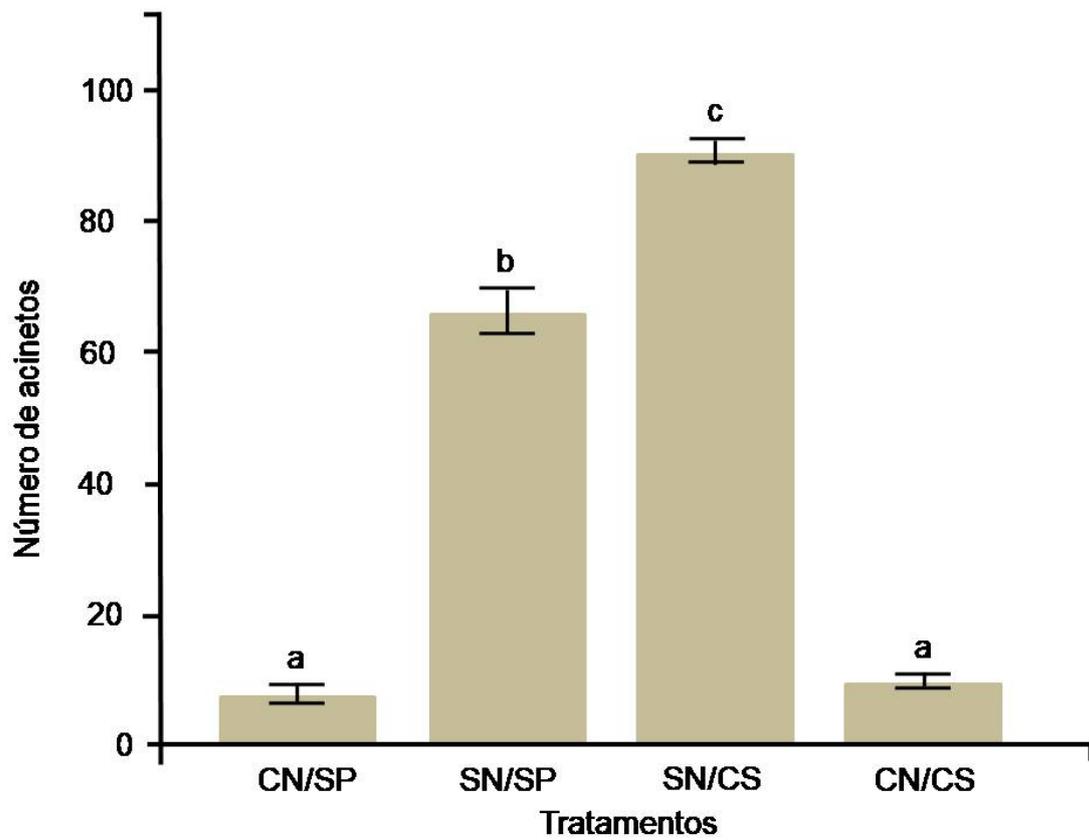
Assim como heterócitos e acinetos, a produção de hormogônios foi afetada pelos tratamentos (KW= 13,951; p= 0,003). As cianobactérias sob abundância de nutrientes e sob sombra (CN/CS) produziram um total de 95 hormogônios, diferentemente dos outros tratamentos (SN/CS), (SN/SP) e (CN/SP) (TABELA 1; FIGURA 2C).

**Figura2** – Número de estruturas adaptativas produzidas pelas cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* em cada tratamento- com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) e sol pleno (CN/SP); sem adição de nutrientes e sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS); (A) Número de heterócitos; Os valores de média dos tratamentos (CN/SP), (SN/SP), (SN/CS) e (CN/CS) foram 6,5; 14,5; 10,5 e 2,5 respectivamente (B) Número de acinetos; Os valores de média dos tratamentos (CN/SP), (SN/SP), (SN/CS) e (CN/CS) foram 3,0; 10,5; 14,5 e 6,0 respectivamente (C) Número de hormogônios; Os valores de média dos tratamentos (CN/SP), (SN/SP), (SN/CS) e (CN/CS) foram 10,50; 2,75; 6,25 e 14,5 respectivamente.

