



MICHEL BIONDI

**ADAPTAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS E SEUS EFEITOS NAS
ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE *PISTIA STRATIOTES***

**LAVRAS – MG
2021**

MICHEL BIONDI

**ADAPTAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS E SEUS EFEITOS NAS
ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE *PISTIA STRATIOTES***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Estrutural, para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Flávia de Freitas Coelho

Orientadora

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Coorientador

LAVRAS-MG

2021

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

Biondi, Michel.

Adaptações de cianobactérias filamentosas e seus efeitos nas estratégias reprodutivas de *Pistia stratiotes* / Michel Biondi. - 2021.

70 p. : il.

Orientador(a): Flávia de Freitas Coelho.

Coorientador(a): Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Botânica. 2. Cianobactérias. 3. Macrófitas. I. Coelho, Flávia de Freitas. II. Vaz, Marcelo Gomes Marçal Vieira. III. Título.

MICHEL BIONDI

**ADAPTAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS E SEUS EFEITOS NAS
ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE *PISTIA STRATIOTES***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Estrutural, para a obtenção do título de Doutor.

_____ em 26 de abril de 2021

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz	UFV
Dr. Antônio Galvão Nascimento	UFV
Dra. Kelly Cristina Reis	UFC
Dr. Guilherme Demétrio Ramos Ferreira	UFAL

Dra. Flávia de Freitas Coelho
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Shirley e Enerbino, que mesmo sem entender minha decisão de buscar conhecimento longe de casa me apoiaram,

Agradeço também minha irmã que sempre me lembra o quanto que o tempo pode ser maravilhoso em curar sentimentos, a cada dia nosso respeito e amor cresce,

Agradeço aos governos que propiciaram a entrada de várias pessoas que por muito tempo nunca tiveram, nem sequer a esperança de ingressar no ensino superior público,

Agradeço a cada pessoa que encontrei em Lavras, desde os camaradas de república, até os funcionários da universidade, sejam eles professores, técnicos ou o pessoal fundamental da limpeza,

Agradeço aos professores de diversos setores, por inspirarem e serem exemplo,

Agradeço, entre outros amigos queridos, Cauê, Iago, William e Daniel, que tornaram mais leves os dias mais pesados, nada como dividir pimenta, farofa e paçoca com essa rapaziada!

Agradeço aos amigos de laboratório, Ana, Gustavo, Larissa, Luis, Grécia, Tiago, Lara e Gabi, foram vários os momentos de aprendizado, de conversas sérias e de risadas,

Agradeço a professora Flávia pela orientação, pelas conversas, pelo apoio, pelo suporte acadêmico e pessoal,

Agradeço a Tina e Zapata, dois companheiros fiéis, brincalhões, encenqueiros, que estão juntos comigo desde o início de minha caminhada acadêmica,

Agradeço especialmente minha companheira Carol, com quem aprendo a cada dia ser uma pessoa melhor, mais empática, mais tolerante, graças a você meu amor, sou uma pessoa bem melhor do que a dez anos,

Por fim, agradeço também as fundações de amparo a pesquisa, FAPEMIG e CAPES, pelas bolsas de mestrado e doutorado respectivamente.

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

Com origem estimada em 3,5 bilhões de anos, as cianobactérias atuam, desde então, na modificação da atmosfera terrestre e se associando a diversos organismos. São fundamentais em diversos ecossistemas participando como produtoras primárias e tendo papel importante em ciclos biogeoquímicos, além de compor redes complexas de associações bióticas. Dentre os serviços ecossistêmicos, cabe ressaltar a alta taxa de produção de oxigênio através da fotossíntese, principalmente em ambientes marinhos, o sequestro de carbono atmosférico, também relacionado com a fotossíntese, mas também a fixação biológica de nitrogênio, que por sua vez é responsável por disponibilizar o nitrogênio atmosférico para que entre outras funções, aconteça a fotossíntese e o sequestro de carbono. Das muitas associações bióticas com cianobactérias, destacamos as que ocorrem com seres fotossintetizantes, nestes casos, o benefício principal aos “hospedeiros” são os compostos nitrogenados disponibilizados pelas cianobactérias associadas. Cianobactérias do gênero *Nostoc* se associam a musgos, gimnospermas (*Cycas*) e angiospermas (*Gunneraceae*) de forma endofítica. No entanto existem também associações epifíticas e perifíticas, como com a macrófita *Pistia stratiotes* que possui características que lhe garantem vantagens adaptativas ocasionando em sua distribuição cosmopolita. O sistema radicular desta macrófita flutuante chama a atenção, por possuírem muitas raízes secundárias que possibilitam interações com microrganismos. Com base nestas premissas propusemo-nos estudar a relação entre as cianobactérias filamentosas e *P. stratiotes*. Avaliamos, assim, as estratégias adaptativas das cianobactérias filamentosas e a alocação vegetativa e reprodutiva nessa macrófita dependentes do aporte de nutrientes (carbono e nitrogênio) e da disponibilidade de luz. Vimos que a depender do aporte nutricional, tanto as cianobactérias, quanto a macrófita mostraram plasticidade no comportamento. Com o aporte de nitrogênio, encontramos uma alta produção de necrídeos nas cianobactérias, e um investimento maior no crescimento vegetativo da macrófita. Já, com o aporte de carbono, as cianobactérias modificaram células em heterócitos e as macrófitas investiram em reprodução sexuada. Concluímos, então, que, em caso de excesso de nutrientes haverá modificações celulares nas cianobactérias que propiciarão a manutenção da comunidade associada epifiticamente à macrófita, e com alternância na dominância de determinadas linhagens.

Palavras-chave: Cianobactérias Filamentosas, FBN, Associações Biológicas, Macrófitas, Nitrogênio, Carbono, Heterócitos, Hormogônios, Necrídeos.

GENERAL ABSTRACT

With an estimated origin of 3.5 billion years, cyanobacteria have acted, since then, in the modification of the terrestrial atmosphere and in association with several organisms. They are fundamental in several ecosystems, participating as primary producers and playing an important role in biogeochemical cycles, in addition to forming complex networks of biotic associations. Among ecosystem services, it is worth mentioning the high rate of oxygen production through photosynthesis, especially in marine environments, the sequestration of atmospheric carbon, also related to photosynthesis, but also the biological nitrogen fixation, which in turn is responsible for making atmospheric nitrogen available so that, among other functions, photosynthesis and carbon sequestration take place. Of the many biotic associations with cyanobacteria, we highlight those that occur with photosynthetic beings, in these cases, the main benefit to the "hosts" is the nitrogen compounds made available by the associated cyanobacteria. Cyanobacteria of the genus *Nostoc* are associated with mosses, gymnosperms (*Cycas*) and angiosperms (*Gunneraceae*) in an endophytic manner. However, there are also epiphytic and peripheral associations, as with the macrophyte *Pistia stratiotes*, which has characteristics that guarantee adaptive advantages resulting in its cosmopolitan distribution. The root system of this floating macrophyte is noteworthy, as it has many secondary roots that enable interactions with microorganisms. Based on these premises, we set out to study the relationship between filamentous cyanobacteria and *P. stratiotes*. Thus, we evaluated the adaptive strategies of filamentous cyanobacteria and the vegetative and reproductive allocation in this macrophyte depending on the supply of nutrients (carbon and nitrogen) and the availability of light. We saw that depending on the nutritional supply, both the cyanobacteria and the macrophyte showed plasticity in behavior. With the nitrogen supply, we found a high production of necrids in cyanobacteria, and a greater investment in the vegetative growth of the macrophyte. With the contribution of carbon, cyanobacteria modified cells into heterocytes and macrophytes invested in sexual reproduction. We conclude, then, that in case of excess of nutrients there will be cellular changes in the cyanobacteria that will provide the maintenance of the community epiphytically associated with the macrophyte, and with alternation in the dominance of certain strains.

Keywords: Filamentous Cyanobacteria, BNF, Biological Associations, Macrophytes, Nitrogen, Carbon, Heterocytes, Hormogones, Necrids.

Sumário

PRIMEIRA PARTE.....	8
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REFERÊNCIAS.....	15
SEGUNDA PARTE.....	19
ARTIGO 1 - Adaptações morfológicas em cianobactérias filamentosas associadas às raízes de <i>Pistia stratiotes</i> L. (Araceae): o efeito de nutrientes e luz.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
DESENVOLVIMENTO.....	23
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	39
ARTIGO 2 - Vegetative and reproductive allocation in an aquatic macrophyte: the effects of light, nutrients and epiphytic heterocytous cyanobacteria.....	45
INTRODUCTION.....	49
DEVELOPMENT.....	50
REFERENCE LIST.....	62

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

A evolução da vida em nosso planeta se dá através de processos biológicos de adaptação a diversos fatores, tanto abióticos, quanto bióticos (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019). Essa história, improvável de superação, teve início ainda com a Terra em formação, durante o resfriamento dela no Hadeano (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019). Oparin e Haldane durante a década de 1920, teorizaram sobre a possibilidade de formação de moléculas orgânicas a partir de elementos inorgânicos que possivelmente estavam disponíveis na atmosfera de nosso planeta, ainda em seu primeiro bilhão de anos (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019). Alguns anos depois da teoria de Oparin e Haldane (1924 e 1929, respectivamente), Miller e Urey (1953), desenvolveram um experimento que simulou as condições da atmosfera primitiva de nosso planeta, e, utilizando substâncias inorgânicas somadas a descargas elétricas e altas temperaturas conseguiram observar a formação de moléculas orgânicas, mais precisamente aminoácidos, essenciais para o surgimento de formas de vida em nosso planeta (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019).

Esta teoria nos remete ao fim do Hadeano, nele a Terra passava por grandes instabilidades tectônicas e climáticas, com a atmosfera com grandes quantidades de metano, amônia, vapor de água e hidrogênio (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019). Com a condensação dos elementos atmosféricos e formação de poças nutritivas, somado ao tempo, as reações químicas levaram ao surgimento de alguns aminoácidos que propiciaram o início de uma ainda rudimentar biota terrestre (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DEMOULIN et al., 2019).

Durante o Arqueano, houve um maior resfriamento do planeta, o que gerou maior condensação dos gases atmosféricos, levando ao surgimento de oceanos rasos (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; KNOLL, 2008; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014, HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016, SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016, LÓPEZ-GARCÍA; EME; MOREIRA, 2017, DEMOULIN et al., 2019). Dentro destes proto oceanos começaram a surgir seres procariotos heterotróficos se aproveitando de todo o nutriente disponível nestes ambientes aquáticos. Foi durante o Arqueano que modificações levaram a uma linhagem de procariotos que deu início ao ato revolucionário de se nutrir a partir da luz advinda do sol, os procariotos autotróficos, parte destes novos seres fotossintetizantes originaram a linhagem das cianobactérias que passaram a realizar a fotossíntese oxigênica (GRAY, 1989; BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; KNOLL, 2008; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014; ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015 ; HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016, LÓPEZ-GARCÍA; EME; MOREIRA, 2017; PONCE-TOLEDO et al., 2017; DEMOULIN et al., 2019) A fotossíntese oxigênica possibilitou o aumento da disponibilidade de gás oxigênio na atmosfera, já que os organismos passaram a utilizar os íons de hidrogênio da água como doadores de elétrons, enquanto os organismos que realizavam a fotossíntese anoxigênica utilizavam os íons de hidrogênio do sulfeto de hidrogênio, liberando enxofre na atmosfera (GRAY, 1989; BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; KNOLL, 2008; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014; ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015 ; HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016, LÓPEZ-GARCÍA; EME; MOREIRA, 2017; PONCE-TOLEDO et al., 2017; DEMOULIN et al., 2019).

Ainda no Arqueano, alguns eventos importantes envolveram as cianobactérias. A teoria da endossimbiose as coloca como o organismo fagocitado que deu origem aos cloroplastos de eucariontes, os quais, antes, eram heterotróficos (GRAY, 1989, ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015 , PONCE-TOLEDO et al., 2017). Este evento possibilitou o surgimento, no Proterozoico, das linhagens das algas verdes, das algas glaucófitas e das algas vermelhas, e, por consequência evolutiva, as plantas embriófitas, bem mais tarde, ainda dentro do Proterozoico (GRAY, 1989; BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; KNOLL, 2008; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014; ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015 ; HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016, LÓPEZ-GARCÍA; EME; MOREIRA, 2017; PONCE-TOLEDO et al., 2017; DEMOULIN et al., 2019).

Já no Proterozoico, com a reprodução em massa das cianobactérias e de outros seres que realizavam a fotossíntese oxigênica houve uma expansão na disponibilidade de oxigênio, este evento é conhecido como grande evento de oxigenação (GRAY, 1989; BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003; KNOLL, 2008; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014; ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015 ; HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016, LÓPEZ-GARCÍA; EME; MOREIRA, 2017; PONCE-TOLEDO et al., 2017; DEMOULIN et al., 2019). Ele possibilitou o surgimento dos primeiros animais marinhos com maior complexidade e tamanho corpóreo (KIMURA; WATANABE, 2001; HOLLAND, 2006; ANBAR et al., 2007; BUTTERFIELD, 2007; PLANAVSKY et al., 2014; SCHIRRMEISTER; GUGGER; DONOGHUE, 2015; DICK; GRIM; KLATT, 2018; OSTRANDER et al., 2019).

Além das alterações causadas pelo aporte de oxigênio e participação nos processos iniciais da evolução das plantas, as cianobactérias se notabilizam por sua capacidade de associarem-se a organismos de diferentes linhagens (RAI et al., 2004, RAI, 2018). Durante o Fanerozoico, com o

continuo aumento da disponibilidade de oxigênio e da diversificação dos seres vivos, vários arranjos simbióticos foram se estabelecendo entre alguns desses seres e as cianobactérias, que podemos ver nos dias atuais (OHNO, 1997; WHITTON; POTTS, 2007; RAI et al., 2004; BUTTERFIELD, 2007; KNOLL, 2008; YOUNG, 2012; VALVERDE et al., 2015; ROUSK; SORENSEN; MICHELSEN, 2016; KNOLL; NOWAK, 2017, RAI, 2018)

Dentre as interações das cianobactérias destacam-se as do ambiente marinho, onde ocorre a maior taxa de produção de oxigênio (HÄDER; SCHÄFER, 1994). Nos oceanos, as cianobactérias são encontradas em associação com silicoflagelados, radiolários, algas verdes, líquens marinhos, poríferos, ascídias e anelídeos, por exemplo (RAI et al., 2004, RAI, 2018). Em ambiente terrestre, talvez a relação mutualística mais estudada com cianobactérias sejam os líquens que são associações complexas entre fungos e cianobactérias, ou entre fungos e algas verdes (RAI et al., 2004, RAI, 2018). Quando a associação inclui apenas cianobactérias, sem algas verdes, o conjunto é chamado de cianolíquen (RAI et al., 2004, RAI, 2018).

No entanto, as cianobactérias também se associam a organismos fotossintetizantes em ambiente terrestre (RAI et al., 2004, RAI, 2018, BUSTOS-DÍAZ; BARONA-GÓMEZ; CIBRIÁN-JARAMILLO, 2019). Neste caso, elas, além dos compostos fotoassimiliados, oferecem compostos nitrogenados fixados a partir do nitrogênio atmosférico. Cianobactérias do gênero *Nostoc* estão envolvidas em simbioses com musgos, com gimnospermas do gênero *Cycas* e angiospermas do gênero *Gunnera* (RAI et al., 2004, RAI, 2018, BUSTOS-DÍAZ; BARONA-GÓMEZ; CIBRIÁN-JARAMILLO, 2019). Talvez o caso mais conhecido seja o biosistema *Azolla-Anabaena*, utilizado a séculos por camponeses chineses para aumentar a produtividade dos campos de arroz (HILL, 1977; PETERS; MEEKS, 1989; RAJA et al, 2012). Pesquisas vem sendo desenvolvidas com o intuito de aplicação das cianobactérias como organismo fixador de nitrogênio em outras culturas (SINGH et al., 2016, BUSTOS-DÍAZ; BARONA-GÓMEZ; CIBRIÁN-JARAMILLO, 2019). Além dessas associações endofíticas, muitas linhagens de cianobactérias se associam de forma epifítica

formando o perifiton com algas fitoplanctônicas (AZIZAN et al. 2020), e com macrófitas aquáticas (PIMENTA, 2020). Toda essa versatilidade, resistência e adaptabilidade das cianobactérias oferece à ciência uma gama possibilidades para melhoramento de processos de produção econômica e resoluções de problemas ambientais (SINGH et al., 2016).