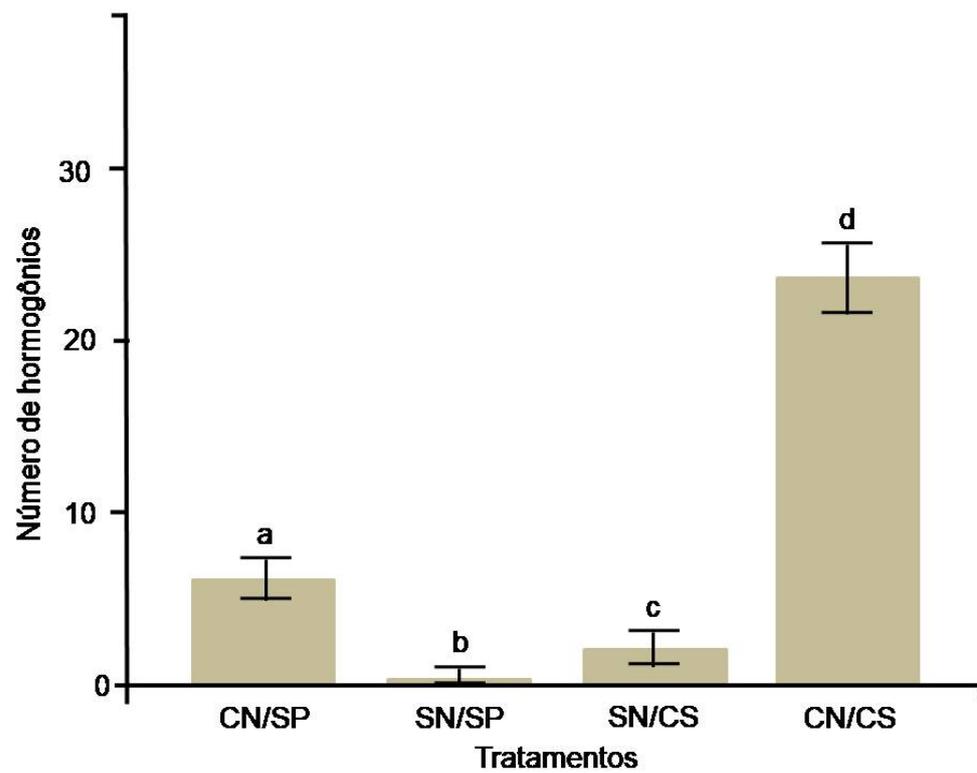
A



B

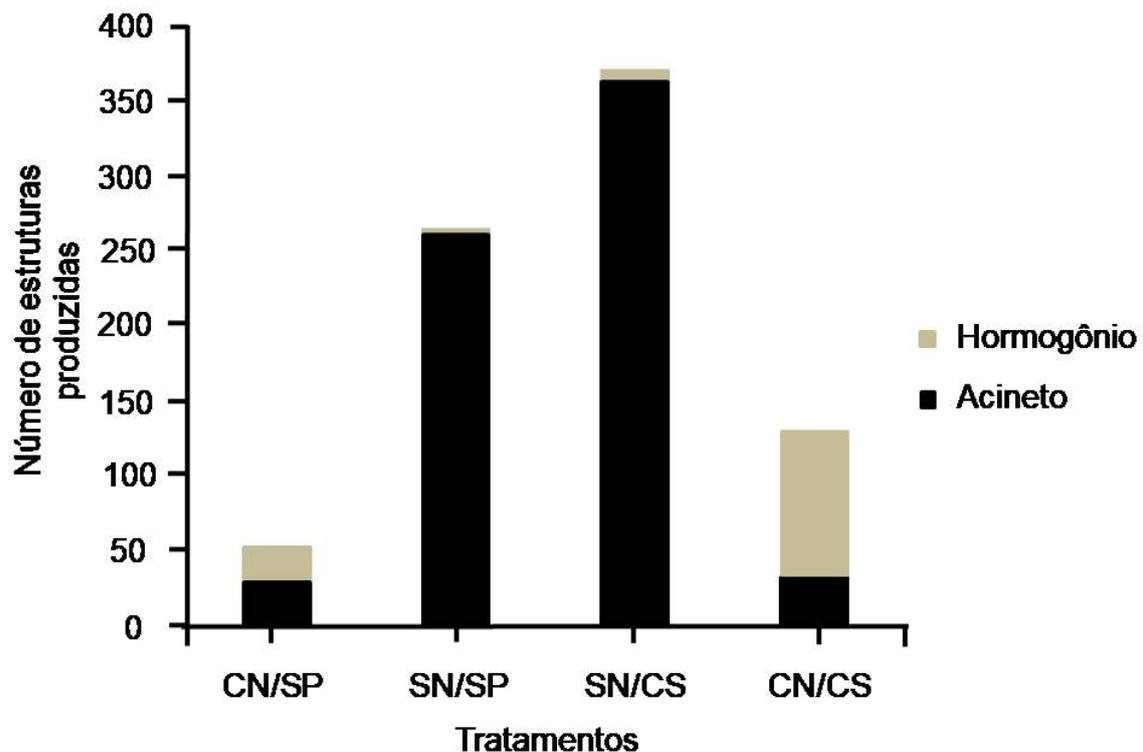


C



A produção de acinetos e hormogônios foi negativamente correlacionada ( $r = -0,602$ ;  $p = 0,014$ ). Nos dois tratamentos onde as cianobactérias foram submetidas à escassez de nutrientes (SN/SP) e (SN/CS) houve uma grande produção de acinetos (266; 364 respectivamente); em contraste, nestes mesmos tratamentos foram produzidos dois e nove hormogônios respectivamente (FIGURA 3).

**Figura 3** – Hormogônios e acinetos produzidos em cada tratamento; com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) e sol pleno (CN/SP); sem adição de nutrientes e sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS).



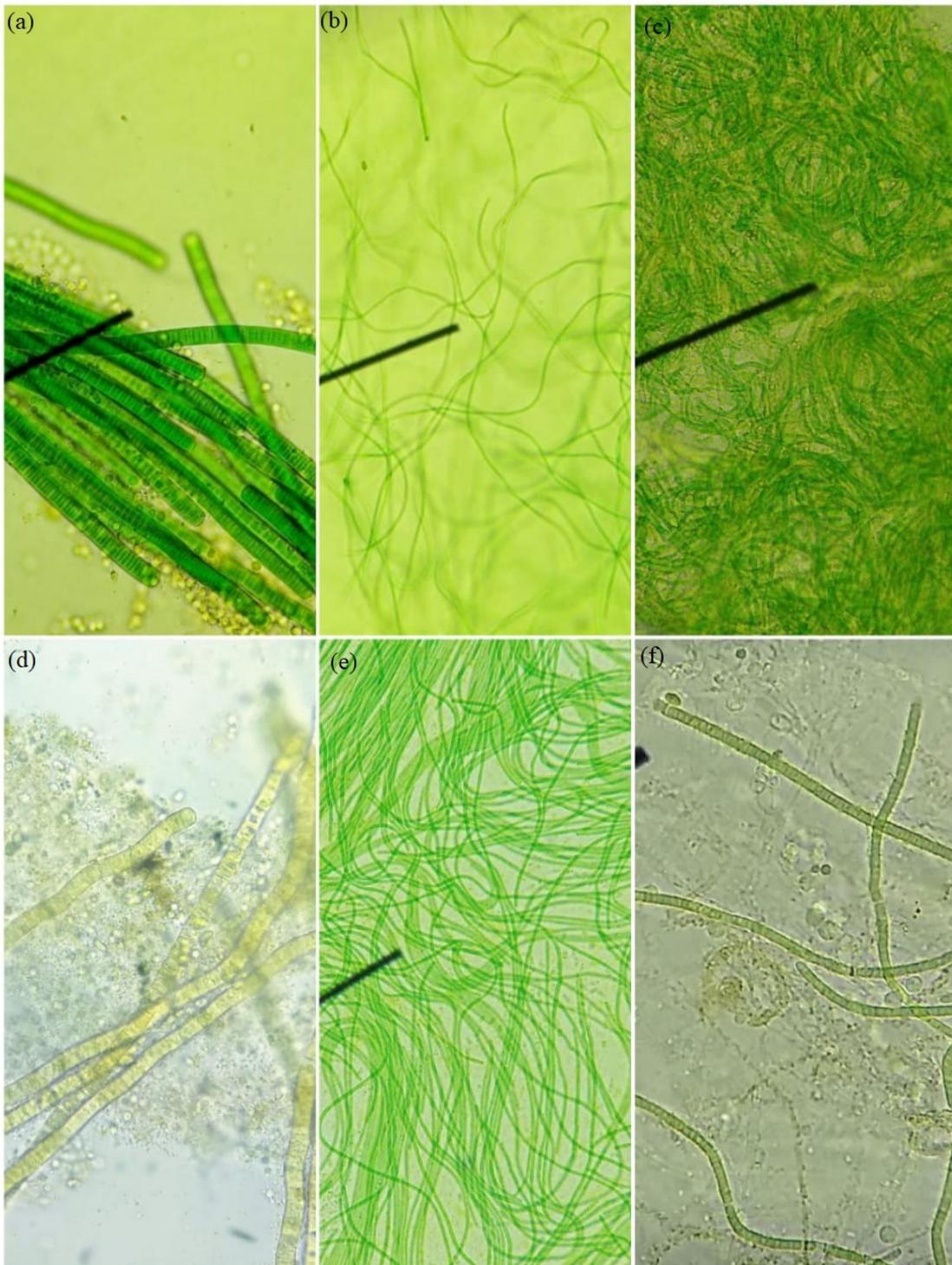
Fonte: Do Autor (2020)

Durante a visualização das lâminas foi observado que havia predominância de linhagens homocitadas e heterocitadas de acordo com o tratamento. Nos tratamentos com a adição de nutrientes predominava filamentos homocitados e, quase não havia heterócitos e/ou acinetos nas raras linhagens heterocitadas encontradas. Nas 112 lâminas feitas dos tratamentos com adição de nitrogênio, cerca de 90% não apresentava linhagens heterocitadas.

Os poucos heterócitos e acinetos observados encontravam-se em estágios iniciais de diferenciação ou não eram considerados funcionais, por não apresentarem coloração tão amarelada quanto os heterócitos maduros, e os acinetos não possuíam parede espessa nem conteúdo celular muito granuloso, característica bastante notável em acinetos maduros. Já nos tratamentos sem adição de nutrientes havia predominância (cerca de 90%) de filamentos heterocitados, com heterócitos e acinetos maduros, e raramente eram encontrados filamentos homocitados.

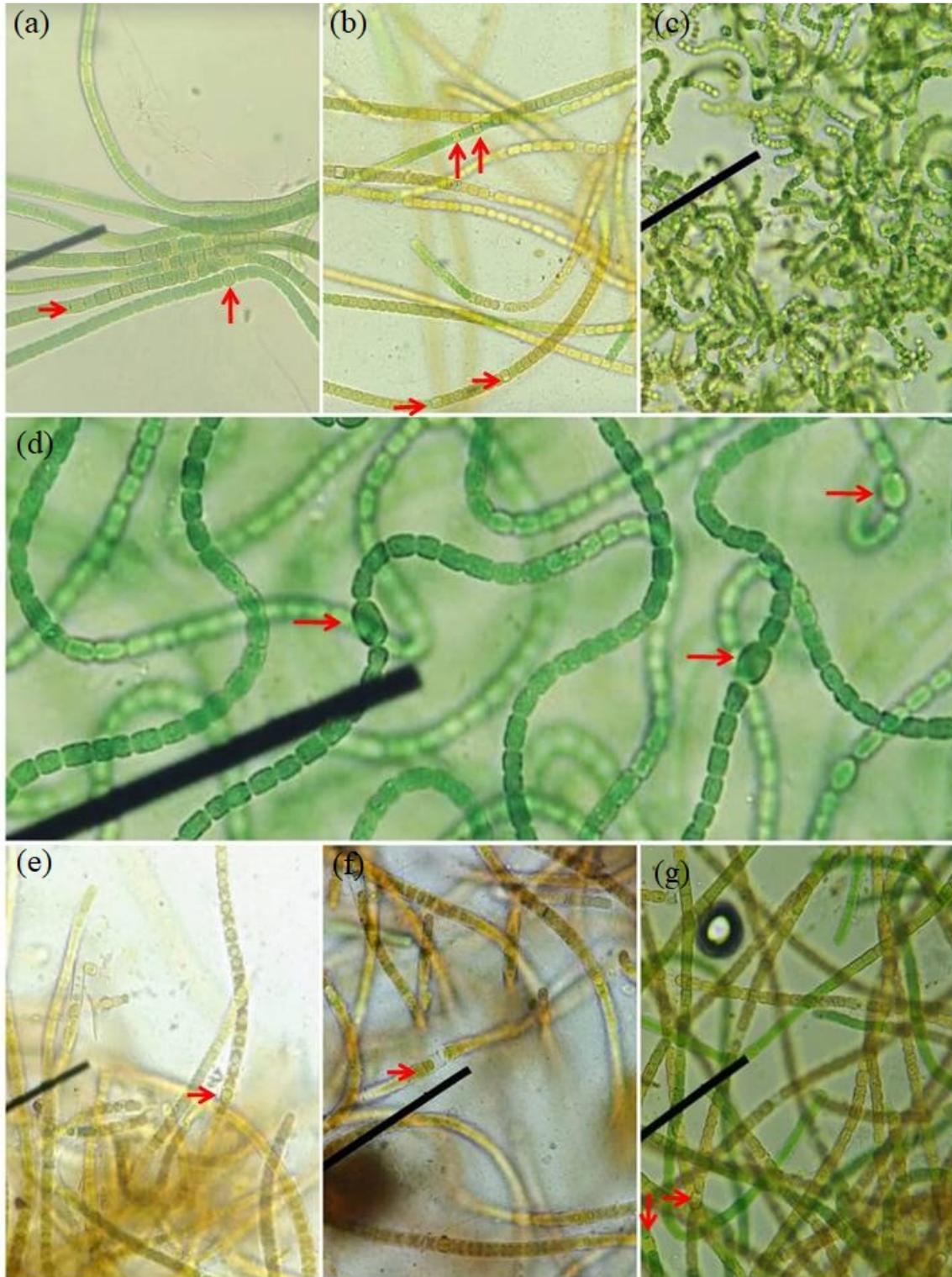
Através do processo de isolamento de cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* foram obtidas 13 linhagens morfológicamente distintas, ainda em processo de isolamento, nos diferentes tratamentos; Com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) e sol pleno (CN/SP); sem adição de nutrientes e sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS). Foram seis linhagens homocitadas, uma do tratamento (SN/SP), quatro do tratamento (CN/SP), e uma do tratamento (CN/CS) (FIGURA 4), e sete heterocitadas, todas do tratamento (SN/SP) (FIGURA 4 e 5).

**Figura 4** – Filamentos homocitados de cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* em processo de isolamento. (a) Linhagem do tratamento (CN/SP); (b) Linhagem do tratamento (SN/SP); (c) Linhagem do tratamento (CN/SP); (d) Linhagem do tratamento (CN/SP); (e) Linhagem do tratamento (CN/CS); (f) Linhagem do tratamento (CN/SP).