Diversos pesquisadores demonstram as possibilidades de uso das cianobactérias como fonte de aplicações biotecnológicas para solucionar questões das mais distintas áreas de estudo (SINGH et al., 2016). A intensidade de produção para a manutenção e expansão do modo de vida da crescente população humana, acaba gerando custos ambientais em diferentes frentes (SINGH et al., 2016). O desenvolvimento da agricultura foi de fundamental importância para o sucesso e expansão das populações humanas (HARARI, 2017). Porém, a partir da revolução verde, o uso cada vez mais intenso de fertilizantes industriais e agrotóxicos em grandes monoculturas fez com que a produção de alimentos se tornasse uma das atividades humanas com maior impacto sobre o meio ambiente (HARARI, 2017). Além do desmatamento desnecessário de novas áreas para plantio, e do uso de produtos químicos tóxicos utilizados para controlar populações de organismos indesejadas em meio aos diversos cultivos de relevância agrônômica que acabam por contaminar água, solo, ar, agricultores e consumidores, os fertilizantes industriais causam verdadeiras explosões populacionais quando, por ação das chuvas ou da irrigação chegam a cursos de água (HARARI, 2017). A utilização de alternativas no manejo de culturas agrícolas vem sendo muito explorada nos últimos anos, uma delas, a fixação biológica de nitrogênio (SINGH et al., 2016).

Além da agricultura, a busca por fontes de energias renováveis alternativas aos combustíveis fósseis está em expansão, devido, principalmente, à crise climática, fruto do modo de vida humano (HARARI, 2017). Essa crise chegou a níveis alarmantes, com o maior degelo das calotas polares e as mais altas temperaturas já registradas no continente Antártico, com secas mais severas e longas, e chuvas concentradas que geram cada vez mais transtornos de proporções cada vez maiores, tanto econômicos quanto sociais (HARARI, 2017). Tentando descobrir novas fontes energéticas,

pesquisadores têm se empenhado em novas formas de produção de energia a partir de cianobactérias (SINGH et al., 2016). Combustíveis tradicionais como etanol podem ser obtidos através da fermentação alcoólica da biomassa de cianobactérias com maior produtividade por área (ZHU et al, 2017; LIANG et al, 2018; SILVA; BARBERA; BERTUCCO, 2019). Também são desenvolvidos projetos para a obtenção de hidrogênio, a partir do metabolismo das cianobactérias, com isso é possível desenvolver geradores mais eficientes energeticamente, e que depois da combustão liberam vapor de água ao ambiente (KHETKORN et al., 2017, KOLBE; LECHTENBÖHMER; FISCHEDICK, 2020).

Outra vertente de pesquisa com cianobactérias são o tratamento dos resíduos poluentes advindos das atividades agrícolas e industriais (SINGH et al., 2016). A poluição causada pela falta de tratamento dos resíduos leva ao desequilíbrio ecológico e algumas espécies se aproveitam aumentando suas populações ampliando a cadeia de eventos prejudiciais ocasionada por este despejo sem tratamento (SINGH et al., 2016). Esta resposta a longo prazo é benéfica aos sistemas naturais, haja visto que posteriormente à explosão dessas populações o incremento alocado no meio natural é consumido pela biota e a população começa a diminuir, retornando o equilíbrio ecológico (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2009). Observando este sistema, cientistas têm estudado formas de combater a poluição ambiental através da utilização de microrganismos, dentre eles, as cianobactérias. Estudos relacionam o potencial de crescimento das cianobactérias em sistemas desequilibrados com sua capacidade de biorremediação (TERSAGH; OKERENTUGBA; OKPOKWASILI, 2016a, TERSAGH; OKERENTUGBA; OKPOKWASILI, 2016b).

Há muito ainda a ser explorado nas pesquisas com as cianobactérias, seres que passaram por muitas catástrofes ambientais durante sua história evolutiva, mas, como grupo, se mantiveram sobrevivendo à oscilações climáticas, desde aquecimentos globais, resfriamento do planeta, quedas de asteroides, surgimento e extinção de outras linhagens. Temos muito a aprender com elas, para, quem sabe, conseguir superar os problemas que criamos ao planeta.

REFERÊNCIAS

ANBAR, Ariel D. et al. A whiff of oxygen before the great oxidation event? **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1903-1906, 2007.

AZIZAN, Asmimie Asmawarnie et al. First records of morphological diversity and ecology of periphytic cyanobacteria from Tukun River, Penang Forest Reserve, Malaysia. **Tropical life sciences research**, v. 31, n. 1, p. 85, 2020.

ARCHIBALD, John M. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. **Current Biology**, v. 25, n. 19, p. R911-R921, 2015.

BEGON, Michael; TOWNSEND, Colin R.; HARPER, John L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed Editora, 2009.

BERMAN-FRANK, Ilana; LUNDGREN, Pernilla; FALKOWSKI, Paul. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in microbiology**, v. 154, n. 3, p. 157-164, 2003.

BUSTOS-DÍAZ, Edder D.; BARONA-GÓMEZ, Francisco; CIBRIÁN-JARAMILLO, Angélica. Cyanobacteria in nitrogen-fixing symbioses. In: **Cyanobacteria**. Academic Press, 2019. p. 29-42.

BUTTERFIELD, Nicholas J. Macroevolution and macroecology through deep time. **Palaeontology**, v. 50, n. 1, p. 41-55, 2007.

DEMOULIN, Catherine F. et al. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, p. 206-223, 2019.

DICK, Gregory J.; GRIM, Sharon L.; KLATT, Judith M. Controls on O₂ production in cyanobacterial mats and implications for Earth's oxygenation. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 46, p. 123-147, 2018.

GRAY, Michael W. The evolutionary origins of organelles. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 294-299, 1989.

HÄDER, Donat-P.; SCHÄFER, Jochen. Photosynthetic oxygen production in macroalgae and phytoplankton under solar irradiation. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 293-299, 1994.

HAMILTON, Trinity L.; BRYANT, Donald A.; MACALADY, Jennifer L. The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 2, p. 325-340, 2016.

- HARARI, Yuval Noah. Sapiens: Uma breve história da humanidade. 19. Trad. Janaina Marcoantonio. Porto Alegre: L&PM, 2017.
- HILL, David. J. The role of Anabaena in the Azolla-Anabaena symbiosis. **New Phytologist**, v. 78, n. 3, p. 611-616, 1977.
- HOLLAND, Heinrich D. The oxygenation of the atmosphere and oceans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1470, p. 903-915, 2006.
- KHETKORN, Wanthanee et al. Microalgal hydrogen production—A review. **Bioresource technology**, v. 243, p. 1194-1206, 2017.
- KIMURA, Hiroto; WATANABE, Yoshio. Oceanic anoxia at the Precambrian-Cambrian boundary. **Geology**, v. 29, n. 11, p. 995-998, 2001.
- KNOLL, Andrew H. Cyanobacteria and earth history. **The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution**, v. 484, 2008.
- KNOLL, Andrew H.; NOWAK, MARTIN A. The timetable of evolution. **Science advances**, v. 3, n. 5, p. e1603076, 2017.
- KOLBE, Karin; LECHTENBÖHMER, Stefan; FISCHEDICK, Manfred. Hydrogen derived from algae and cyanobacteria as a decentralized fueling option for hydrogen powered cars: Size, space, and cost characteristics of potential bioreactors. **International Journal of Sustainable Transportation**, v. 14, n. 5, p. 325-334, 2020.
- KUMP, Lee R. The rise of atmospheric oxygen. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 277-278, 2008.
- LIANG, Feiyan et al. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. **Metabolic engineering**, v. 46, p. 51-59, 2018.
- LÓPEZ-GARCÍA, Purificación; EME, Laura; MOREIRA, David. Symbiosis in eukaryotic evolution. **Journal of theoretical biology**, v. 434, p. 20-33, 2017.
- LYONS, Timothy W.; REINHARD, Christopher T.; PLANAVSKY, Noah J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 307-315, 2014.
- MARTIN, William F.; GARG, Sriram; ZIMORSKI, Verena. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1678, p. 20140330, 2015.
- OHNO, Susumu. The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. **Journal of molecular evolution**, v. 44, n. 1, p. S23-S27, 1997.

OSTRANDER, Chadlin M. et al. Fully oxygenated water columns over continental shelves before the Great Oxidation Event. **Nature geoscience**, v. 12, n. 3, p. 186-191, 2019.

PETERS, Gerald. A.; MEEKS, John. C. The Azolla-Anabaena symbiosis: basic biology. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 193-210, 1989.

PIMENTA, Larissa L. Efeito da limitação de luz e nutrientes na alocação para estruturas adaptativas em cianobactérias associadas epifiticamente às raízes de *Salvinia auriculata*. Dissertação de mestrado, **UFLA**. 2020.

PLANAUSKY, Noah J. et al. Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. **Nature Geoscience**, v. 7, n. 4, p. 283-286, 2014.

PONCE-TOLEDO, Rafael I. et al. An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids. **Current Biology**, v. 27, n. 3, p. 386-391, 2017.

RAI, Amar N. et al. (Ed.). **Cyanobacteria in symbiosis**. Kluwer Academic Pub., 2002.

RAI, Amar Nath. **CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria**. CRC Press, 2018.

RAJA, Wasif et al. Azolla-Anabaena Association and Its Significance In Supportable Agriculture. **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 2012.

ROUSK, Kathrin; SORENSEN, Pernille Laerkedal; MICHELSEN, Anders. Nitrogen transfer from four nitrogen-fixer associations to plants and soils. **Ecosystems**, v. 19, n. 8, p. 1491-1504, 2016.

SCHIRRMEISTER, Bettina E.; GUGGER, Muriel; DONOGHUE, Philip CJ. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. **Palaeontology**, v. 58, n. 5, p. 769-785, 2015.

SCHIRRMEISTER, Bettina E.; SANCHEZ-BARACALDO, Patricia; WACEY, David. Cyanobacterial evolution during the Precambrian. **International Journal of Astrobiology**, v. 15, n. 3, p. 187-204, 2016.

SILVA, Carlos E. F.; BARBERA, Elena; BERTUCCO, Alberto. Biorefinery as a promising approach to promote ethanol industry from microalgae and cyanobacteria. In: **Bioethanol production from food crops**. Academic Press, 2019. p. 343-359.

SINGH, Jay Shankar et al. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 529, 2016.

TERSAGH, Ichor.; OKERENTUGBA, Phillip. O.; OKPOKWASILI, Gideon. C. Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by a consortium of Cyanobacteria isolated from crude oil polluted brackish waters of bodo creeks in Ogoniland, Rivers State. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 16, 2016a.

TERSAGH, Ichor; OKERENTUGBA, Phillip. O.; OKPOKWASILI, Gideon. C. Growth Kinetics of Aerobic Heterotrophic Bacteria and Cyanobacteria During Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon in Bodo Creek. **J Pet Environ Biotechnol**, v. 7, n. 299, p. 2, 2016b.

VALVERDE, Angel et al. Cyanobacteria drive community composition and functionality in rock–soil interface communities. **Molecular ecology**, v. 24, n. 4, p. 812-821, 2015.

WHITTON, Brian A.; POTTS, Malcolm (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Springer Science & Business Media, 2007.

YOUNG, Grant M. Precambrian supercontinents, glaciations, atmospheric oxygenation, metazoan evolution and an impact that may have changed the second half of Earth history. **Geoscience Frontiers**, v. 4, n. 3, p. 247-261, 2013.

ZHU, Zhi et al. Rescuing ethanol photosynthetic production of cyanobacteria in non-sterilized outdoor cultivations with a bicarbonate-based pH-rising strategy. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 - Adaptações morfológicas em cianobactérias filamentosas associadas às raízes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae): o efeito de nutrientes e luz

RESUMO

As cianobactérias são organismos que tem origem estimada em 3,5 bilhões de anos, e desde que surgiram no planeta alteram a composição de gases atmosféricos e participam de associações com diversos organismos. São produtoras primárias fundamentais nos mais diversos ecossistemas, participam de ciclos biogeoquímicos complexos e auxiliam a manter o equilíbrio destes. A longevidade da linhagem se deve, em grande parte, à plasticidade morfológica e fisiológica que apresenta, podendo resistir ou escapar de ambientes mais hostis, por meio de estratégias adaptativas. Nos últimos 200 anos o ser humano tem acelerado alguns processos ambientais, como o aporte de nutrientes através da poluição oriunda de nosso modo de vida, o qual tem ocasionado em um aumento da temperatura no planeta. Tendo essas alterações nos sistemas naturais como premissa, propusemo-nos a investigar as respostas morfológicas de cianobactérias filamentosas associadas a raízes da macrófita *Pistia stratiotes*. Com o objetivo de compreender o comportamento desse grupo frente a diferenças nas taxas de nitrogênio (N) e carbono (C), simulamos o aporte de nitrogênio com solução nutritiva de Hoagland e de carbono utilizando cinzas vegetais, além de, conjuntamente, empregar dois níveis de luz. Assim, testamos as seguintes hipóteses: (1) Haverá um maior número de necrídeos nos tratamentos com maior disponibilidade de nutrientes, já que os necrídeos são formados antes da divisão do filamento e formação dos hormogônios; (2) o número de hormogônios será maior nos tratamentos com sombra e nutrientes (C e N), pois eles são estruturas de reprodução que poderão dispersar para locais iluminados, e como o nitrogênio e o carbono são elementos fundamentais para a nutrição, o aporte deles proporcionará maior taxa reprodutiva e, (3) uma elevação na disponibilidade de carbono causará um desequilíbrio na relação C/N existente nas células, levando a um aumento na produção de heterócitos que elevarão a fixação de nitrogênio atmosférico. Os resultados mostraram que houve maior abundância de necrídeos nos tratamentos com aporte de nitrogênio (N1 e N2), vimos também preferência pelos tratamentos sob sol e com adição de nutrientes para a formação de hormogônios (C2). A formação de heterócitos não teve relação com sombreamento, mas sim com o incremento de carbono através do aporte de cinzas vegetais (C1 e C2). As respostas encontradas em nosso experimento mostram como o aporte de nutrientes influenciam nas respostas adaptativas das cianobactérias filamentosas, tanto no nível individual quanto na comunidade epifítica. O aporte maior de nitrogênio levou a um número maior de necrídeos, diretamente relacionados com a produção de hormogônios de cianobactérias

filamentosas homocitadas, e nos tratamentos com incremento de carbono além da produção em massa de heterócitos, a comunidade foi dominada por cianobactérias filamentosas heterocitadas. O número de hormogônios foi maior no tratamento C2, onde o grande número de heterócitos pode ter sido responsável pelo rompimento dos filamentos. Nossos resultados demonstram toda a adaptabilidade que as cianobactérias desenvolveram ao longo de sua história evolutiva para enfrentar situações adversas, transformando-se ou resistindo a elas.

Palavras-chave: Heterócitos; Hormogônios; necrídios; Fatores abióticos; Fixação Biológica de Nitrogênio; Estratégias adaptativas.

INTRODUÇÃO

A linhagem das cianobactérias teve origem no Arqueano, porém ainda não há consenso sobre a idade do grupo, pois alguns teóricos mais conservadores estimam que sua origem se deu ao fim do Arqueano por volta de 2,7 bilhões de anos, enquanto, outros alegam que originaram-se entre 3,8 e 3,5 bilhões de anos (KNOLL, 2008; SCHIRRMEISTER; SANCHEZ-BARACALDO; WACEY, 2016; DVOŘÁK et al, 2017; DEMOULIN, 2019). De qualquer modo, sabe-se que a evolução do grupo causou profunda mudança na história biológica da Terra, visto que foram responsáveis pela geração de grande parte do oxigênio que possibilitou a explosão de vida aeróbica no planeta (OHNO, 1997; KIMURA; WATANABE, 2001; HOLLAND, 2006; ANBAR, 2007; KUMP, 2008; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014; PLANAVSKY, 2014; SCHIRRMEISTER; GUGGER; DONOGHUE, 2015; DICK; GRIM; KLATT, 2018; OSTRANDER, 2019).

Além da liberação de oxigênio, por meio da fotossíntese oxigênica, as cianobactérias são produtoras primárias fundamentais em diversos ambientes, sendo aquáticos (água doce, salgada, polar ou termais) (OLIVER et al, 2012; VINCENT; QUESADA, 2012; QUESADA; VINCENT, 2012; WARD; CASTENHOLZ; MILLER, 2012) ou terrestres (de desertos a montanhas) (MEZ; HANSELMANN; PREISIG, 1998; HU; GAO; WHITTON, 2012); elas também participam de ciclos biogeoquímicos (como do carbono e nitrogênio) contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico do planeta (KIMURA; WATANABE, 2001; BUTTERFIELD, 2007; YOUNG, 2013; AMAROUICHE-YALA et al, 2014; VALVERDE et al, 2015; SINGH et al., 2016).