**Fonte:** Do Autor (2020)

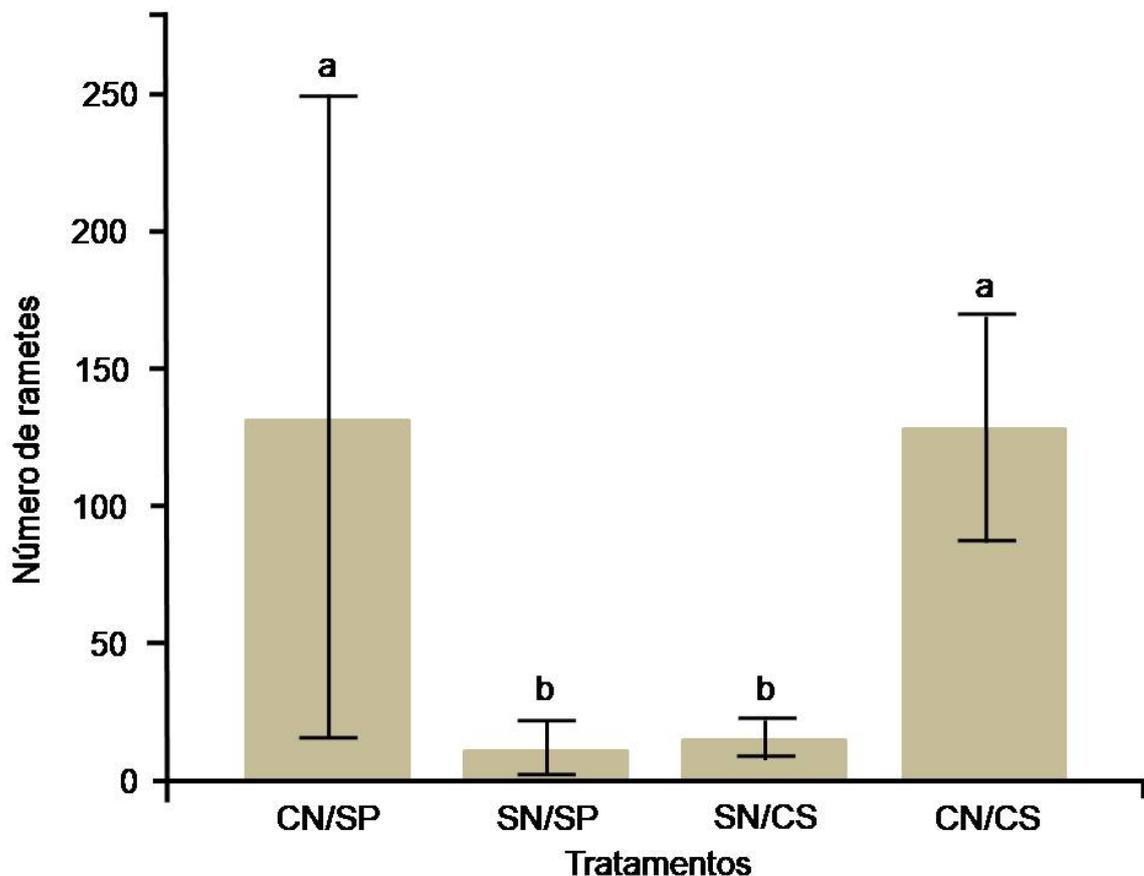
**Figura 5** – Filamentos heterocitados de cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* em processo de isolamento. (a); (b); (c); (d); (e); (f) e (g) Diferentes linhagens cultivadas do tratamento sem adição de nutrientes e sol pleno. As setas vermelhas indicam os heterócitos.



Fonte: Do Autor (2020)

Quanto ao crescimento clonal de *S. auriculata*, os tratamentos tiveram efeito sobre o aumento no número de rametes (KW=11, 598;  $p= 0,009$ ). (FIGURA 6) Houve um grande aumento na produção de rametes nos tratamentos com adição de nutrientes. No tratamento (CN/SP) foram produzidos 531 rametes e no tratamento (CN/CS) foi produzido um total de 516 rametes, enquanto que nos tratamentos sem adição nutrientes (SN/SP) e (SN/CS) foram produzidos 47 e 64 rametes, respectivamente. Ao comparar a diferença entre tratamentos, o número de rametes diferiu entre os tratamentos com adição de nutrientes e sem adição de nutrientes (CN/CS; CN/SP) x (SN/SP; SNCS).

**Figura 6** – Número de rametes produzidos em cada tratamento; Com adição de nutrientes (Solução de Hoagland força 50%) e sol pleno (CN/SP); sem adição de nutrientes e sol pleno (SN/SP); sem adição de nutrientes e com sombreamento 70% (SN/CS) e com adição de nutrientes e com sombreamento 70% (CN/CS). Os valores de média dos tratamentos (CN/SP), (SN/SP), (SN/CS) e (CN/CS) foram 12,00; 3,75; 5,25 e 13,00 respectivamente.



Fonte: Do Autor (2020)

#### 4 DISCUSSÃO

A produção de heterócitos pelas cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* foi observada em maior quantidade nos tratamentos sem adição de nutrientes, e ainda em maior número, no sol pleno. A composição da solução de Hoagland ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , solução de micronutrientes, e  $\text{FeEDTA}$ ) fornece fontes combinadas de nitrogênio, o que deve ter inibido a produção de heterócitos pelas cianobactérias nos tratamentos com a adição da solução nutritiva. A diferenciação dos heterócitos é inibida pela presença de uma fonte utilizável de nitrogênio, como  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$  mesmo em concentrações muito baixas em condições de cultivo isoladas em que fatores abióticos como luz e temperatura estão controlados (MEEKS et al., 1983, 2002). A produção de heterócitos é facilmente feita em cultivo utilizando um meio sem N (MEEKS et al., 1983, 2002). No entanto, há diferenciação de heterócitos em espécies de *Nostoc* dentro de cavidades simbióticas com mesmo na presença de concentrações de amônia (CANINI; CAIOLA, 1993; CANINI; CAIOLA; MASCINI, 1990; MEEKS et al., 1985, 1987, 2002; SILVESTER; PARSONS; WATT, 1996). Foram encontrados diversos genes necessários para que a privação de nitrogênio ocasione a diferenciação do heterócito. Um deles, o *hetR*, desempenha claramente um papel central na diferenciação dessa célula sem a presença do N. Mutantes com mutações no *hetR*, diferentemente daqueles com mutações no *ntcA*, são capazes de crescer mesmo com a privação de N, mas não diferenciam heterócito. Porém há linhagens em que o gene *hetR* do tipo selvagem está presente em um plasmídeo multicópico (MEEKS et al., 2002; LANG; HASELKORN, 1991) e diferenciam o heterócitos mesmo na presença de  $\text{NO}_3^-$  (BUIKEMA; HASELKORN, 1991; MEEKS et al., 2002).