Sabemos que um dos pilares para o sucesso biológico de qualquer taxa é a capacidade de sobrevivência, manutenção e reprodução de seus indivíduos ao longo do tempo (SOUSA, 1979; FABIAN; FLATT, 2012). As cianobactérias desenvolveram estratégias adaptativas que

favoreceram, e ainda favorecem, a manutenção de suas populações, uma delas é a produção de acinetos, células de resistência, com a capacidade de se encapsularem sob condições ambientais extremas. Estas células, quando as condições retornam a níveis toleráveis, germinam e formam novos filamentos de cianobactérias (RAI; PANDEY, 1981; KAPLAN-LEVY et al, 2010; SUKENIK; RÜCKER; MALDENER, 2019). Outra estratégia desenvolvida ao longo da evolução das cianobactérias está relacionada a sua reprodução, sempre assexuada (CASTENHOLZ, 2015). A reprodução das cianobactérias filamentosas ocorre pela partição do filamento, essas partes isoladas recebem o nome de hormogônios e geram, através de divisões celulares, outro filamento geneticamente idêntico ao parental (WHITTON; POTTS, 2012; CASTENHOLZ, 2015). A identificação dos hormogônios em amostras ambientais é dificultada por sua grande variação entre as linhagens de cianobactérias presentes. Podem variar em número e tamanho das células, o que pode nos levar a confundir um hormogônio de uma linhagem com o filamento maduro de outra. A reprodução clonal garante economia de energia, visto que o investimento energético para a formação de estruturas reprodutivas sexuadas é alto (AGRAWAL, 2001).

O grupo das cianobactérias é extremamente diverso em termos morfológicos (KOMÁREK et al, 2014; DVOŘÁK et al, 2017). Existem dois tipos morfológicos básicos, as unicelulares e as pluricelulares, mas esses arranjos morfológicos não remetem à filogenia do grupo, já que segundo dados moleculares as relações de parentesco não estão ligadas a sua morfologia (KOMÁREK et al, 2014; DVOŘÁK et al, 2017). Neste trabalho, focamos no grupo das cianobactérias filamentosas, as quais podem ser separadas em homocitadas, sem diferenciação celular, ou heterocitadas, com modificações celulares (KOMÁREK et al, 2014).

Ambos os grupos têm capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, variando apenas o modo como esta fixação ocorre. No grupo das homocitadas, as linhagens capazes de fixar biologicamente o nitrogênio o fazem quando há baixa luminosidade, isto porque o oxigênio é um limitante para a enzima nitrogenase, responsável pela redução do gás nitrogênio em moléculas assimiláveis, como nitratos, nitritos, amônia entre outras (LATYSHEVA, 2012, ZHANG et al, 2018; FORCHHAMMER; SELIM, 2019). Já as cianobactérias filamentosas heterocitadas, promovem a fixação biológica do nitrogênio sem restrição ao oxigênio, isso porque quando há um desbalanço entre as quantidades de carbono e nitrogênio (C/N) no meio, com menor disponibilidade de nitrogênio, elas diferenciam células, chamadas heterócitos, ao longo dos filamentos com uma parede celular mais espessa, capaz de reter a passagem do oxigênio, possibilitando que a nitrogenase tenha sua capacidade de redução do N inalterada (LATYSHEVA, 2012, ZHANG et al, 2018; FORCHHAMMER; SELIM, 2019).

Em ambientes naturais, sem o despejo excessivo de nutrientes advindos de atividades humanas, estes mecanismos promovem uma readequação das quantidades de nutrientes disponíveis, promovendo o equilíbrio dessas substâncias, alternando momentos de maior ou menor aporte, tanto de carbono quanto de nitrogênio, de acordo com regimes sazonais (SINGH et al, 2016). Porém, o aumento da disponibilidade de nutrientes oriundos do consumo humano (agricultura, resíduos industriais, esgoto, queimadas, uso de combustíveis fósseis) no período pós revolução industrial, tem acelerado modificações ambientais e climáticas, capazes de alterar sistemas naturais (DUBEY et al, 2011; ZINICOVSCAIA, 2016). Nesse novo cenário, a natureza não tem tempo de acompanhar a velocidade dessas alterações e se ajustar às rápidas modificações, o que tem resultado em uma das maiores taxas de extinções locais da história (LANDE, 1998; COURCHAMP et al, 2006; BOIVIN et al, 2016; ZIEGLER, 2019).

Tendo essas alterações nos sistemas naturais como premissa propusemo-nos a investigar as respostas adaptativas morfológicas de cianobactérias filamentosas de ambiente aquático associadas epifiticamente a raízes da macrófita aquática *Pistia stratiotes*. Com o objetivo de compreender o comportamento desse grupo frente a diferenças nas taxas de nitrogênio (N) e carbono (C), simulamos o aporte de nitrogênio com solução nutritiva de Hoagland e de carbono utilizando cinzas vegetais, além de, conjuntamente, empregar dois níveis de luz. Assim, testamos as seguintes hipóteses: (1) Haverá um maior número de necrídeos nos tratamentos com maior disponibilidade de nutrientes, já que os necrídeos são formados antes da divisão do filamento e formação dos hormogônios; (2) o número de hormogônios será maior nos tratamentos com sombra e nutrientes (C e N), pois eles são estruturas de reprodução que poderão dispersar para locais iluminados, e como o nitrogênio e o carbono são elementos fundamentais para a nutrição, o aporte deles proporcionará maior taxa reprodutiva e, (3) uma elevação na disponibilidade de carbono causará um desequilíbrio na relação C/N existente nas células, levando a um aumento na produção de heterócitos que elevarão a fixação de nitrogênio atmosférico.

DESENVOLVIMENTO

Materiais e métodos

2.1- Sistema de estudo: Macrófita aquática-Cianobactérias

Pistia stratiotes L. (Araceae) é uma macrófita aquática com distribuição cosmopolita, bastante comum em águas tropicais. Ela se reproduz tanto clonalmente, originando rosetas que são ligadas por estolões que, frequentemente, crescem formando densos tapetes de vegetação nos corpos d'água, quando sexuadamente (LALLANA, 1989). Suas flores crescem do centro da roseta, escondidas na axila foliar e, como outras Araceae, consistem de uma inflorescência do tipo espádice (SCULTHORPE, 1967). Esta macrófita é extremamente adaptável ao cultivo *ex situ* e, por isso, é utilizada como organismo modelo em diversas áreas de pesquisa. Além disso, por ser uma macrófita aquática flutuante com grande quantidade de raízes secundárias (figura 1), ela apresenta potencial para estudos de relações com microrganismos aquáticos.



Figura 1- Roseta de *Pistia stratiotes* com detalhamento das raízes, foco de nosso estudo pela potencialidade de associação com microrganismos. Fonte: Carolina N. Mendes.

Cianobactérias

Dentre as cianobactérias, focamos nosso estudo no grupo das filamentosas, devido as mesmas formarem hormogônios e algumas linhagens produzirem heterócitos. Mais especificamente, acompanhamos a produção de estruturas adaptativas nas cianobactérias filamentosas epifíticas às raízes da macrófita, seja o surgimento dos necrídeos, que são espaços que surgem a partir de morte celular, antes da formação de hormogônios. A formação de hormogônios, que são trechos do filamento que se rompeu, responsáveis pela reprodução das cianobactérias filamentosas, pois dão origem a novos filamentos. Por fim, acompanhamos a formação de heterócitos, que são células especializadas na fixação biológica do N_2 .

2.2- Amostragem e experimento em casa de vegetação

As rosetas de *P. stratiotes* foram coletadas no reservatório da usina hidrelétrica do funil, sob a influência do rio Grande, situada entre os municípios de Lavras e Perdões (21° 8' 36.45" S, 45° 2' 11.12" W), na mesorregião do Campo das Vertentes em Minas Gerais. Após a coleta, as mesmas foram aclimatadas em casa de vegetação por 7 dias antes da montagem do experimento. O experimento consistiu em seis tratamentos, cada um deles com quatro réplicas, todos utilizando água tratada de torneira, e no mínimo solução nutritiva de Hoagland a 5% de força iônica que foi o necessário para a sobrevivência das plantas. Para avaliar as modificações celulares, utilizamos dois tipos de soluções com diferenças entre os nutrientes que os compõem, com base em dois aspectos relevantes para o ambiente aquático natural, o aumento do carbono disponível e o excesso de nitrogênio. Para simular o incremento de carbono, adicionamos 2,2 g / L de cinzas de carvão, que são ricas em carbonatos (ETIÉGNI; CAMPBELL, 1991). Já para simular o aumento do nitrogênio, a solução Hoagland foi adicionada em dois níveis de força iônica (5% a 50%), a solução Hoagland é comumente utilizada em experimentos de manutenção e crescimento vegetal devido à presença de compostos de nitrogênio e fósforo. Os tratamentos foram os seguintes: (C1) adição de solução nutritiva de Hoagland a 5% de força iônica, somado ao acréscimo de 2,2 gr/L de cinzas e sombrite 70%; (C2) adição de solução nutritiva de Hoagland a 5% de força iônica, somado ao acréscimo de 2,2 gr/L de cinzas; (N1) adição de solução nutritiva de Hoagland com 50% de força iônica e sombrite 70%; (N2) adição de solução nutritiva de Hoagland com 50% de força iônica; (Co1) adição de solução nutritiva de Hoagland a 5% de força iônica e sombrite 70%; (Co2) adição de solução nutritiva de Hoagland a 5% de força iônica. (Figura 1). A utilização das cinzas vegetais se deu por apresentarem altos níveis de carbonatos em sua constituição (ETIÉGNI; CAMPBELL, 1991).

	Sombra				Sol			
Carbono	C1	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C2
Nitrogênio	N1	N1	N1	N1	N2	N2	N2	N2
Controle	Co1	Co1	Co1	Co1	Co2	Co2	Co2	Co2

Figura 2 – Tratamentos C1 e C2 são compostos por solução de Hoagland 5% acrescida de 2,2 gr/L de cinzas na sombra (sombrite 70%) e sob sol, denotados por quadros cinzas e brancos, respectivamente; N1 e N2 contém solução de Hoagland 50% na sombra (sombrite 70%) e sob sol, respectivamente; Co1 e Co2 são tratamentos controle com solução de Hoagland a 5%, apenas para manutenção das plantas, na sombra (sombrite 70%) e sob sol, respectivamente.

A amostragem foi feita quinzenalmente, num período de 60 dias. Em cada amostragem foram coletados espremidos das raízes das macrófitas para a montagem das lâminas, a fim de se observar as cianobactérias filamentosas epifíticas às raízes. Cada amostra foi composta de pequenos fragmentos de raízes e do líquido obtido dos espremidos, posteriormente foram homogeneizadas e alocadas em tubos Eppendorf de 3,5ml contendo a solução fixadora de Transeau (BICUDO; MENEZES, 2017).

2.3- Observação e quantificação das estruturas adaptativas

A partir de cada tubo Eppendorf, que correspondeu a uma coleta, foram montadas seis lâminas (96 Eppendorfs x 6 lâminas, totalizando 576 lâminas observadas), com duas gotas da amostra líquida homogeneizada. Depois de montadas, as lâminas foram observadas uma vez seguindo um padrão de zigue zague, de modo similar à câmara de Neubauer. Avaliamos, assim, cuidadosamente, os números totais de estruturas adaptativas e modificações no filamento, como presença de necrídeos, formações de hormogônios e produção de heterócitos. Consideramos hormogônios, filamentos com poucas células, de três a dez células vegetativas, e com células menores que as do filamento, visando padronizar a contagem das estruturas nos diferentes tratamentos. A observação de cada estrutura foi feita sob microscópio óptico (Microscópio Binocular E100 LED Nikon), em objetiva de 40x, e a quantificação em objetiva de 100x.

2.4- Análise de dados

O efeito dos tratamentos sobre as modificações celulares, número de heterócitos, necrídeos e hormogônios, foi analisado por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de subconjuntos homogêneos stepwise stepdown, no qual as variáveis preditoras categóricas (fator) foram o aporte de nutrientes e a incidência de luz. As variáveis resposta foram o número de heterócitos, número de necrídeos e número de hormogônios encontrados em cada tratamento. As análises foram conduzidas em software IBM SPSS Statistics® (versão 22). Além disso, o efeito de uma possível dessincronização entre formação de necrídeos e heterócitos foi testado por meio de correlação de Spearman.

Resultados

A tabela 1 mostra a produção de cada estrutura adaptativa analisada, necrídeos (figura 3), hormogônios (figura 4) e heterócitos (figura 5) em cada tratamento empregado.

Tabela 1 – Números totais de necrídeos, heterócitos e hormogônios em cada tratamento.

Tratamentos	Necrídeos	Heterócitos	Hormogônios
Controle/Sol	63	372	9714
Controle/Sombra	69	424	11186
Carbono/Sol	619	79462	51819
Carbono/Sombra	142	12873	18288
Nitrogênio/Sol	2383	8	18603
Nitrogênio/Sombra	2279	2	12410

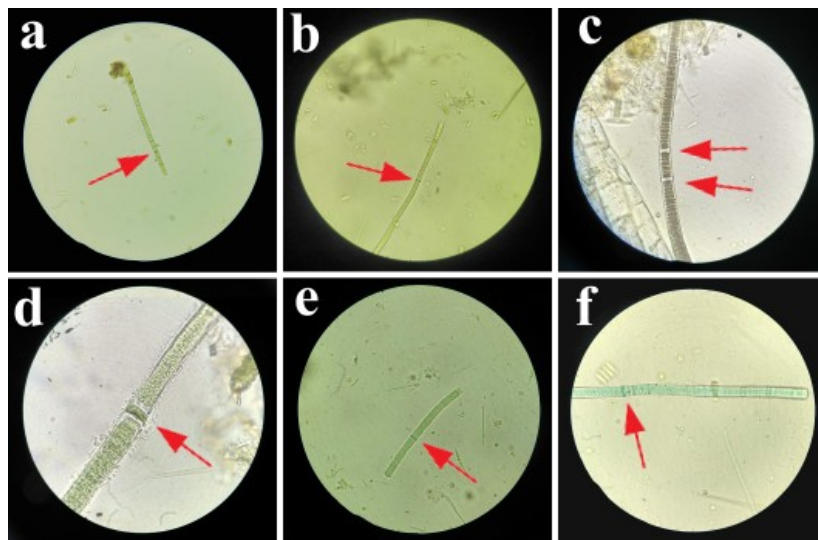


Figura 3– Necrídeos (apontados pelas setas vermelhas) observados durante o processo de contagem nos tratamentos N1 (a,b,e) e N2 (c, d, f).

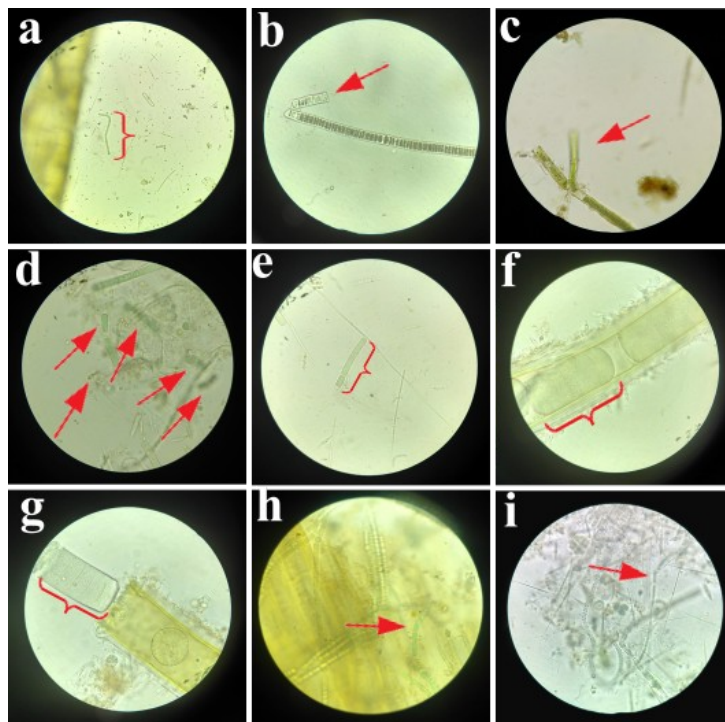


Figura 4 – Hormogônios das cianobactérias filamentosas epifíticas às raízes de *P. stratiotes*, indicados pelas setas e chaves vermelhas.