Tanto a associação epifítica com a planta, que pode fornecer algum sinal químico, estar liberando ou retirando algum tipo de substância no local, quanto a presença de um gene que codifica para a produção de heterócito pode explicar a produção, mesmo que baixa, dessa célula nos tratamentos com adição de nutrientes. O maior número de heterócitos produzidos no tratamento SN/SP além do fato primordial, qual seja a escassez de nitrogênio favorecendo a produção da estrutura que irá fixá-lo, pode também ser explicado devido à quantidade da luz disponível que influencia nas taxas fotossintéticas e na eficiência energética. Isto poderia conferir uma vantagem, e ter favorecido a diferenciação de heterócitos em comparação com o tratamento SN/CS, tendo em vista que a produção de heterócitos e a fixação biológica de nitrogênio é um processo que demanda muita energia, pois são gastos cerca de 15 – 16

moléculas de ATP por molécula de N<sub>2</sub>fixada (RAYMOND et al., 2004; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011; THOMPSON; ZEHR, 2013).

Acinetos são células que se comportam como esporos, pois ficam dormentes e inativas. Geralmente se desenvolvem na fase estacionária em culturas de várias linhagens filamentosas da ordem Nostocales. Estruturas de dormência representam uma estratégia de sobrevivência em condições ambientais adversas, inclusive para plantas (ADAMS; CARR, 1981; ARGUETA; SUMMERS, 2005; COELHO; LOPES; SPERBER, 2005). A diferenciação e as alterações morfológicas durante a germinação têm sido investigadas em algumas espécies de cianobactérias em condições de isolamento (ADAMS; DUGGAN, 1999; KAPLAN-LEVY et al., 2010; MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014). No entanto, os processos de diferenciação e germinação ainda não estão claros nas associações cianobactérias – macrófita aquática em ambiente natural onde existem fatores bióticos como a competição interespecífica e troca de compostos químicos entre a planta hospedeira e o microbionte (CARRAPIÇO, 2017; PEREIRA; CARRAPIÇO, 2007). Além disso, a própria macrófita pode aumentar significativamente o sombreamento na coluna d'água, diminuindo a fotossíntese e assim a concentração de oxigênio dissolvido (FLEMING; DIBBLE, 2015), podendo interferir na produção de acinetos, e de outras estruturas adaptativas.

Nossos resultados mostraram uma maior quantidade de acinetos nos tratamentos sem adição de nutrientes, e o número foi ainda maior no tratamento com sombra (SN/CS), ou seja, para as cianobactérias epifíticas às raízes de *S.auriculata*, este foi o tratamento mais estressante. Vários fatores ambientais foram apontados como gatilhos para a diferenciação de acinetos em diferentes espécies de Nostocales (MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014). A quantidade de luz (alta ou baixa) interferiu na produção dessas células (KAPLAN-LEVY et al., 2010; SUKENIK; BEARDALL; HADAS, 2007) bem como a quantidade de nutrientes, como fosfato ou razão carbono / nitrogênio (C: N), também foram relatados (MEEKS et al., 2002). A limitação por fosfato induziu a formação de acinetos (MEEKS et al., 2002), mas em alguns casos o fosfato foi essencial para o seu desenvolvimento (FAY, 1988; MOORE; MCGREGOR; SHAW, 2004). Foi observado em *Aphanizomenon ovalisporum*, que a privação de íons potássio desencadeou a formação de acinetos (SUKENIK et al., 2013). Como a solução de Hoagland possui em sua composição compostos nitrogenados, fosfatados e potássicos, isso pode ter interferido na produção de acinetos. Os estímulos ambientais relatados que desencadeiam a formação de acinetos em diferentes espécies de cianobactérias estão ligados à limitação de energia para o metabolismo celular, e com o término da fase de crescimento exponencial (ADAMS; DUGGAN 1999; AGRAWAL,

2012; CMIECH; REYNOLDS; LEEDALE, 1984; KOMARZEWSKA; GLOGOWSKA; 2005). Os fatores externos, como luz, temperatura ou nutrientes, são gatilhos de diferenciação apenas para as células que estão em uma determinada fase do ciclo celular. Sendo assim, conhecer o momento do ciclo em que a célula está é determinante para saber se os fatores externos induzirão à diferenciação do acineto ou continuarão o processo natural de divisão das células vegetativas (MALDENER; SUMMERS; SUKENIK, 2014).

Tendo em vista que os tratamentos mais estressantes para as cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* foram os sem adição de nutrientes, e nestes houve uma maior produção de acinetos, os quais sintetizam e liberam um inibidor da diferenciação de hormogônios (HERDMAN; RIPPKA, 1988), os tratamentos com adição de nutrientes em que houve uma baixa produção de acinetos propiciaram a formação de hormogônios. Outro fator que deve ser levado em consideração é que em associações simbióticas, mesmo que estas associações não sejam endofíticas, a planta hospedeira pode liberar sinais químicos que estimulam a formação de hormogônios (ADAMS; DUGGAN, 2008; MEEKS; ELHAI, 2002). Além disso, muitas linhagens de cianobactérias possuem o hormogônio com fototaxia positiva (MEEKS; ELHAI, 2002; LAZAROFF, 1973), o que lhes conferem certa vantagem, pois como são autotróficas, podem dispersar para ambientes iluminados. As cianobactérias epifíticas às raízes de *S. auriculata* submetidas ao tratamento com adição de nutrientes e com sombra (70%) produziram mais hormogônios. A sombra de 70% mais o sombreamento natural causado pela macrófita que nos tratamentos com a adição de nutrientes teve um aumento numérico de rametes muito maior que nos tratamentos sem adição de nutrientes tomando conta de toda bandeja rapidamente, pode ter sido um gatilho para a produção desses fragmentos móveis na busca pela luz.