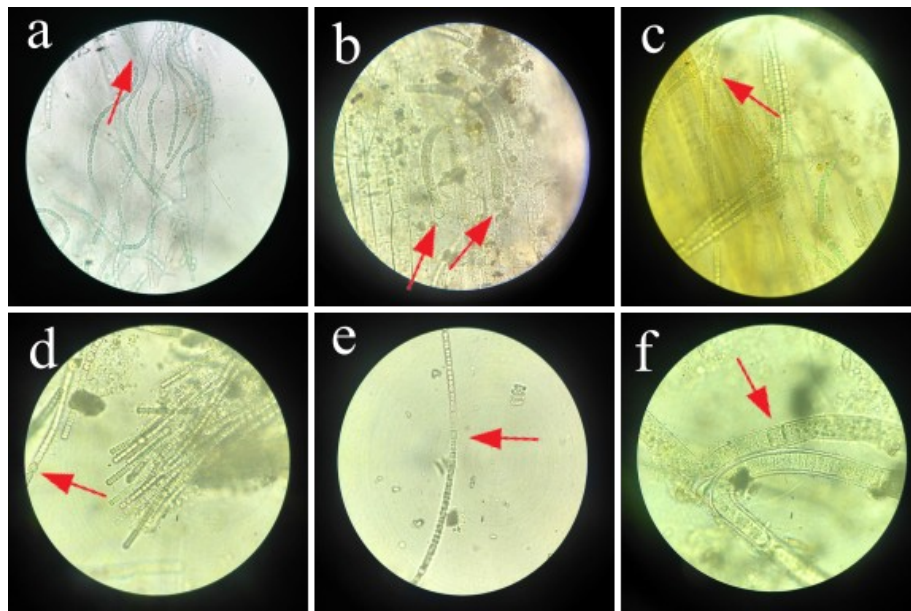


Figura 5 – Cianobactérias filamentosas heterocitadas encontradas nos tratamentos C2 (a, b, c, d), C1 (e) e N2 (f); os heterócitos estão indicados pelas setas vermelhas.

A formação de necrídios foi observada em maior número em linhagens de cianobactérias filamentosas homocitadas. Segundo Komárek e Johansen (2015) são poucas as linhagens que apresentam heterócitos e necrídeos, em nosso estudo apenas em *Scytonemataceae*, linhagem heterocitada e pouco representativa em nossos tratamentos, foram observados espaços necridiais e heterócitos. Os maiores números de necrídios foram registrados nos tratamentos com acréscimo de nitrogênio, tanto a sol pleno quanto a sombra (N2; N1) (KW = 19.324, $p = 0,002$) (Figura 6a). O número de hormogônios foi maior no tratamento (C2) (KW=15.960, $p = 0,007$) (Figura 6b). A formação dos heterócitos se deu em maior quantidade também nos tratamentos com aumento de carbono pelo acréscimo das cinzas (KW=21.490, $p = 0,001$), sendo que no tratamento (C2) os valores foram ainda maiores (Figura 6c).

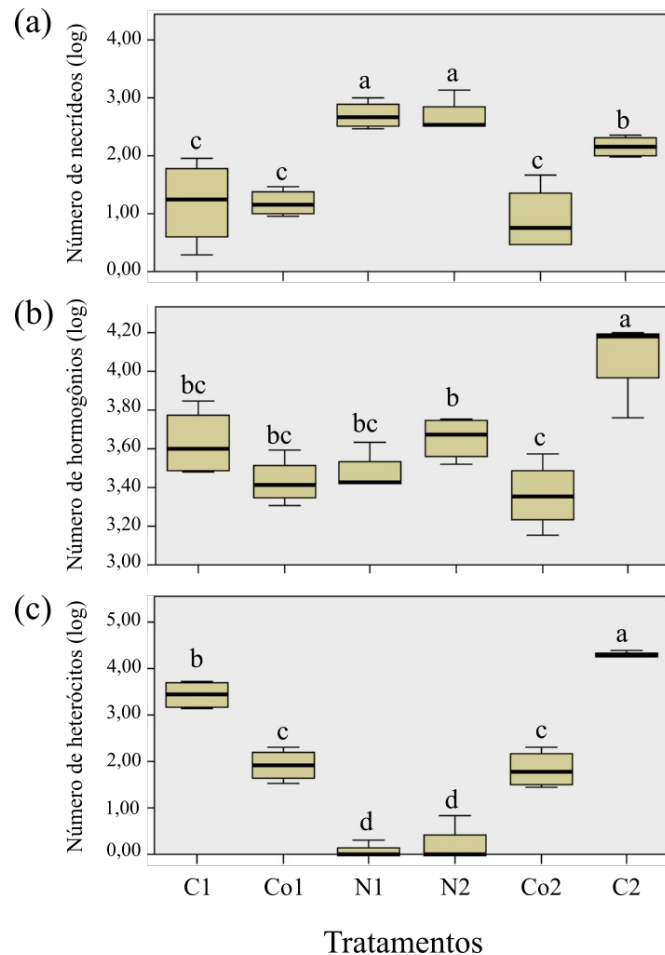


Figura 6 – Variações no número (log) de necrídeos (a), hormogônios (b) e heterócitos (c) observados nos tratamentos: Controle no sol (Co2) e na sombra (Co1); com acréscimo de carbono no sol (C2) e na sombra (C1) e com acréscimo de nitrogênio no sol (N2) e na sombra (N1). As barras em preto dentro dos blocos representam as medianas. Após o teste de Kruskal Wallis foram feitas comparações múltiplas de subconjuntos homogêneos stepwise stepdown, onde as letras indicam as diferenças significativas entre os tratamentos.

Os maiores números de necrídeos foram encontrados nos tratamentos (N2 e N1) enquanto os números mais expressivos de heterócitos foram encontrados nos tratamentos (C2 e C1), mostrando assim uma correlação negativa entre essas estruturas ($r = -0,472$; $p = 0,019$), (Figura 7; Figura 8).

Como resultado adicional foram isoladas 19 linhagens de cianobactérias (Tabela 2; Figura 9; Figura 10; Figura 11) a partir dos tratamentos C1 e C2 (carbono), N1 e N2 (nitrogênio) e Co1 e Co2 (controle), identificadas a partir dos caracteres morfológicos, dentre as quais o gênero raro *Cronbergia* (Figura 9g), com apenas uma espécie descrita para o Brasil, no estado do Amazonas (KOMÁREK; ZAPOMELOVA; HINDAK, 2010; GENUÁRIO; SANT'ANNA; MELO, 2018).

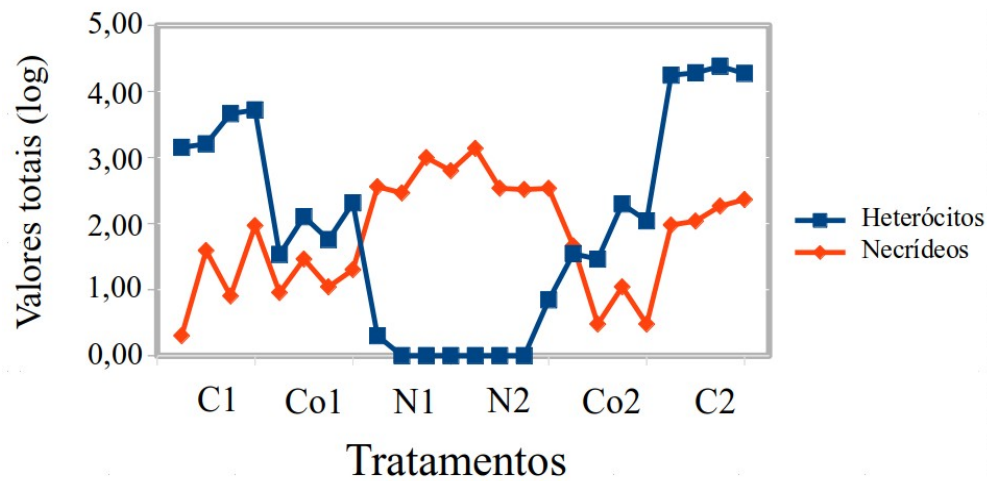


Figura 7 - Número de heterócitos e necrídeos encontrados nos tratamentos empregados, onde C1 (sombra) e C2 (sol) são tratamentos com acréscimo de cinzas vegetais, N1 (sombra) e N2 (sol) tratamentos com acréscimo de solução de Hoagland com 50% de força iônica e os tratamentos Co1 (sombra) e Co2 (sol) com acréscimo de solução de Hoagland com força iônica de 5% (quantidade suficiente para manter as macrófitas vivas até o fim do experimento).

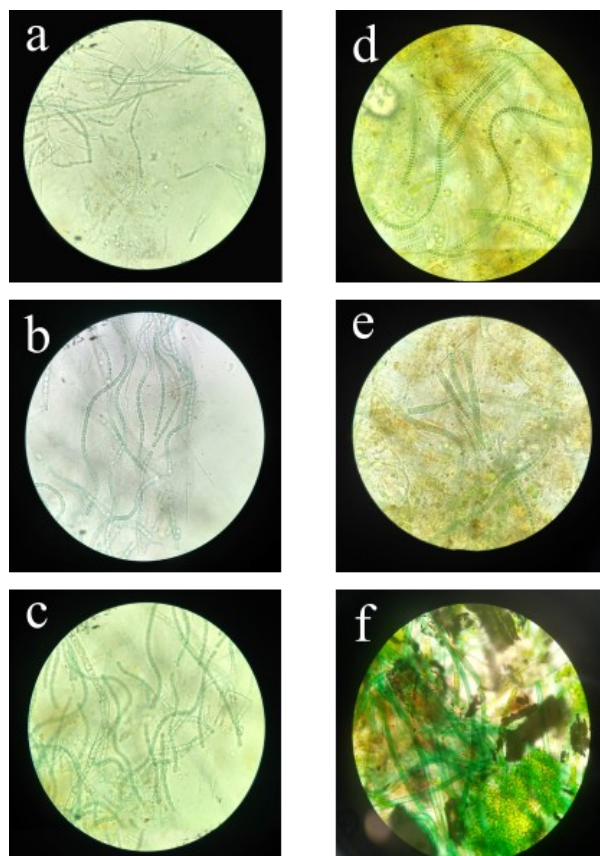


Figura 8 – Comunidade de cianobactérias associadas às raízes de *P. stratiotes* dependente dos tratamentos empregados: Tratamentos com acréscimo de carbono (a, b, c) com predominância de linhagens filamentosas heterocitadas, e tratamentos com acréscimo de nitrogênio (d, e, f) com predominância de linhagens filamentosas homocitadas.

Tabela 2 – Linhagens de cianobactérias isoladas a partir dos tratamentos propostos (C1, C2, N1, N2 Co1 e Co2)

Tratamento	Código	Identificação com base na morfologia dos grupos	Morfologia	Figura
C1	P1101	Microcoleaceae	Homocitada	9a
C2	P6101	Gloeotrichiaceae; <i>Calothrix</i> sensu lato/Cf. <i>Gloeotrichia</i> sp.	Heterocitada	9b
C2	P6102	Pseudanabaenaceae; <i>Pseudanabaena</i> sp.	Homocitada	9c
C2	P6104	Leptolyngbyaceae; <i>Leptolyngbya</i> sensu lato/Cf. <i>Alkalinema</i> sp.	Homocitada	9d
C2	P6107	Nostocaceae, <i>Cyanocohniella</i> sp.	Heterocitada	9e
C2	P6108	Rivulariaceae; <i>Calothrix</i> sensu lato sp1	Heterocitada	9f
C2	P6109	Nostocaceae, <i>Cronbergia</i> sp.	Heterocitada	9g

C2	P6110	Rivulariaceae; <i>Calothrix</i> sp2.	Heterocitada	9h
C2	P6111	Nostocaceae; <i>Nostoc</i> sensu lato sp1	Heterocitada	9i
C2	P6112	Rivulariaceae; <i>Calothrix</i> sensu lato sp3.	Heterocitada	9j
N1	P3101	Scytonemataceae; <i>Scytonema</i> sp.	Heterocitada	10a
N2	P4104	Leptolyngbyaceae; <i>Leptolyngbya</i> sensu lato sp2.	Homocitada	10b
Co1	P2102	Pseudanabaenaceae; <i>Pseudanabaena</i> sp2.	Homocitada	11a
Co1	P2103	Rivulariaceae; <i>Calothrix</i> sensu lato sp4.	Heterocitada	11b
Co1	P2105	Nostocaceae; <i>Nostoc</i> sensu lato sp2.	Heterocitada	11c
Co1	P2106	Rivulariaceae; <i>Calothrix</i> sensu lato sp5.	Heterocitada	11d
Co2	P5101	Nostocaceae; <i>Nostoc</i> sensu lato sp3.	Heterocitada	11e
Co2	P5102	Nostocaceae; <i>Nostoc</i> sensu lato sp4.	Heterocitada	11f
Co2	P5103	Tolypothrichaceae; <i>Tolypothrix</i> sp.	Heterocitada	11g

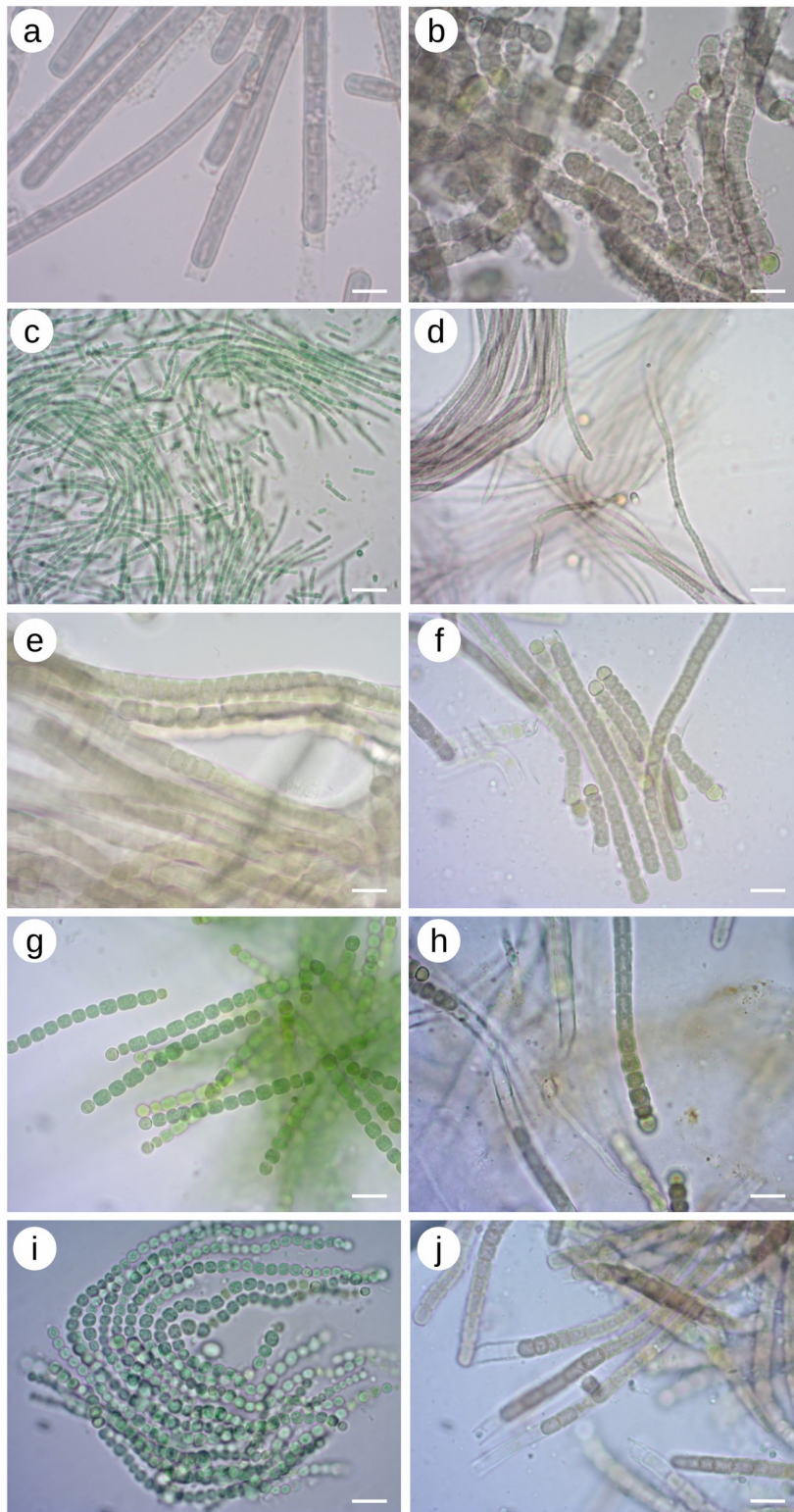


Figura 9 – Linhagens de cianobactérias isoladas a partir dos tratamentos C1 e C2. Em (a) Microcoleaceae, (b) *Calothrix* sensu lato/Cf. *Gloeotrichia* sp., (c) *Pseudanabaena* sp., (d) *Leptolynbya* sensu lato/Cf. *Alkalinema* sp., (e) *Cyanocohniella* sp., (f) *Calothrix* sensu lato sp1, (g) *Cronbergia* sp., (h)

Calothrix sp2., (i), *Nostoc sensu lato* sp1., (j) *Calothrix sensu lato* sp3. Microfotografias feitas sob objetiva de 100x. Barra de 250 μ m.

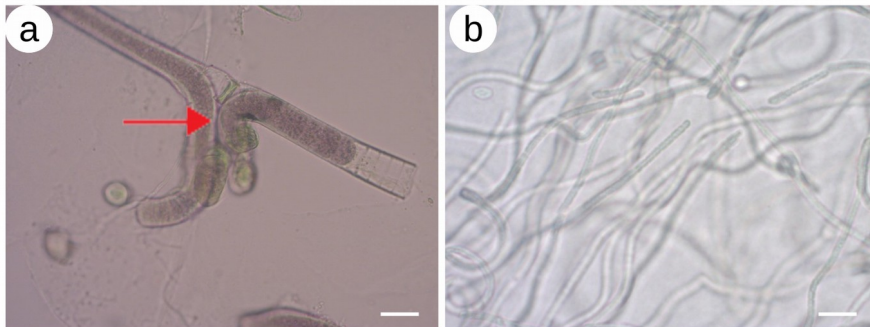


Figura 10 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir dos tratamentos N1 e N2. Em (a) *Scytonema* sp., ramificação falsa indicada pela seta vermelha; (b) *Leptolyngbya* sensu lato sp2. Microfotografias feitas sob objetiva de 100x. Barra de 250 μ m.

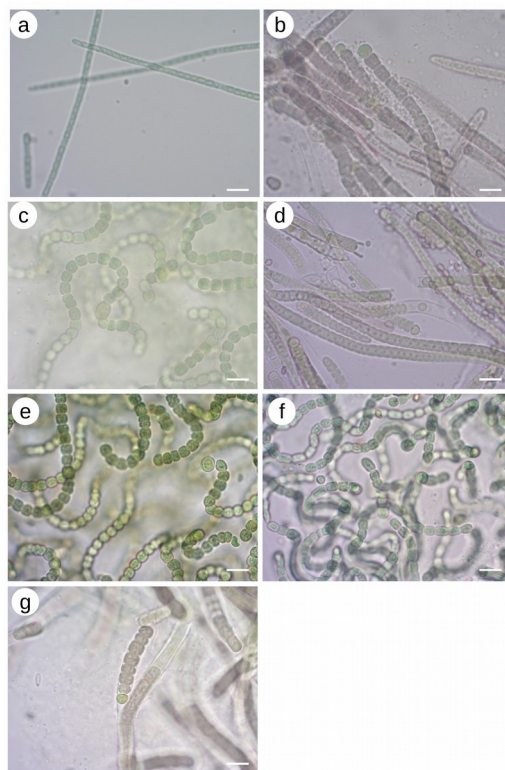


Figura 11 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir dos tratamentos Co1 e Co2. Em (a) *Pseudanabaena* sp2., (b) *Calothrix sensu lato* sp4., (c) *Nostoc sensu lato* sp2., (d) *Calothrix sensu lato* sp5., (e) *Nostoc sensu lato* sp3., (f) *Nostoc sensu lato* sp4., (g) *Tolypothrix* sp. Microfotografias feitas sob objetiva de 100x. Barra de 250 μ m.

Discussão

Nossos resultados mostraram que os tratamentos empregados afetaram a produção de estruturas adaptativas, em linhagens tanto homocitadas quanto heterocitadas de cianobactérias epifíticas à raízes da macrófita *P. stratiotes*. Encontramos que há preferência das linhagens filamentosas homocitadas por ambientes ricos em nitrogênio, independente da insolação. Como o crescimento populacional das cianobactérias está relacionado ao incremento de nutrientes no ambiente (ZINICOVSCAIA, 2016), podemos afirmar que o aumento das linhagens de cianobactérias homocitadas em tratamentos com incremento de nitrogênio tem relação com a nutrição. Uma vez que estas linhagens não diferenciam heterócitos, as células especializadas em fixar o N, elas se beneficiam de meios onde há maior disponibilidade deste nutriente, essencial para a formação de proteínas nas células (HERRERO; MURO-PASTOR; FLORES, 2001). Segundo Adamec, Naftan e Nadbal (2005) as linhagens de Oscillatoriaceae diferenciam células em necrídeos para produção de hormogônios. Possivelmente, o grande número de necrídeos em nosso experimento se deu pelo incremento nutricional que elevou a capacidade de crescimento dos tricomas homocitados, e estes, dependendo do estresse ambiental sofrido, iniciam um processo de morte de algumas células, o que por consequência gera hormogônios, responsáveis pelo aumento populacional (AGRAWAL; SINGH, 2002, ADAMEC; KAFTAN; NEDBAL, 2005, CAMPBELL; CHRISTMAN; MEEKS, 2008).

A produção de hormogônios foi maior nos tratamentos com acréscimo de carbono especialmente naqueles expostos ao sol. É provável que esta diferença se deva ao fato de que sob sol pleno a eficiência de aporte de carbono seja maior devido ao aumento das taxas fotossintéticas, tanto para a macrófita quanto para as cianobactérias. Neste tratamento, ocorreu também um grande número de heterócitos que aumentou a disponibilidade de nitrogênio no meio, enriquecendo-o nutricionalmente devido a um aumento na FBN. Esse enriquecimento nutricional favoreceu o investimento em reprodução, com o aumento no número de hormogônios. Quando analisamos apenas a variável luz, vemos que os tratamentos sombreados apresentam dados com números mais aproximados entre si, enquanto nos tratamentos sob sol, sem o sombrite, houve maior contraste entre os valores, os quais foram maiores. Nossos dados mostram que quando há sombreamento, a produção de hormogônios independe da nutrição do meio. Assim, podemos considerar duas hipóteses para explicar o comportamento observado. Na primeira delas, o número de hormogônios sofre um aumento diante do estresse ambiental causado pelo aumento de carbono no meio, levando as cianobactérias a investir em reprodução a fim de dispersar. Em uma segunda hipótese, o aumento de heterócitos, devido ao deslanço na taxa C/N, gerado pelo aumento nas concentrações de carbono,

pode gerar taxas mais altas de rompimento dos filamentos, o que também leva a um elevado número de hormogônios. Em ambos os casos, a resposta das cianobactérias demonstra sua capacidade de manutenção das populações em diferentes situações de incremento de nutrientes, sugerindo grande plasticidade morfológica (SERIZAWA et al, 2008; KOCH et al, 2017) e fisiológica (XIONG et al, 2017). Apesar da reprodução representar um custo biologicamente elevado, especialmente nos grupos que se reproduzem sexuadamente, nas cianobactérias este gasto é relativamente baixo, visto que em linhagens filamentosas a reprodução ocorre por particionamento do filamento, com formação dos hormogônios (WHITTON; POTTS, 2012; CASTENHOLZ, 2015).

Nossos resultados também mostram um número bastante elevado de heterócitos nos tratamentos sem adição de nitrogênio, e com acréscimo de carbono. A importância da razão C/N na FBN é bastante discutida na comunidade científica, e aponta que quanto menor o valor de nitrogênio em relação ao de carbono, maior será a fixação biológica, para compensar o desbalanço ocorrido (LATYSHEVA, 2012; ZHANG et al, 2018; FORCHHAMMER; SELIM, 2019). O número elevado de heterócitos nos tratamentos com pouco nitrogênio, e excesso de carbono demonstram a importância do equilíbrio (C/N) nas células das cianobactérias (HAVENS et al, 2003), uma vez que o investimento em heterócitos aumenta a FBN (RAI, 2002). Quando ocorre um desbalanço na razão entre C/N, há um estímulo em favor de modificações celulares neste grupo (LATYSHEVA, 2012), formando heterócitos. A produção desses heterócitos, então, é fortemente influenciada pela quantidade de carbono e nitrogênio disponível no ambiente. Assim, nos tratamentos onde havia excesso de carbono, a produção de heterócitos aumentou com a finalidade de compensar o desequilíbrio do sistema, por meio da FBN (ZHANG et al, 2018; FORCHHAMMER; SELIM, 2019).

Nossos resultados apontam também para uma substituição da predominância das linhagens na comunidade dependendo da abundância do nutriente disponível. Sabe-se que existe um aumento das populações de microorganismos quando há um desequilíbrio ambiental, as populações aquáticas explodem dependendo do aporte nutricional, com cianobactérias não é diferente (DUBEY et al, 2011; SINGH, 2016; ZINICOVSCAIA, 2016). Nos tratamentos onde houve acréscimo de nitrogênio, observamos a predominância de linhagens homocitadas (KLEMER; FEUILLADE; FEUILLADE, 1982), resultado semelhante foi observado por Nikulina (2003) no estuário de Neva, no golfo da Finlândia, com o aumento na disponibilidade de nitrogênio as populações de *Oscillatoria* se tornavam predominantes. Assim, foi proposto que as cianobactérias deste grupo apresentavam maior capacidade de assimilar a forma do nitrogênio dissolvido na água disponível localmente, com maiores taxas reprodutivas em comparação com outros grupos que compunham o

fitoplâncton. Outro trabalho que aponta a capacidade competitiva das *Oscillatoria* em ambientes ricos em nitrogênio foi realizado por Liu e colaboradores (2021) no lago Chagan no nordeste da China. O mesmo trabalho de Liu e colaboradores (2021) também aponta para uma maior efetividade reprodutiva de cianobactérias heterocitadas em ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio, o que corrobora nossos resultados onde nos tratamentos com carbono, a dominância foi de linhagens heterocitadas. Como discutido acima, na falta de nitrogênio, a formação de heterócitos é estimulada, e assim, linhagens heterocitadas acabam predominando nestes meios (CHAN et al, 2004; ZEHR, 2011).

Apesar das cianobactérias homocitadas realizarem a FBN, especialmente no escuro devido à falta de heterócitos (LATYSHEVA, 2012, ZHANG et al, 2018; FORCHHAMMER; SELIM, 2019), a presença dos mesmos nas linhagens heterocitadas garante maior eficiência na FBN, a qual é extremamente importante para a manutenção das populações de cianobactérias (CHAN et al, 2004; ZEHR, 2011), bem como para outros grupos associados a elas, e todo o ecossistema (RAVEN, 2002, SINGH, 2016). A FBN é de suma importância a todos os seres vivos, já que moléculas essenciais à vida tem em sua composição o nitrogênio, exemplos são os aminoácidos e bases nitrogenadas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Além disso, o sequestro de carbono atmosférico é dependente direto das moléculas de clorofila, também compostas por nitrogênio (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007, DAVIES-BARNARD; FRIEDLINGSTEIN, 2020). Esse nutriente é essencial à vida como a conhecemos, e os seres capazes de fixá-lo biologicamente são imprescindíveis aos ciclos biogeoquímicos, fazendo a transformação do nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis para os outros seres (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007, SINGH et al, 2016, DAVIES-BARNARD; FRIEDLINGSTEIN, 2020, SINGH et al, 2020).

Além disso, nossos resultados também mostram que o aumento na quantidade de nutrientes, como N e C, favorece a reprodução, por meio do aumento no número de hormogônios. Sabe-se que a eutrofização, tanto natural quanto artificial, pode levar à explosões de crescimento de populações de cianobactérias. Esse aumento exagerado nas concentrações de nutrientes na água, especialmente causado por um enriquecimento artificial, por rejeitos industriais e das cidades, pode levar à poluição aquática gerando grande desequilíbrio no ecossistema (DUBEY et al, 2011; SINGH et al, 2016; ZINICOVSCAIA, 2016). Estas situações tornam-se preocupantes uma vez que, somada à poluição, as mudanças climáticas podem alavancar as taxas de crescimento das populações de cianobactérias (PAERL; HUISMAN, 2008), sendo que algumas linhagens têm potencial tóxico (HUISMAN et al, 2018), podendo desencadear um efeito cascata de aumento no desequilíbrio ambiental (ZINICOVSCAIA, 2016). Como visto em nossos resultados, as cianobactérias apresentam grande plasticidade nas modificações celulares dependente das condições nutricionais do meio, o que

explica sua capacidade de crescer, proliferar e formar “blooms” em situações de enriquecimento nutricional do meio aquático, mesmo para aquelas linhagens preferencialmente epifíticas às macrófitas.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que houve maior abundância das populações de cianobactérias filamentosas homocitadas nos tratamentos com aporte de nitrogênio, demonstrando, assim, haver um favorecimento para o estabelecimento destes grupos em locais com excesso desse nutriente. Vimos também que no tratamento com acréscimo de carbono, e a pleno sol, houve maior formação de hormogônios. Nesses tratamentos a pleno sol a formação de hormogônios foi maior do que naqueles sombreados, demonstrando assim que a reprodução foi influenciada pela luminosidade e o nutriente ofertado, já que entre tratamentos sombreados não houve diferença significativa. O número expressivo de heterócitos nos tratamentos com incremento de carbono nos mostrou que o equilíbrio na razão entre C/N é crucial para esta modificação celular. Nossos resultados demonstram toda a adaptabilidade que as cianobactérias desenvolveram ao longo de sua história evolutiva para enfrentar situações adversas, transformando-se ou resistindo a elas.

REFERÊNCIAS

- ADAMEC, František; KAFTAN, David; NEDBAL, Ladislav. Stress-induced filament fragmentation of *Calothrix elenkinii* (cyanobacteria) is facilitated by death of high-fluorescence cells. **Journal of phycology**, v. 41, n. 4, p. 835-839, 2005.
- AGRAWAL, Aneil F. Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction. **Nature**, v. 411, n. 6838, p. 692-695, 2001.
- AGRAWAL, Satish. C.; SINGH, Vikas. Viability of dried filaments, survivability and reproduction under water stress, and survivability following heat and UV exposure in *Lyngbya martensiana*, *Oscillatoria agardhii*, *Nostoc calcicola*, *Hormidium fluitans*, *Spirogyra* sp. and *Vaucheria geminata*. **Folia microbiologica**, v. 47, n. 1, p. 61-67, 2002.
- AMAROUCHE-YALA, Samia et al. Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. **Extremophiles**, v. 18, n. 6, p. 1035-1047, 2014.
- ANBAR, Ariel D. et al. A whiff of oxygen before the great oxidation event?. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1903-1906, 2007.

BICUDO, Carlos E. M.; MENEZES, Mariângela. **Gêneros de algas de águas continentais: chave para identificação e descrições**. Livraria RiMa Editora, 2017.

BOIVIN, Nicole L. et al. Ecological consequences of human niche construction: Examining long-term anthropogenic shaping of global species distributions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 23, p. 6388-6396, 2016.

BUTTERFIELD, Nicholas J. Macroevolution and macroecology through deep time. **Palaeontology**, v. 50, n. 1, p. 41-55, 2007.

CAMPBELL, Elsie L.; CHRISTMAN, Harry; MEEKS, John C. DNA microarray comparisons of plant factor-and nitrogen deprivation-induced hormogonia reveal decision-making transcriptional regulation patterns in *Nostoc punctiforme*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 22, p. 7382-7391, 2008.

CASTENHOLZ, Richard W. General characteristics of the cyanobacteria. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-23, 2015.

CHAN, Francis et al. Bloom formation in heterocystic nitrogen-fixing cyanobacteria: The dependence on colony size and zooplankton grazing. **Limnology and oceanography**, v. 49, n. 6, p. 2171-2178, 2004.

COURCHAMP, Franck et al. Rarity value and species extinction: the anthropogenic Allee effect. **PLoS Biol**, v. 4, n. 12, p. e415, 2006.