Diferentemente dos heterócitos, em que a sua diferenciação é facilmente feita em cultivo limitando o nitrogênio no meio, ainda não foi identificado um único fator ambiental que induza a produção de hormogônios. O que se sabe é que no início da diferenciação de hormogônio, a mudança de algum fator ambiental: o aumento ou diminuição de um nutriente ou uma alteração na quantidade ou qualidade da luz estimula a produção (MEEKS; ELHAI, 2002). Em laboratório a indução é feita transferindo a linhagem vinda de uma cultura densa, próxima à fase de crescimento estacionária, para um novo meio (RIPPKA et al., 1979), o que permite diversas mudanças como quantidade de nutrientes disponíveis, qualidade e quantidade de luz, além da diminuição de substâncias endógenas inibidoras de hormogônio (GANTAR; KERBY; ROWELL, 1993; HERDMAN et al., 1979; MEEKS; ELHAI, 2002). Nos tratamentos em que havia adição de nutrientes, houve predominância de linhagens

homocitadase é justamente nessas, que são mais visíveis os hormogônios e também nestes houve uma menor formação de acinetos então a produção de hormogônios pode ter sido favorecida pela menor síntese e liberação de inibidor de diferenciação de hormogônio (HERDMAN; RIPPKA,1988).

A planta aquática *S.auriculata*, que possui cianobactérias epifíticas,apresenta estratégias reprodutivas mistas, ou seja, pode se reproduzir tanto assexuadamente, formando clones, como sexuadamente (COELHO;LOPES; SPERBER,2005; MEDEIROS et al., 2017). A reprodução assexuada, nesta planta também chamado de crescimento clonal,ocorre pela formação de rametes. Os resultados mostraram que o aumento numérico em rametes ocorreu mais vigorosamente nos tratamentos com adição de nutrientes. No curto período de 28 dias,ocorreu uma grande produção de novos rametes comprovando seu potencial de expansão(TIPPING et al., 2008). Nos tratamentos sem adição de nutrientes ocorreu produção de brotos formando novos rametes, entretanto sua produção foi menor. Esta macrófita é bem conhecida por seu crescimento vigoroso (JAMPEETONG; BRIX, 2009; JULIEN; CENTER; TIPPING, 2002; MEDEIROS et al., 2017). Além disso,o sombreamento não afetou o crescimento clonal de *S. auriculata* uma vez que tanto nos tratamentos com sombra quanto no sol pleno houve aumento exponencial do número de rametes o que está de acordo com o estudo de Medeiros et al., (2017) em que o vigor como macrófita flutuante pode ser afetado mas não o seu crescimento. Assim, tanto para o crescimento das cepas de cianobactérias, quanto para o aumento numérico de rametes da samambaia aquática *S. auriculata*, o fator mais importante foi a adição de nutrientes simulando um meio eutrofizado.

## 5 CONCLUSÕES

Com este trabalho obtivemos os primeiros dados sobre a produção de estruturas adaptativas por linhagens de cianobactérias epifíticas às raízes da macrófita *S. auriculata* e, obtivemos como conclusão que os fatores nutrientes e luz afetam a diferenciação de heterócitos, acinetos, e hormogônios. A não adição de nutrientes estimula a produção de heterócitos. Assim, podemos inferir que em ambientes aquáticos oligotróficos as cianobactérias epifíticas às raízes de macrófitas aquáticas podem fornecer um aporte de nitrogênio fixado para o ecossistema aquático. Os acinetos como esperado, foram produzidos em condições simuladas de estresse, na ausência de nutrientes. A presença da macrófita aquática intensificou o sombreamento e, quando havia nutrientes disponíveis, estimulou a produção de hormogônios, os quais podem ter fototaxia positiva. Além disso, o processo de isolamento das cianobactérias epifíticas às raízes de *S.auriculata* resultou na obtenção de 13 linhagens morfológicamente distintas de cianobactérias e nos possibilitará futuras análises para compreender melhor as potencialidades destas linhagens, como a fixação biológica de nitrogênio e como as mesmas podem interferir no crescimento de macrófitas aquáticas devido ao aporte de nitrogênio fixado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. G.; CARR, N. G.; WILCOX, M. The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 45-100, 1981.
- ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Cyanobacteria–bryophyte symbioses. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1047-1058, 2008.
- ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. **New Phytologist**, v. 144, n. 1, p. 3–33, 2003.
- ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. **The New Phytologist**, v. 144, n. 1, p. 3-33, 1999.
- AGRAWAL, S. C. Factors controlling induction of reproduction in algae—review: the text. **Folia microbiologica**, v. 57, n. 5, p. 387-407, 2012.
- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates 1, 2. **Journal of phycology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1968.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 145-180, 2000.
- ARGUETA, C.; SUMMERS, M. L. Characterization of a model system for the study of *Nostoc punctiforme* akinetes. **Archives of microbiology**, v. 183, n. 5, p. 338-346, 2005.
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. **Ecologia Microbiana. EMBRAPA CNPMA, Jaguariúna**, 1998.
- BERGMAN, B.; GALLON, J. R.; RAI, A. N.; STAL, L. J. N<sub>2</sub> fixation by non—heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 19, p. 139-185, 1997.
- BERGMAN, B.; RAI, A. N.; RASMUSSEN, U. Cyanobacterial associations. In: **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 257-301.
- BIANCHINI JR, I. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas, p. 85-126. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas, UEM, Maringá**, 2003.
- BRUM, P. R.; ESTEVES, F. A. Dry weight loss and chemical changes in the detritus of three tropical aquatic macrophyte species (*Eleocharis interstincta*, *Nymphaea ampla* and *Potamogeton stenostachys*) during decomposition. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2001.
- BUIKEMA, W. J.; HASELKORN, R. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. **Genes & development**, v. 5, n. 2, p. 321-330, 1991.

CAMARGO, V. M.; FERRAGUT, C. Estrutura da comunidade de algas perifíticas em *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult (Cyperaceae) em reservatório tropical raso, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 31-40, 2014.

CANINI, A.; CAIOLA, M. G. Characterization of gonidial zone of *Cycas revoluta* coralloid roots by means of microelectrodes. **FEMS microbiology letters**, v. 109, n. 1, p. 75-79, 1993.

CANINI, A.; CAIOLA, M. G.; MASCINI, M. Ammonium content, nitrogenase activity and heterocyst frequency within the leaf cavities of *Azolla filiculoides* Lam. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, n. 1-2, p. 205-210, 1990.

CARPENTER, E. J.; CAPONE, D. G. Nitrogen fixation in *Trichodesmium* blooms. In: Marine pelagic cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs. Springer, Dordrecht, 1992. p. 211-217.

CARRAPIÇO, F. The *Azolla*–*Anabaena*–Bacteria association: A case of symbiotic abduction? In: **Algal and cyanobacteria symbioses**. 2017. p. 329-345.