DAVIES-BARNARD, Taraka; FRIEDLINGSTEIN, Pierre. The global distribution of biological nitrogen fixation in terrestrial natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 34, n. 3, p. e2019GB006387, 2020.

DEMOULIN, Catherine F. et al. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, p. 206-223, 2019.

DICK, Gregory J.; GRIM, Sharon L.; KLATT, Judith M. Controls on O₂ production in cyanobacterial mats and implications for Earth's oxygenation. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 46, p. 123-147, 2018.

DUBEY, Sanjay Kumar et al. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. **African journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1125-1132, 2011.

DVOŘÁK, Petr et al. Diversity of the cyanobacteria. In: **Modern topics in the phototrophic prokaryotes**. Springer, Cham, 2017. p. 3-46.

ETIÉGNI, Lazare; CAMPBELL, Alton. G. Physical and chemical characteristics of wood ash. **Bioresource technology**, v. 37, n. 2, p. 173-178, 1991.

FABIAN, Daniel; FLATT, Thomas. Life history evolution. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, 2012.

FORCHHAMMER, Karl; SELIM, Khaled A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 1, p. 33-53, 2020.

GENUÁRIO, Diego Bonaldo; SANT'ANNA, Celia Leite; MELO, Itamar Soares. Elucidating the Cronbergia (Cyanobacteria) dilemma with the description of Cronbergia amazonensis sp. nov. isolated from Solimões river (Amazonia, Brazil). **Algal research**, v. 29, p. 233-241, 2018.

HAVENS, Karl E. et al. N: P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. **Environmental pollution**, v. 122, n. 3, p. 379-390, 2003.

HERRERO, Antonia; MURO-PASTOR, Alicia M.; FLORES, Enrique. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 411-425, 2001.

HOLLAND, Heinrich D. The oxygenation of the atmosphere and oceans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1470, p. 903-915, 2006.

HU, Chunxiang; GAO, Kunshan; WHITTON, Brian A. Semi-arid regions and deserts. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 345-369.

HUISMAN, Jef et al. Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 471-483, 2018.

KAPLAN-LEVY, Ruth N. et al. Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. **Dormancy and resistance in harsh environments**, p. 5-27, 2010.

KIMURA, Hiroto; WATANABE, Yoshio. Oceanic anoxia at the Precambrian-Cambrian boundary. **Geology**, v. 29, n. 11, p. 995-998, 2001.

KLEMER, Andrew R.; FEUILLADE, Jacques; FEUILLADE, Mauricette. Cyanobacterial blooms: carbon and nitrogen limitation have opposite effects on the buoyancy of Oscillatoria. **Science**, v. 215, n. 4540, p. 1629-1631, 1982.

KNOLL, Andrew H. Cyanobacteria and earth history. **The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution**, v. 484, 2008.

KOCH, Robin et al. Plasticity first: molecular signatures of a complex morphological trait in filamentous cyanobacteria. **BMC evolutionary biology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2017.

KOMÁREK, Jiří; ZAPOMELOVA, Eliska; HINDAK, Frantisek. Cronbergia gen. nov., a new cyanobacterial genus (Cyanophyta) with a special strategy of heterocyte formation. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, n. 3, p. 321-341, 2010.

KOMÁREK, Jiří et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295-335, 2014.

KOMÁREK, Jiří; JOHANSEN, Jeffrey R. Filamentous cyanobacteria. In: **Freshwater Algae of North America**. Academic Press, 2015. p. 135-235.

KUMP, Lee R. The rise of atmospheric oxygen. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 277-278, 2008.

LALLANA, Victor H. Aspectos reproductivos del repolito de agua (*Pistia stratiotes* L.) en ambientes leníticos del río Paraná medio. **Iheringia**, v. 39, p. 37-54, 1989.

LANDE, Russell. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. **Population Ecology**, v. 40, n. 3, p. 259-269, 1998.

LATYSHEVA, Natasha et al. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Bioinformatics**, v. 28, n. 5, p. 603-606, 2012.

LIU, Xuemei et al. Spatiotemporal dynamics of succession and growth limitation of phytoplankton for nutrients and light in a large shallow lake. **Water Research**, v. 194, p. 116910, 2021.

LYONS, Timothy W.; REINHARD, Christopher T.; PLANAVSKY, Noah J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 307-315, 2014.

MEZ, Konstanze; HANSELMANN, Kurt; PREISIG, Hans Rudolf. Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. **Hydrobiologia**, v. 368, n. 1, p. 1-15, 1998.

NIKULINA, Vera N. Seasonal dynamics of phytoplankton in the inner Neva Estuary in the 1980s and 1990s. **Oceanologia**, v. 45, n. 1, 2003.

OHNO, Susumu. The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. **Journal of molecular evolution**, v. 44, n. 1, p. S23-S27, 1997.

OLIVER, Roderick L. et al. Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 155-194.

OSTRANDER, Chadlin M. et al. Fully oxygenated water columns over continental shelves before the Great Oxidation Event. **Nature geoscience**, v. 12, n. 3, p. 186-191, 2019.

PAERL, Hans W.; HUISMAN, Jef. Blooms like it hot. **Science**, v. 320, n. 5872, p. 57-58, 2008.

PLANAVSKY, Noah J. et al. Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. **Nature Geoscience**, v. 7, n. 4, p. 283-286, 2014.

QUESADA, Antonio; VINCENT, Warwick F. Cyanobacteria in the cryosphere: snow, ice and extreme cold. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 387-399.

RAI, A. K.; PANDEY, G. P. Influence of environmental stress on the germination of *Anabaena vaginicola* akinetes. **Annals of Botany**, v. 48, n. 3, p. 361-370, 1981.

RAI, A. N. Cyanolichens: nitrogen metabolism. In: **Cyanobacteria in symbiosis**. Springer, Dordrecht, 2002. p. 97-115.

RAVEN, John A. Evolution of cyanobacterial symbioses. In: **Cyanobacteria in symbiosis**. Springer, Dordrecht, 2002. p. 329-346.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. Biología vegetal. In: **Biología vegetal**. 2007. p. 830-830.

SCHIRRMESTER, Bettina E.; GUGGER, Muriel; DONOGHUE, Philip CJ. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. **Palaeontology**, v. 58, n. 5, p. 769-785, 2015.

SCHIRRMESTER, Bettina E.; SANCHEZ-BARACALDO, Patricia; WACEY, David. Cyanobacterial evolution during the Precambrian. **International Journal of Astrobiology**, v. 15, n. 3, p. 187-204, 2016.

SCULTHORPE, Cyril Duncan. **Biology of aquatic vascular plants**. 1967. London. 610p.

SERIZAWA, Hiroshi et al. Mathematical modeling of colony formation in algal blooms: phenotypic plasticity in cyanobacteria. **Ecological research**, v. 23, n. 5, p. 841-850, 2008.

SINGH, Jay Shankar et al. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 529, 2016.

SINGH, Prashant Kumar et al. (Ed.). **Advances in Cyanobacterial Biology**. Academic Press, 2020.

SOUSA, Wayne P. Disturbance in marine intertidal boulder fields: the nonequilibrium maintenance of species diversity. **Ecology**, v. 60, n. 6, p. 1225-1239, 1979.

SUKENIK, Assaf; RÜCKER, Jacqueline; MALDENER, Iris. Dormant cells (Akinetes) of filamentous cyanobacteria demonstrate a great variability in morphology, physiology, and ecological function. In: **Cyanobacteria**. Academic Press, 2019. p. 65-77.

VALVERDE, Angel et al. Cyanobacteria drive community composition and functionality in rock–soil interface communities. **Molecular ecology**, v. 24, n. 4, p. 812-821, 2015.

VINCENT, Warwick F.; QUESADA, Antonio. Cyanobacteria in high latitude lakes, rivers and seas. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 371-385.

WARD, David M.; CASTENHOLZ, Richard W.; MILLER, Scott R. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 39-63.

WHITTON, Brian A.; POTTS, Malcolm. Introduction to the cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 1-13.

XIONG, Wei et al. The plasticity of cyanobacterial carbon metabolism. **Current opinion in chemical biology**, v. 41, p. 12-19, 2017.

YOUNG, Grant M. Precambrian supercontinents, glaciations, atmospheric oxygenation, metazoan evolution and an impact that may have changed the second half of Earth history. **Geoscience Frontiers**, v. 4, n. 3, p. 247-261, 2013.

ZEHR, Jonathan P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 162-173, 2011.

ZIEGLER, Susy Svatek. The Anthropocene in geography. **Geographical Review**, v. 109, n. 2, p. 271-280, 2019.

ZINICOVSCAIA, Inga. Water quality: A major global problem. In: **Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters**. Springer, Cham, 2016. p. 5-16.

ZHANG, Cheng-Cai et al. Carbon/nitrogen metabolic balance: lessons from cyanobacteria. **Trends in plant science**, v. 23, n. 12, p. 1116-1130, 2018.

ARTIGO 2 - Vegetative and reproductive allocation in an aquatic macrophyte: the effects of light, nutrients and epiphytic heterocytous cyanobacteria.

Artigo submetido à Aquatic Ecology

Author information:

Michel Biondi

Universidade Federal de Lavras, Pós-graduação em Botânica Aplicada, Lavras, Minas Gerais, Brazil

0000-0002-0848-325X

Larissa Langdorff PIMENTA

Universidade Federal de Lavras, Pós-graduação em Botânica Aplicada, Lavras, Minas Gerais, Brazil

0000-0003-3132-0376

Gustavo Pereira Lima

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras, Minas Gerais, Brazil

0000-0002-7208-267X

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

0000-0003-1624-8281

Flávia de Freitas Coelho

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras, Minas Gerais, Brazil

0000-0001-9338-8128

Author for correspondence: E-mail: michel.biologicas@gmail.com

Acknowledgments

The authors are grateful to Antônio Galvão do Nascimento, for his support and guidance in the early stages of cyanobacteria studies; to Guilherme Ramos Demetrio Ferreria for their valuable comments on an earlier version of the manuscript; to Jean Marcel Sousa Lira for assistance with statistical analysis and to the Plant Anatomy Laboratory and the to professors Whasley Ferreira Duarte and Victor Satler Pylro of the Federal University of Lavras, for providing the required research equipment and material. This study was developed during the M. Sc. program of the first author. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001

Abstract

Pistia stratiotes is a clonal plant with aggressive vegetative growth and large capacity for seed bank formation. In addition, filamentous heterocytous cyanobacteria can be found associated with the roots of this macrophyte. Based on these data, we aimed to assess the vegetative growth and reproductive strategies adopted by *P. stratiotes* when subjected to different nutritional conditions and light availability. We conducted an experiment by subjecting plants to a carbon (C), nitrogen (N) addition and 70% shading. The clonal growth occurred in the treatments with the addition of N, whereas the investment in flowers was greater in the treatments with C addition. The amount of nitrogen assimilated by the plants was higher in the treatments with C addition and under shading. A positive correlation between N assimilation by *P. stratiotes* and the number of heterocytes produced by cyanobacterial strains was also observed in the treatment with C supplementation under 100% natural light. In conclusion, our results demonstrate the importance of N and C availability for the development and reproduction of *P. stratiotes*. More important, these results also indicate that excessive amounts of nutrients can lead to problems in controlling *P. stratiotes* populations. In addition, the periphytic complex formed by *P. stratiotes*-and heterocytous cyanobacteria may favor an increasing in *P. stratiotes* population due to an increased N availability in the environment. However, further studied on this association are necessary to access the real contribution of N-fixing cyanocateria.

Keywords: Carbon; Clonal growth; Biological nitrogen fixation; Nitrogen; *Pistia stratiotes*; Sexual reproduction.

Declarations

Funding

Not applicable

Conflicts of interest/Competing interests

Not applicable

Availability of data and material (data transparency)

All of our data will be made available for consultation, if required

INTRODUCTION

Macrophytes comprise an artificial group including lineages without a common ancestor, that share a similar ecological function. In this case, macrophytes include floating or non-aquatic plants (Bornette; Puijalon, 2011). In an aquatic environment, the role of macrophytes goes beyond primary energy production, as many are used as shelters for fauna and periphyton and are also involved in the control of biochemical cycles (Lallana, 1989, Lemon; Posluszny 2000, Coelho et al., 2005, Muniappan et al., 2009). In addition, macrophytes act as filters by removing pollutants and sediment particles and assist in the control of water flow, thus playing several key roles in aquatic ecosystems (Bornette; Puijalon, 2011).

The discharge of untreated effluent generates an imbalance that can lead to increases in nutrients, which in turn can cause population explosions of some species, generating environmental, social and economic losses (Fonjong; Fokum, 2017; Vallès-Casas; March; Saurí, 2017; Subramanian, 2018). One organisms that stands out following imbalance on nutrient supply in aquatic environment is the water lettuce (*Pistia stratiotes* L., Araceae). This species is an aquatic angiosperm with a cosmopolitan distribution that has been used as a model organism for studies on bioremediation (Odjegba; Fasidi, 2004, Zimmels et al., 2006, Mishima et al., 2008, Lu et al., 2010) as well as potential for the production of biofuels (Pantawong et al., 2015, Gusain and Suthar, 2017, Kumar et al., 2017). These plants show vigorous clonal growth when nutrients are available and can form dense mats of floating plants under conditions of excess of nutrients (LALLANA, 1989, Lemon; Posluszny 2000, Coelho et al., 2005), causing problems in hydroelectric reservoirs. *P. stratiotes* also reproduces sexually and can produce up to six seeds per flower, with the capacity to form extremely resistant seed banks, with a density of 4,000 seeds per square meters (Muniappan et al., 2009).

In addition, in the roots of this macrophyte, mainly in those material sampled for this study, several filamentous heterocytous cyanobacterial strains, that live epiphytically, were observed. These

strains have great potential for nitrogen (N) fixation due to the presence of heterocytes (Adams; Duggan, 2003) and are able to grow under low light conditions due to their accessory pigments, known as phycobilins (Krupek et al., 2007). As consequence, cyanobacteria can grow attached to macrophyte roots, forming a macrophyte-periphyton complex. Most of the periphytic freshwater communities are formed by cyanobacteria, most likely because of this adaptation to shading (Lindstrøm et al., 2004; Pentecost and Whitton 2012).

Thus, in this study, in addition to expanding our knowledge about plastic responses in the growth and reproduction of *P. stratiotes* considering the nutrient supply and light availability, we investigated whether there was a relationship between plant growth and the fixed N, presumably supplied by the epiphytic cyanobacterial strains on its roots. Based on the assumption that light availability (Medeiros et al., 2019) and increased nutrient availability are directly related to the performance of free-floating aquatic macrophytes (Zhang et al., 2020), we tested the following hypotheses: 1) *P. stratiotes* rosettes subjected to an increase in N concentration and under 100% natural light in the greenhouse (full sun - without a protective net to provide artificial shading) will have greater vegetative growth and invest more in clonal growth; 2) rosettes under full sun (without a protective net to provide artificial shading) and with carbon (C) addition, which was provided using ashes, will invest in sexual reproduction; 3) rosettes subjected to C addition and under 100% natural light in the greenhouse will promote a greater production of heterocytes by the epiphytic filamentous heterocytous cyanobacterial strains attached to their roots; and 4) the increase in the number of heterocytes will lead to an increase in the N available in the environment, increasing the N accumulated by the plants.

DEVELOPMENT

Materials and methods

Study system: *Pistia stratiotes* and epiphytic cyanobacteria

Pistia stratiotes, known as water lettuce, is a free-floating aquatic macrophyte with a wide distribution in tropical and subtropical regions (Pott and Pott, 2000). It is a clonal plant, and therefore, it introduces new genetic individuals (genets) into the population through sexual reproduction and produces genetically identical clones (ramets), which are physiologically independent of the mother plant, through vegetative propagation (Harper, 1977). Showing aggressive vegetative growth, this species spreads over the surface of an aquatic environment through its stolons and new rosettes, which can be ramets if originated vegetatively or genets if originated from seeds (Lallana, 1989). Thus, these rosettes form large mats that become an important source of nutrients and shelter for fauna. The microclimate created by the expansion of the coverage area also provides a favorable environment for the establishment of colonies of epiphytic microorganisms living on their roots (Bornette; Puijalón, 2011).

Among the aquatic microorganisms that can be associated with *P. stratiotes*, including epiphytically, we highlight cyanobacteria, which in addition to being photosynthetic, have some members able to fix atmospheric N and make it available in assimilable forms for other organisms. Therefore, although we had found several filamentous homocytous strains forming the periphyton, we selected filamentous heterocyte-forming groups to monitor and to quantify the modified cells responsible for N fixation, *i.e.*, heterocytes (Adams; Duggan, 2003).