CMIECH, H. A.; REYNOLDS, C. S.; LEEDALE, G. F. Seasonal periodicity, heterocyst differentiation and sporulation of planktonic Cyanophyceae in a shallow lake, with special reference to *Anabaena solitaria*. **British Phycological Journal**, v. 19, n. 3, p. 245-257, 1984.

COELHO, F. F.; LOPES, F. S.; SPERBER, C. F. Density-dependent morphological plasticity in *Salvinia auriculata* Aublet. **Aquatic Botany**, v. 66, n. 4, p. 273-280, 2000.

COELHO, F. F.; LOPES, F.; SPERBER, C. F. Persistence strategy of *Salvinia auriculata* Aublet in temporary ponds of Southern Pantanal, Brazil. **Aquatic Botany**, v. 81, n. 4, p. 343-352, 2005.

DE VRIES, S.; DE VRIES, J. *Azolla*: A Model System for Symbiotic Nitrogen Fixation and Evolutionary Developmental Biology. In: **Current Advances in Fern Research**. Springer, Cham, 2018. p. 21-46.

DIEZ, B.; ININBERGS, K. Ecological importance of cyanobacteria. **Cyanobacteria**, v. 106, p. 41-63, 2014.

DUGGAN, P. S.; GOTTARDELLO, P.; ADAMS, D. G. Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 12, p. 4547-4551, 2007.

ELBERT, W.; WEBER, B.; BURROWS, S.; STEINKAMP, J.; BÜDEL, B.; ANDREAE, M. O.; PÖSCHL, U. Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. **Nature Geoscience**, v. 5, n. 7, p. 459, 2012.

ESTEVEZ, F. D. A. Fundamentos de Limnologia. 3ª edição. **Interciência**, Rio de Janeiro, 2011.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 1-42, 1992.

FAY, P. Viability of akinetes of the planktonic cyanobacterium *Anabaenacircinalis*. **Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences**, v. 234, n. 1276, p. 283-301, 1988.

FLEMING, J. P.; DIBBLE, E. D. Ecological mechanisms of invasion success in aquatic macrophytes. *Hydrobiologia*, v. 746, n. 1, p. 23-37, 2015.

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; VITOUSEK, P. The global nitrogen cycle in the Twentyfirst century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, 2013.

GANTAR, M.; KERBY, N. W.; ROWELL, P. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria: III. The role of a hormogonia-promoting factor. **New phytologist**, v. 124, n. 3, p. 505-513, 1993.

GOLDSBOROUGH, L.G.; MCDUGAL, R.L.; NORTH, A.K. Periphyton structure, diversity and colonization. *In*: M.E. Azim, M.C.M. Beveridge, A.A. Van Dam, & M.C.J. Verdegem, (eds.), **Periphyton: Ecology, exploitation and management**. CABI Publishing, Cambridge, 2005. p. 71-83.

GONZALEZ, A.; RILEY, K. W.; HARWOOD, T. V.; ZUNIGA, E. G.; RISSER, D. D.A Tripartite, Hierarchical Sigma Factor Cascade Promotes Hormogonium Development in the Filamentous Cyanobacterium *Nostocpunctiforme*. **mSphere**, v. 4, n. 3, p. e00231-19, 2019.

GRIFFITHS, M. S. H.; GALLON, J. R.; CHAPLIN, A. E. The diurnal pattern of dinitrogen fixation by cyanobacteria in situ. **New phytologist**, v. 107, n. 4, p. 649-657, 1987.

HERDMAN, M.; JANVIER, M.; RIPPKA, R.; STANIER, R. Y. Genome size of cyanobacteria. **microbiology**, v. 111, n. 1, p. 73-85, 1979.

HERDMAN, M.; RIPPKA, R. [22] Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes. *In*: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1988. p. 232-242.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014.

HOICZYK, E.; BAUMEISTER, W. The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. **Current Biology**, v. 8, n. 21, p. 1161-1168, 1998.

HUANG, T. C; CHOW, T. J. Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice fields. **Microbiology**, v. 134, n. 12, p. 3089-3097, 1988.

JAMPEETONG, A.; BRIX, H. Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effects of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate. **Aquatic botany**, v. 90, n. 1, p. 67-73, 2009.

JULIEN, M. H.; CENTER, T. D.; TIPPING, P. W. Floating fern (salvinia). **Biological control of invasive plants in the Eastern United States**, p. 17-32, 2002.

JULIEN, M. H.; HILL, M. P.; TIPPING, P. W. *Salvinia molesta* DS Mitchell (Salviniaceae). Weed biological control with arthropods in the tropics. Cambridge University Press, Cambridge, 2009. p. 378-407.

KAPLAN-LEVY, R. N.; HADAS, O.; SUMMERS, M. L.; RÜCKER, J.; SUKENIK, A. Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. In: **Dormancy and resistance in harsh environments**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 5-27.

KHAYATAN, B.; MEEKS, J. C.; RISSER, D. D. Evidence that a modified type IV pilus-like system powers gliding motility and polysaccharide secretion in filamentous cyanobacteria. **Molecular microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1021-1036, 2015.

KLUGE, M.; MOLLENHAUER, D.; WOLF, E.; SCHÜBLER, A. The *Nostoc-Geosiphonendocytobiosis*. In: **Cyanobacteria in Symbiosis**. Springer, Dordrecht, p. 19-30, 2002.

KOLLAH, B.; PATRA, A.; MOHANTY, S. Aquatic microphylla *Azolla*: a perspective paradigm for sustainable agriculture, environment and global climate change. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4358-4369, 2016.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295-335, 2014.

KOMARZEWSKA, K.; GLOGOWSKA, B. Blooming of *Aphanizomenonflos-aquae* in the urban pond. **Oceanological and Hydrobiological Studies**, v. 34, n. Suppl. 3, 2005.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A.; GOLDEN, J. W. Cyanobacterial heterocysts. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 4, p. a000315, 2010.

LANG, JEAN D.; HASELKORN, R. A vector for analysis of promoters in the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 8, p. 2729-2731, 1991.

LAZAROFF, N. Photomorphogenesis and nostocacean development. **Botanical monographs**, 1973.

MALDENER, I.; SUMMERS, M. L.; SUKENIK, A. Cellular differentiation in filamentous cyanobacteria. **The Cell Biology of Cyanobacteria**, v. 15, p. 263-291, 2014.

MAZHAR, S.; COHEN, J. D.; HASNAIN, S. Novel Approach for the Determination of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 41, n. 1, p. 105-105, 2019.