This association between microorganisms and macrophytes is known as the periphyton-macrophyte complex and is described as an ecological unit in aquatic ecosystems (Camargo; Ferragut, 2014; Goldsborough; McDougal; North, 2005), providing an important source of knowledge that can be exploited in natural aquatic systems. An abundant occurrence of filamentous heterocytous cyanobacteria may be indicative of low levels of N in the environment (Saha et al.,

2007), and the periphyton formed by these heterocyte-forming strains could act as an important source of N in this type of environment.

Greenhouse experiment

Rosettes of *P. stratiotes* were collected from the reservoir of the “Engenheiro José Mendes Júnior” hydroelectric plant in south-eastern Brazil (21°8'36.45"S, 45°2'11.12"W). After collection, the plants were taken to a greenhouse, washed for the removal of soil particles and dead parts, and acclimated for 7 days before the experiment, which consisted of six treatments. A total of 24 plastic trays (capacity of 3 liters) was prepared, with a rosette of similar size and appearance in each one of them. The treatments to which the plants were subjected were as follows: C1: C addition by applying 2.2 g/L coal ash in a 5% Hoagland nutrient solution and 70% of shading, which was obtained with the use of a shade cloth. Hoagland nutrient solution with 5% ionic strength was selected as it was the minimum value obtained in tests at which *P. stratiotes* individuals were able to withstand the duration of the experiment; C2: C addition by applying 2.2 g/L ash in a 5% Hoagland nutrient solution and with 100% natural light in the greenhouse; N1: N addition by using 50% Hoagland nutrient solution, and 70% of shading; N2: N addition by using 50% Hoagland nutrient solution, with 100% natural light in the greenhouse; Co1: addition of 5% Hoagland solution, and 70% of shading; and Co2: addition of 5% Hoagland solution and 100% of natural light in the greenhouse (Figure 1). The use of coal ash in C1 and C2 was due to the high levels of carbonates in the ash constitution (Etiégni and Campbell, 1991), which can lead to an imbalance in the C/N ratio, thus stimulating the differentiation of N-fixing cells, *i.e.*, the heterocytes of filamentous heterocytous cyanobacteria.

	Shade				Sun			
Carbon	C1	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C2
Nitrogen	N1	N1	N1	N1	N2	N2	N2	N2
Control	Co1	Co1	Co1	Co1	Co2	Co2	Co2	Co2

Figure 1. Experimental design of the treatments to which *P. stratiotes* was subject. C1 and C2 are composed of 5% Hoagland solution supplemented with 2.2 g/L of ash (C source), in the shade and in the sun, respectively; N1 and N2 contain 50% Hoagland solution in the shade and in the sun, respectively; Co1 and Co2 were the controls, with the addition of 5% Hoagland solution, used only for plant maintenance, in the shade and in the sun, respectively.

The experiments were carried out in greenhouse for 60 days and the collections were performed every 15 days, totalizing four collections. At each sampling point, data on vegetative growth (number of new rosettes, clonal investment, stolon length) and on sexual reproduction (number of flowers) were obtained. After counting, the structures were placed in an oven at 50°C for 72 hours to obtain the dry biomass of each structure separately. At the end of the 60 days, the diameters of three rosettes from each replicate were measured. In addition, we dried the final biomass and quantified the N accumulated by the macrophyte through leaf analysis. At each collection, root squashes of the macrophytes were also obtained to prepare slides for observing the epiphytic cyanobacteria and counting the heterocytes. Each sample was composed of small root fragments and the liquid obtained from the squashes; the samples were then homogenized and placed in 3.5-mL Eppendorf® tubes containing Transeau fixative solution. From each Eppendorf® tube, which corresponded to a collection, six slides were prepared (96 Eppendorf® × 6 slides, totalizing 576 slides observed) using two drops of the homogenized liquid sample. After preparation, the slides were observed once following a “zigzag” pattern, similar to the Neubauer

chamber, and the total number of heterocytes per slide was carefully counted. For visualization and counting, a 100x objective was used with an optical microscope (Nikon Binocular Microscope E100 LED).

Treatments –Co1 and Co2 were used to analyze the effect of heterocytes on nitrogen assimilation by macrophytes. Co1 corresponded to 5% Hoagland solution and 70% shading, and Co2 corresponded to 5% Hoagland solution and 100% natural light (Figure 1).

Data analysis

We investigated the relationship between the nutrient supply and light incidence on allocation to vegetative and reproductive structures using the nonparametric Kruskal-Wallis (KW) test, in which the categorical predictor variables (factor) were the nutrient supply and light incidence. The vegetative response variables were the stolon growth, number of new rosettes, vegetative biomass and diameter of the rosettes. The reproductive response variables were the flower biomass and number of flowers. After the KW test, we performed a stepwise-step-down test to assess the relationships between the variables for ranking purposes. We used IBM SPSS statistics[®] software version 22. To test the predicted increase in available N for the macrophyte and the number of heterocytes, we used a Spearman correlation test.

Results

With the exception of stolon length (KW = 7.169; $p = 0.067$), all other measured vegetative attributes were influenced by the treatments (Figure 2). The dry biomass (vegetative biomass) was highest in treatment N2 (Figure 2b), with N addition under 100% natural light (KW = 8.135; $p = 0.036$). Clonal growth, measured by the increase in the number of rosettes, was also highest in the

N2 treatment (KW = 11.073; $p = 0.011$) (Figure 2c). In the N2 treatment, the diameter of the rosettes was also largest (KW = 8.559; $p = 0.036$) (Figure 2d).

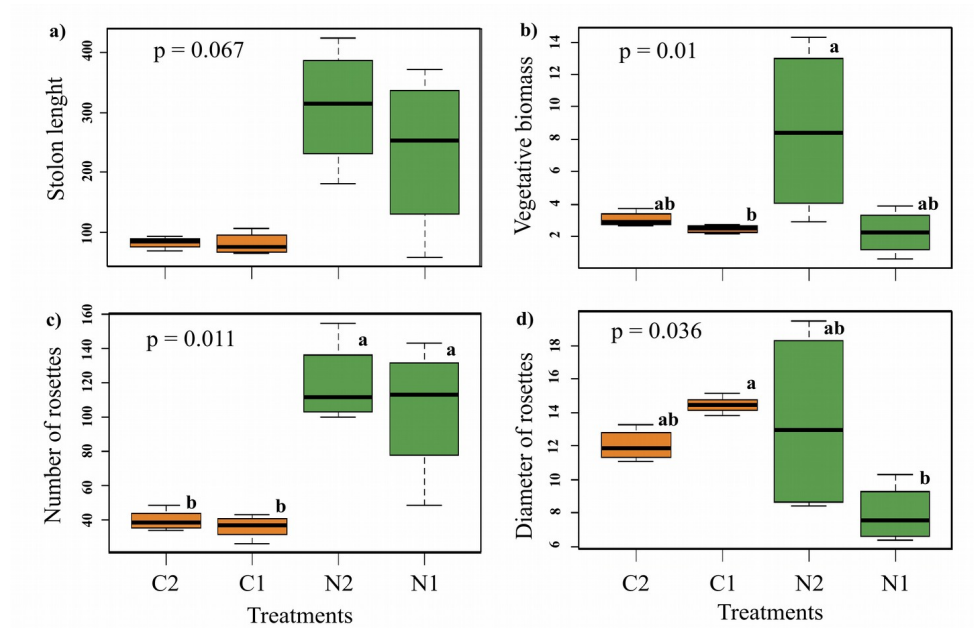


Figure 2. Vegetative attributes of *P. stratiotes* as a function of the treatments: orange treatments had carbon addition and green treatments had nitrogen addition. (a) Stolon length, (b) vegetative biomass, (c) number of new rosettes and (d) diameter of the rosettes.

The rosettes produced a greater number of flowers (KW 12.199; $p = 0.007$), and these had higher biomass (KW = 11.379; $p = 0.010$) in the treatments with an increased C content (Figure 3a). The largest biomass (reproductive biomass) was related to the treatment with ash and shading (C1), followed by the treatment with C addition and 100% natural light (C2, Figure 3b). The total N assimilated by the macrophytes was highest in the treatment with increased C and shading (C1) (with values between 18.01 and 24.41 g/kg) (Figure 4), and a higher number of heterocytes (with values between 17,718 and 24,002) was found in the treatment with C addition and 100% natural light (C2) (Figure 4). N assimilation by aquatic plants was positively correlated with the number of heterocytes ($r = 0.511$; $p = 0.04$) (Figure 4).

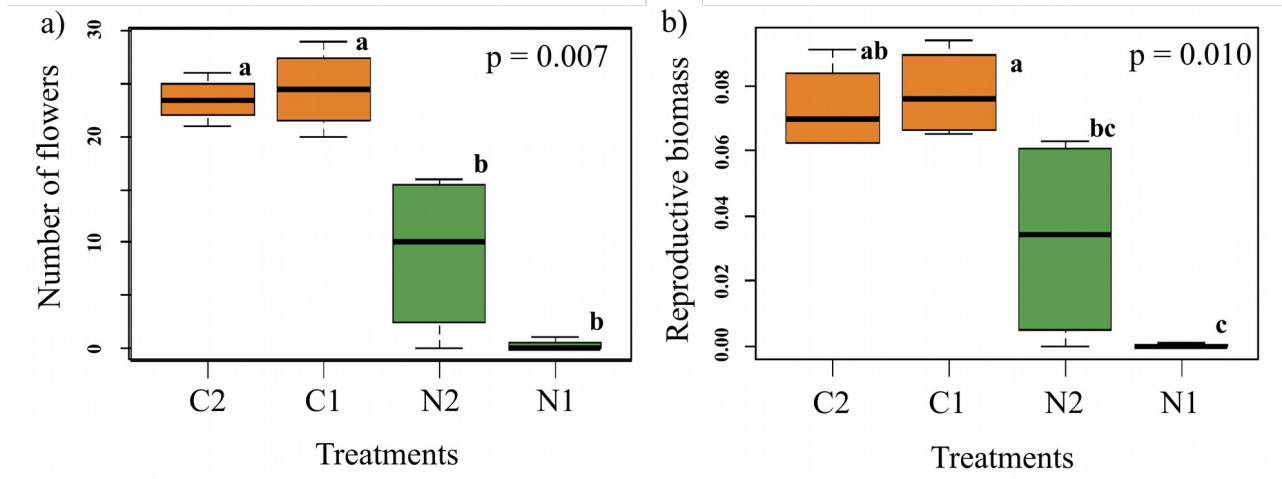


Figure 3. Number of flowers according to the treatments: orange show carbon addition and green show nitrogen addition; and (b) relationship between reproductive biomass and treatment.

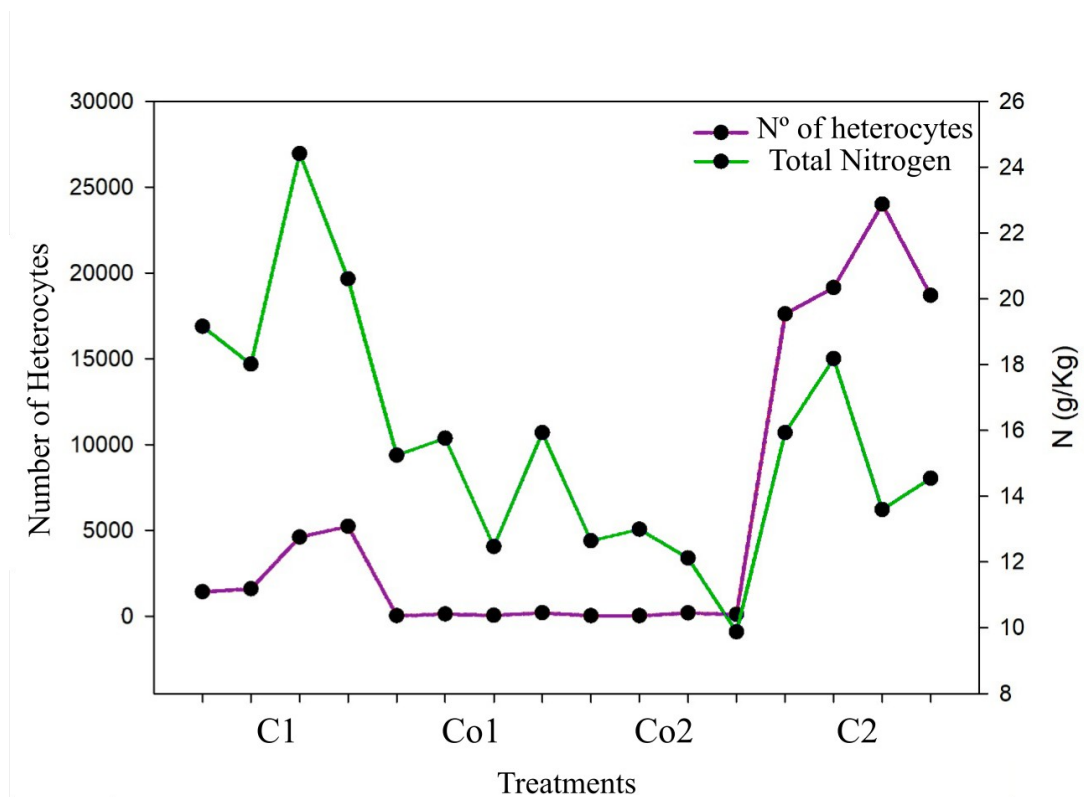


Figure 4. Total nitrogen assimilated [N (g/kg)] by *P. stratiotes* rosettes in the carbon (C1 and C2) and control (Co1 and Co2) treatments as a function of the number of heterocytes.

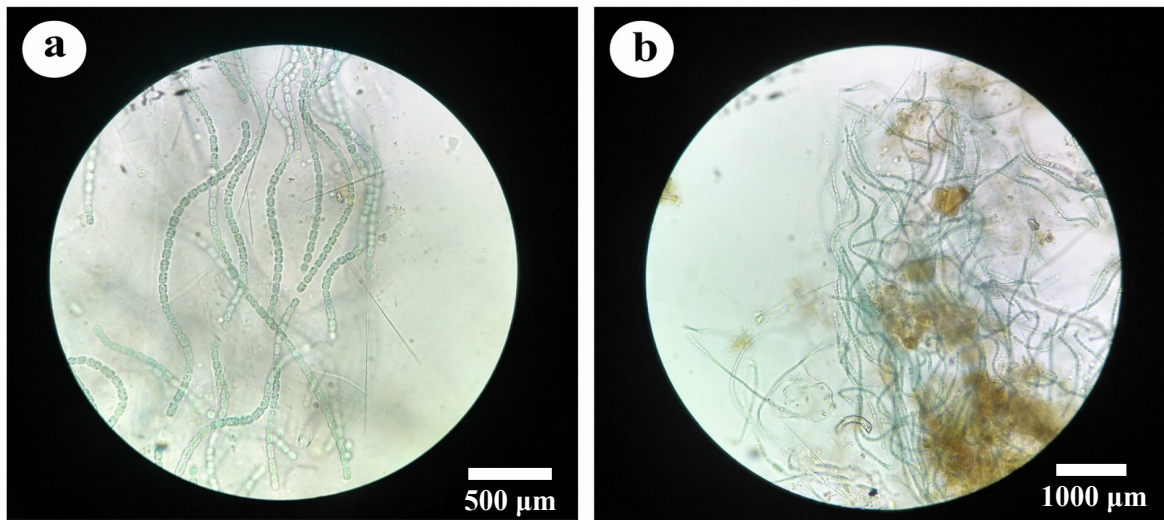


Figure 5. Filamentous cyanobacteria observed in the control treatments. In (a) with a 40x objective and in (b) with a 10x objective. Heterocytes were not found in either.

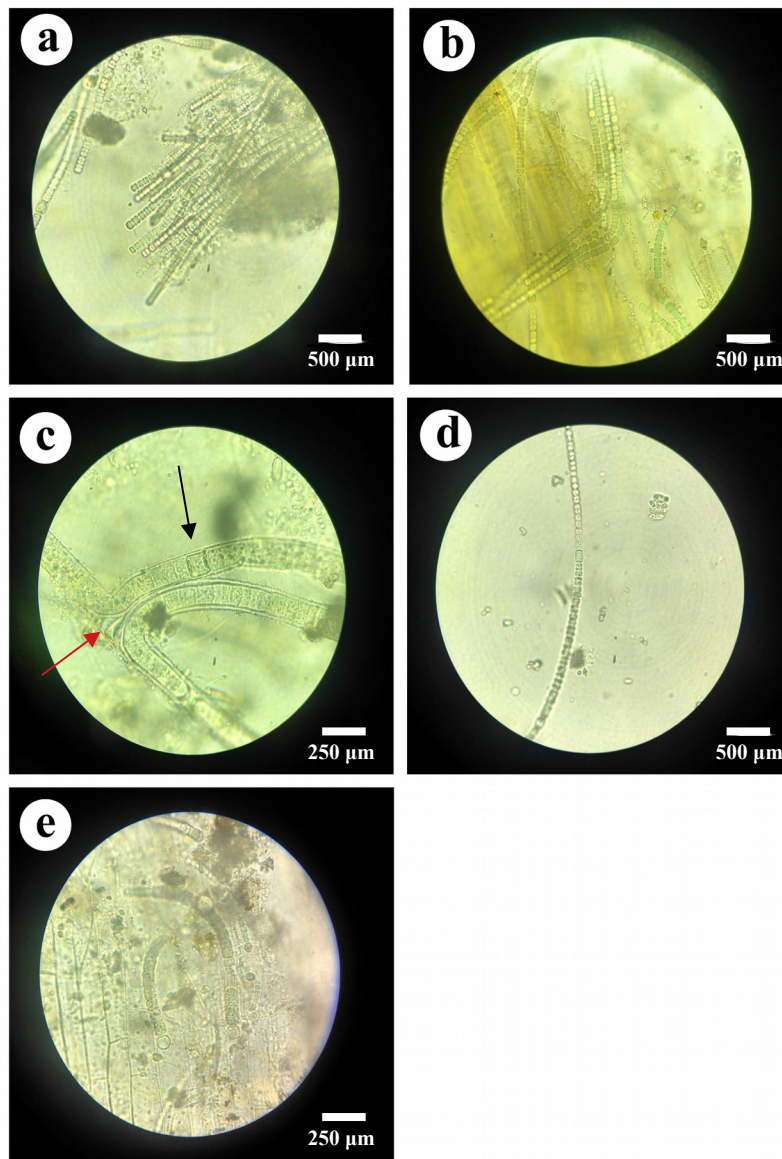


Figure 6. Filamentous heterocytous cyanobacteria in the treatments with carbon supplementation. In (a) and (b), we used a 10x objective and observed filaments with cells differentiated into heterocytes. In (c), we used a 100x objective and observed false branching (red arrow) and heterocytes (black arrow) in a morphotype resembling *Scytonema*. In (d) and (e), also using a 100x objective, we observed other morphotypes that make up cyanobacterial periphyton adhered to the macrophyte roots.

Discussion

One of the life history strategies used by plants is variation in the patterns of biomass allocation for the purpose of adapting to environmental variation (Cheplick, 2020), *e.g.*, variation in light and nutrient levels (Si et al., 2020). Our results showed that *P. stratiotes* invests in clonal growth by increasing the length of stolons and increasing the number of rosettes in treatments with higher N availability, regardless of light or shade, and exhibits higher biomass. Aquatic clonal plants can optimize resource capture for stolons depending on light or nutrients. For the aquatic fern *Salvinia natans*, stolons were longer in places/treatments with greater light availability (Si et al., 2020). However, the increase in N availability seems to favor clonal growth in both aquatic (Zhang et al., 2020) and terrestrial (Zheng, Bai and Zhang 2019) species.

The investment in inflorescence production responds to the increase in C, which seems to be related to phenological aspects of angiosperms (Xie et al., 2019). In addition, C nanoparticles, when absorbed by the plant, can accumulate in plant tissues, inducing early flowering in *Arabidopsis thaliana* (Kumar et al., 2018). Our results showed a greater number of flowers and a higher biomass of these flowers in the treatments with C addition through the use of ashes, regardless of the level of light availability. Under increased C, regardless of light, the rosettes invested more in flowers than that observed in the treatments with increased N.

The supply of C in the sunny environment promoted an increase in the number of heterocytes in cyanobacterial morphotypes adhered to the roots of *P. stratiotes*. This result can be likely explained by an increased photosynthetic rate and efficiency caused by the C input and the amount of available light. Thus, with more energy available in the environment, the production of heterocytes is favored, since the production of heterocytes and biological N fixation are processes that require much energy, considering that approximately 15-16 molecules of ATP are spent per N₂ molecule fixed (Raymond et al., 2004). In addition, there was no N addition in this medium, and the lack of the element was a primordial condition for the production of heterocytes, which would be

inhibited by the presence of an usable N source, such as NH_4^+ or NO_3^- , even at very low concentrations (Meeks et al., 1983, 2002).

Cell differentiation in filamentous heterocytous cyanobacteria was expected with the addition of ash, since the large amount of carbonates would cause an imbalance in the C/N ratio. When this relationship is somehow altered and there is more C than N, heterocytes are formed (Forchhammer and Selim, 2019; Zhang et al., 2018; Latysheva, 2012). Heterocytes promote an increase in N through biological fixation, which increases proportionally with the investment in heterocytes (RAI, 2002). The differentiation of the vegetative cell into a cell specialized in N fixation generates a very high energy cost for cyanobacteria, requiring the production of photoassimilates that guarantee sufficient energy for cell differentiation (Forchhammer and Selim, 2019; Zhang et al., 2018; Latysheva, 2012).

However, even though the addition of C in the sun treatment led to the highest number of heterocytes, the highest content of assimilated N was found in the shaded treatment. According to Ohlendieck, Stuhr and Siegmund (2000), N fixed by cyanobacteria is released in smaller amounts during the development of heterocytes. When they are fully formed, they only release fixed N through cell lysis; at that point, large amounts of N compounds are released into the medium. It is likely that in the treatment with C and sunlight, the cyanobacteria produced many more photoassimilates, which provided them a greater capacity to produce more resistant cells, thus being able to contain the fixed N for a longer period. In the shaded treatment, the photosynthetic rate tended to be lower, which led to the production of more fragile cells that could undergo lysis more quickly, thus releasing more N in the medium, which was assimilated by the macrophytes in our experiment.

In conclusion, our results demonstrate the importance of N and C availability for the development and reproduction of *P. stratiotes*, with vegetative reproduction being stimulated to a greater extent by N addition and sexual reproduction being stimulated by C addition. These results

also indicate that excessive amounts of these nutrients generate increasingly serious problems for the control of *P. stratiotes* populations, with increased N leading to clonal growth of the population and increased C leading to sexual reproduction. Furthermore, these macrophytes can form a seed bank that is resistant to weather conditions. The aggressive population growth of this macrophyte tends to be higher when an aquatic environment is in disequilibrium, with excess nutrients. This greater population growth may be derived from the N supply from human activities and from N-fixing cyanobacteria. This population growth can cause several ecological problems and a decrease in the diversity of aquatic plants at the site because it can allow the species to become dominant or can even allow other free-floating species that are more competitive to become dominant (Bornette and Puijalón, 2011). Additionally, this population growth can cause economic problems given that *P. stratiotes* populations are very common in lentic environments, whether natural or artificial (Khabbach; Libiad; Ennabili, 2019). In hydroelectric reservoirs, the increase in *P. stratiotes* populations can cause damage to energy production, causing disturbances in human or cargo transport (Chapman et al., 2017). Because the periphyton formed by the “*P. stratiotes*-heterocytous cyanobacteria” complex may favor the increase in the *P. stratiotes* population due to the increase in N availability in the medium via fixation performed in the heterocytes, this association should be studied more thoroughly. Our work suggests that the epiphytism favors the plant by increasing not only its clonal growth but also the individual size of its rosettes, allowing survival in environments with ecological conditions that are unfavorable to sexual reproduction and seedling germination. However, it can cause serious problems for the water body where it occurs, especially if it is receiving N from other external sources, leading to the formation of crowded mats. Thus, we reinforce that more detailed studies on the epiphytic association of *P. stratiotes*-heterocytous cyanobacteria should be performed to better understand its strength and its effect on populations of *P. stratiotes* and other free-floating aquatic macrophytes.

REFERENCE LIST

Adams DG; Duggan PS (2003) Tansley Review No. 107. heterocyte and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist*, v. 144, n. 1, p. 3-33, <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00505.x>

Bornette G and Puijalón S. (2011). Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquatic Sciences*, 73(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00027-010-0162-7>

Camargo VM and Ferragut C (2014). Estrutura da comunidade de algas perifíticas em *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult (Cyperaceae) em reservatório tropical raso, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea*, 41(1), 31-40. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062014000100003>.

Chapman D, Coetzee J, HILL M, Hussner A, Netherland M, Pescott O et al. (2017). *Pistia stratiotes* L. EPPO Bulletin, 47(3), 537-54 <https://doi.org/10.1111/epp.12429>

Cheplick GP. 2020. Life-history variation in a native perennial grass (*Tridens flavus*): reproductive allocation, biomass partitioning, and allometry. *Plant Ecol* . 221:103–115
<https://doi.org/10.1007/s11258-019-00996-z>

Coelho FF, Lopes FS and Sperber CF (2005). Persistence strategy of *Salvinia auriculata* Aublet in temporary ponds of Southern Pantanal, Brazil. *Aquatic Botany*, 81(4), 343-352.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.02.001>

Etiégni L and Campbell AG (1991). Physical and chemical characteristics of wood ash. *Bioresource Technology*, 37(2), 173–178. doi:10.1016/0960-8524(91)90207-z [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90207-Z](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90207-Z)

Fonjong L and Fokum V (2017). Water crisis and options for effective water provision in urban and peri-urban areas in Cameroon. *Society and Natural Resources*, 30(4), 488-505. <https://doi.org/10.1080/08941920.2016.1273414>

Forchhammer K and Selim KA (2019). Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Volume 44, Issue 1, Pages 33–53, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025>

Goldsborough LG, McDougal RL and North AK (2005). Periphyton in freshwater lakes and wetlands. *Periphyton: ecology, exploitation and management*, 71-89.

Gusain R and Suthar S (2017). Potential of aquatic weeds (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* and *Eichhornia* sp.) in biofuel production. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.03.030>

Harper JL 1977. *Population Biology of Plants*. Academic, London. 892p.

Khabbach A, Libiad M and Ennabili A (2019). Invasion increasing risk of Al Jawahir Wadi lentic habitats by *Pistia stratiotes* L.(North-Central Morocco). *Botanica complutensis*, (43), 97-107. <https://dx.doi.org/10.5209/bocm.64280>

Krupek RA, Branco CC and Peres CK (2007). Distribuição ecológica das comunidades de macroalgas da bacia de drenagem do Rio das Pedras, região centro-sul do estado do Paraná, sul do Brasil. *Brazilian Journal of Botany*, 30(2), 173-182. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000200002>

Kumar V, SINGH J, Pathak VV, Ahmad S and Kothari R (2017). Experimental and kinetics study for phytoremediation of sugar mill effluent using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) and its end use for biogas production. *3 Biotech*, 7(5), 330. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0963-7>

Kumar A, SINGH A, Panigrahy M, Sahoo PK and Panigrahi KC (2018). Carbon nanoparticles influence photomorphogenesis and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, 37(6), 901-912. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2277-6>

Lallana VH 1989. Aspectos reproductivos del repolito de agua (*Pistia stratiotes* L.) en ambientes leníticos del río Paraná medio. *Iheringia* 39: 37-54.

Latysheva N, Junker VL, Palmer WJ, Codd GA and Barker D (2012). The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics*, 28(5), 603-606. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts008>

Lemon GD and Posluszny U 2000. Shoot development and evolution in *Pistia stratiotes* (Araceae). *Int. J. Plant Sci.* 161: 721-732. <https://doi.org/10.1086/314297>

Lindstrøm EA, Johansen SW and Saloranta T. (2004). Periphyton in running waters: Long-term studies of natural variation. *Hydrobiologia* 521: 63–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2254-8_6

Lu Q, He ZL, Graetz DA, Stoffella PJ and Yang X (2010). Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 17(1), 84-96. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0094-0>

Medeiros JCC, SILVA JCF, Resende TDSC, Teodoro GS, Pereira FJ and Coelho FF (2019). Ramet versus sporocarp production in the aquatic fern *Salvinia auriculata* (Salviniaceae): the role of shading. *Australian Journal of Botany*, 66(7), 583-588. <https://doi.org/10.1071/BT18062>

Meeks JC; Wycoff KL; Chapman JS; Enderlin CS (1983) Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 45, n. 4, p. 1351-1359.

Meeks JC; Campbell EL; Summers ML and Wong FC. (2002) Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology*, v. 178, n. 6, p. 395- 403. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0476-5>

Mishima D, Kuniki M, Sei K, Soda S, Ike M and Fujita M. (2008). Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresource technology*, 99(7), 2495-2500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.056>

Muniappan R, Reddy GV, and Raman A. (Eds.). (2009). *Biological control of tropical weeds using arthropods*. Cambridge University Press. New York

Odjegba VJ, and Fasidi IO. (2004). Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*, 13(7), 637-646. <https://doi.org/10.1007/s10646-003-4424-1>

Ohlendieck U, Stuhr A and Siegmund, H. (2000). Nitrogen fixation by diazotrophic cyanobacteria in the Baltic Sea and transfer of the newly fixed nitrogen to picoplankton organisms. *Journal of Marine Systems*, 25(3-4), 213-219. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(00\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(00)00016-6)

Pantawong R, Chuanchai A, Thipbunrat P, Unpaprom Y and Ramaraj R. (2015). Experimental investigation of biogas production from water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Emergent Life Sciences Research*, 1(2), 14-46.

Pentecost A and Whitton BA. (2012). Subaerial cyanobacteria. In: Whitton B A. (Ed.), *Ecology of cyanobacteria II*. Dordrecht: Springer, 291–316. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_10

Pott VJ and Pott A. 2000. *Plantas aquáticas do Pantanal*. Corumba: EMBRAPA

Rai AN (2002): Cyanolichens: nitrogen metabolism. – In: RAI, A.N., Bergman, B. and Rasmussen, U. (ed).: *Cyanobacteria in Symbiosis*; p. 97–116. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Raymond J; Siefert JL; Staples CR; Blankenship RE. (2004) The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, n. 3, p. 541-54. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>

Saha SK, Das R, Bora KN and Uma L. (2007). Biodiversity of epilithic cyanobacteria from freshwater streams of Kakoijana reserve forest, Assam, India. *Indian Journal of Microbiology* 47: 219–232. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0043-5>

Si C, Xue W, Lin J, Zhang J, Hong M, Wang Y, Zhang L, Yu F. (2020). No evidence of greater biomass allocation to stolons at moderate resource levels in a floating plant. *Aquat Ecol.* 54:421–429. <https://doi.org/10.1007/s10452-020-09751-3>

Subramanian KR. (2018). The Crisis of Consumption of Natural Resources. *Int. J. Rec. Innov. Acad. Res*, 2(8-19), 8-19.

Vallès-Casas, M, March H and Saurí D. (2017). Examining the reduction in potable water consumption by households in Catalonia (Spain): Structural and contingent factors. *Applied Geography*, 87, 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2017.07.015>

Xie Z, ZHU W, Qiao K, Zhan, P and Li P. (2019). Seasonal differences in relationships between changes in spring phenology and dynamics of carbon cycle in grasslands. *Ecosphere*, 10(5), e02733. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2733>

Zhang CC, Zhou CZ, Burnap RL and Peng L. (2018). Carbon/nitrogen metabolic balance: lessons from cyanobacteria. *Trends in plant science*, 23(12), 1116-1130. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.008>

Zhang P, Kuramae A, Van Leeuwen CH, Velthuis M, van Donk E, Xu, J and Bakker ES. (2020). Interactive Effects of Rising Temperature and Nutrient Enrichment on Aquatic Plant Growth,

Stoichiometry, and Palatability. *Frontiers in Plant Science*, 11, 58.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00058>

Zhang L Yao S, Jin Y, Song M, Lei N, Chen J and Yu F. (2020). Effects of clonal fragmentation and nutrient availability on the competitive ability of the floating plant *Salvinia natans*. *Folia Geobot.* 55:63–71. <https://doi.org/10.1007/s12224-020-09365-5>

Zheng Z, Bai W and Zhang WH. (2019). Clonality-dependent dynamic change of plant community in temperate grasslands under nitrogen enrichment. *Oecologia*, 189(1), 255-266.

<https://doi.org/10.1007/s00442-018-4317-x>

Zimmels Y, Kirzhner F and Malkovskaja A. (2006). Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. *Journal of environmental management*, 81(4), 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.11.014>