MEDEIROS, J. C. C.; SILVA, J. C. F.; RESENDE, T. D. S. C.; TEODORO, G. S.; PEREIRA, F. J.; COELHO, F.F. Ramet versus sporocarp production in the aquatic fern *Salvinia auriculata* (Salviniaceae): the role of shading. **Australian journal of botany**, v. 66, n. 7, p. 583-588, 2019.

MEDEIROS, J. C. C.; SILVA, J. C. F.; TEODORO, G. S.; COELHO, F.F. Effects of shade on individual ramet growth and on clonal growth of the aquatic fern *Salvinia auriculata* (Salviniaceae). **American fern journal**, v. 107, n. 1, p. 21-30, 2017.

MEEKS, J. C. Molecular mechanisms in the nitrogen-fixing *Nostoc-bryophyte* symbiosis. In: **Molecular Basis of Symbiosis**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 165-196, 2005.

MEEKS, J. C. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. **BioScience**, v. 48, n. 4, p. 266-276, 1998.

MEEKS, J. C.; CAMPBELL, E. L.; SUMMERS, M. L.; WONG, F. C. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostocpunctiforme*. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 6, p. 395-403, 2002.

MEEKS, J. C.; ELHAI, J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. **Microbiol.Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 94-121, 2002.

MEEKS, J. C.; ENDERLIN, C. S.; JOSEPH, C. M.; CHAPMAN, J. S.; LOLLAR, M. W. L. Fixation of [<sup>13</sup>N] N<sub>2</sub> and transfer of fixed nitrogen in the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association. **Planta**, v. 164, n. 3, p. 406-414, 1985.

MEEKS, J. C.; STEINBERG, N. A.; ENDERLIN, C. S.; JOSEPH, C. M.; PETERS, G. A. *Azolla-Anabaena* relationship: XIII. Fixation of [<sup>13</sup>N] N<sub>2</sub>. **Plant physiology**, v. 84, n. 3, p. 883-886, 1987.

MEEKS, J. C.; WYCOFF, K. L.; CHAPMAN, J. S.; ENDERLIN, C. S. Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1351-1359, 1983.

MIRANDA, C. V.; SCHWARTSBURD, P. B. *Salvinia* (Salviniaceae) in southern and southeastern Brazil—including new taxa, new distribution records, and new morphological characters. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 171-188, 2019.

MOORE, D.; MCGREGOR, G. B.; SHAW, G. Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (nostocales, cyanobacteria) 1. **Journal of phycology**, v. 40, n. 6, p. 1098-1105, 2004.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D.S.; ANTUNES, F. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 727-732, 2005.

PEREIRA, A. L.; CARRAPIÇO, F. Histochemistry of simple hairs from the foliar cavities of *Azolla filiculoides*. **Plant Biosystems**, v. 141, n. 3, p. 323-328, 2007.

PEREZ, R.; FORCHHAMMER, K.; SALERNO, G.; MALDENER, I. Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two Nostocales living in different habitats. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 214-223, 2016.

- PETER WOLK, C. Heterocyst formation. **Annual review of genetics**, v. 30, n. 1, p. 59-78, 1996.
- POSTIUS, C.; NEUSCHAEFER-RUBE, O.; HAID, V.; BÖGER, P. N<sub>2</sub>-fixation and complementary chromatic adaptation in non-heterocystous cyanobacteria from Lake Constance. **FEMS microbiology ecology**, v. 37, n. 2, p. 117-125, 2001.
- RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541–554, 2004.
- REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 489–512, 2011.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.
- RIPPKA, R.; WATERBURY, J. B. The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 2, n. 2, p. 83-86, 1977.
- ROOM, P. M. 'Falling apart' as a lifestyle: the rhizome architecture and population growth of *Salvinia molesta*. **The Journal of Ecology**, p. 349-365, 1983.
- SCHLICHTING, C.D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 17, n. 1, p. 667-693, 1986.
- SCULTHORPE, C. D. Biology of aquatic vascular plants. 1967.
- SILVESTER, W. B.; PARSONS, R.; WATT, P. W. Direct measurement of release and assimilation of ammonia in the *Gunnera–Nostoc* symbiosis. **New Phytologist**, v. 132, n. 4, p. 617-625, 1996.
- SPRENT, J. I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. **Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects**, 1990.
- SROGA, G.E. Regulation of nitrogen fixation by different nitrogen sources in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Microcoleus sp.* **FEMS microbiology letters**, v. 153, n. 1, p. 11-15, 1997.
- SUÑE, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M. A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental pollution**, v. 145, n. 2, p. 467-473, 2007.
- SUKENIK, A.; BEARDALL, J.; HADAS, O. Photosynthetic characterization of developing and mature akinetes of *Aphanizomenonovalisporum* (Cyanoprokaryota) 1. **Journal of phycology**, v. 43, n. 4, p. 780-788, 2007.
- SUKENIK, A.; KAPLAN-LEVY, R. N.; VINER-MOZZINI, Y.; QUESADA, A.; HADAS, O. Potassium deficiency triggers the development of dormant cells (akinetes) in

*Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanoprokaryota). **Journal of phycology**, v. 49, n. 3, p. 580-587, 2013.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 10, n. 1-2, p. 119-189, 1993.

THAMDRUP, B. New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 407–428, 2012.

THOMPSON, A. W.; ZEHR, J. P. Cellular interactions: Lessons from the nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 6, p. 1024–1035, 2013.

TIPPING, P. W.; MARTIN, M. R.; CENTER, T. D.; DAVERN, T. M. Suppression of *Salvinia molesta* Mitchell in Texas and Louisiana by *Cyrtobagoussalviniae* Calder and Sands. **Aquatic botany**, v. 88, n. 3, p. 196-202, 2008.

WEISSHAAR, H.; BÖGER, P. Nitrogenase activity of the non-heterocystous cyanobacterium *Phormidiumfoveolarum*. **Archives of microbiology**, v. 136, n. 4, p. 270-274, 1983.

WOLK, C. P. Control of sporulation in a blue-green alga. **Developmental biology**, v. 12, n. 1, p. 15-35, 1965.

WOLK, C. P.; ERNST, A.; ELHAI, J. Heterocyst metabolism and development. In: **The molecular biology of cyanobacteria**. Springer, Dordrecht, 1994.p. 769-823.

ZHENG, M.; ZHOU, Z.; LUO, Y.; ZHAO, P.; MO, J. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. **Global Change Biology**, n. February, p. 1–13, 2019.