



LUIS CARLOS PEREIRA JUNIOR

**PLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE *CRONBERGIA* SP.
(NOSTOCACEAE), DEPENDENTE DO MEIO DE CULTIVO E
INTENSIDADE LUMINOSA.**

**LAVRAS – MG
2024**

LUIS CARLOS PEREIRA JUNIOR

**PLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE *CRONBERGIA* SP. (NOSTOCACEAE),
DEPENDENTE DO MEIO DE CULTIVO E INTENSIDADE LUMINOSA.**

Dissertação apresentada na Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Flávia de Freitas Coelho
Orientadora

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz
Coorientador

**LAVRAS – MG
2024**

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

Pereira Junior, Luis Carlos.

Plasticidade morfológica de *CRONBERGIA* sp. (Nostocaceae), dependente do meio de cultivo e intensidade luminosa. / Luis Carlos Pereira Junior. - 2024.

32 p. : il.

Orientador(a): Flávia Freitas Coelho.

Coorientador(a): Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Células especializadas . 2. Cianobactérias Heterocitadas. 3. Trade-off. I. Coelho, Flávia de Freitas. II. Vaz, Marcelo Gomes Marçal Vieira. III. Título.

LUIS CARLOS PEREIRA JUNIOR

**PLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE *CRONBERGIA* SP. (NOSTOCACEAE),
DEPENDENTE DO MEIO DE CULTIVO E INTENSIDADE LUMINOSA.**

**MORPHOLOGICAL PLASTICITY OF *CRONBERGIA* SP. (NOSTOCACEAE),
DEPENDENT ON CULTURE MEDIUM AND LIGHT INTENSITY.**

Dissertação apresentada na Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 22 de fevereiro de 2024.

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz – BIODIVERSITA

Dr. Diego Bonaldo Genuário - BIODIVERSITA

Dr. Michel Biondi - UFLA

Profa. Dra. Flávia de Freitas Coelho
Orientadora

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz
Coorientador

**LAVRAS – MG
2024**

*À minha mãe Elizabeth por todo amor, carinho e incentivo a seguir meus sonhos.
Ao meu pai Luiz que é meu exemplo de ser humano.
À mim, por sempre me dispor a enfrentar as dificuldades e sair do conforto.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Elizabeth e Luiz, e minha irmã Maria Luiza, por todo amor e suporte em mais um período acadêmico. Vocês são o meu pilar e apoio para continuar lutando e nunca desistir de ser uma pessoa melhor e um bom profissional.

À minha orientadora e amiga, Flávia de Freitas Coelho, por mais essa oportunidade, me ensinando e apoiando com a certeza de que tenho um futuro próspero, dessa forma sigo confiante e sempre buscando aperfeiçoamento.

Ao meu coorientador, Marcelo Vieira Vaz, por ter me recebido de braços abertos, por compartilhar todo seu conhecimento e experiências.

Ao meu grande amigo Marcos. Tenho certeza de que nossa amizade é pra vida toda. Mesmo distante sempre mantivemos nosso cordão da amizade firme e forte, as mensagens de carinho nos momentos de solidão, as conquistas comemoradas juntas e as histórias de vida entrelaçadas.

As minhas amigas e parceiras de trabalho do qual tenho orgulho, carinho e admiração, Larissa e Grécia, que durante este período criamos laços, compartilhamos histórias e nos apoiamos em todos os momentos. Aprendi que amizade não tem lugar certo, até mesmo para aquele cafezinho, ou uma geladinha.

Aos meus queridos parceiros de laboratório que sempre estiveram presentes e tornaram meus dias mais animados. Ao Gustavo que sempre tornou nossas reuniões mais doces com seus bolos fantásticos e deliciosos. Ao Michel que mesmo distante sempre está disposto a compartilhar suas experiências e lembrar nossas deixas animadas. Ao Raul e Ludmila que entraram recentemente, mas já considero.

Aos novos amigos que cativei nesse novo ciclo, que estiveram me apoiando e tornando cada desafio uma vitória a mais. Me orgulho de compartilhar minha vida com vocês e poder contar sempre.

Aos professores do setor de Botânica pelos anos de aprendizado.

Ao programa de pós-graduação em Botânica Aplicada pela oportunidade de aprender e contribuir mais uma vez com a ciência.

À UFLA pela oportunidade, pelo ensino de qualidade e por ter fornecido experiências que mudaram a minha vida.

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

Foram dois anos resumidos em um piscar de olhos, saindo de um período pandêmico e tentando me readaptar ao cotidiano. Não quero dizer que foi um momento difícil, mas é importante ressaltar que precisamos valorizar as dificuldades, mesmo que dolorosas, pois são elas que mostram o quão forte somos por sair da zona de conforto. Reafirmo que é o destino. Mesmo após a vitória, ainda sim enfrentamos a dúvida, a desvalorização e as mentiras, mas logo penso: afinal de que forma a ciência agiria se não fosse para desmistificar pré-conceitos?

Sigo me esforçando e agradeço a todos colegas de profissão que não desistiram e querem fazer a diferença.

OBRIGADO!

RESUMO

Algumas espécies de cianobactérias são capazes de diferenciar células vegetativas em células especializadas chamadas heterócitos, passando a ter como única função fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O nitrogênio fixado é convertido em formas assimiláveis através da ação da enzima nitrogenase, e, posteriormente é transportado para as demais células. Em *Cronbergia*, a formação do heterócito ocorre por meio de diferenciação e divisão de células vegetativas intercalares, e, após rompimento do tricoma, os heterócitos ficam dispostos terminalmente. Para o cultivo de cianobactérias heterocitadas, o meio mais utilizado é o BG-11 e sua variação BG-11₀ (sem nitrogênio), um complexo de nutrientes importantes para o desenvolvimento destes microrganismos. Como são fotossintetizantes, a luz é um fator importante no cultivo destes, pois é através da fotossíntese oxigênica que ocorre a conservação energética necessária para realização dos processos biológicos como a FBN. Considerando que há um gasto energético na produção de heterócitos, o objetivo deste trabalho foi analisar a existência de plasticidade morfológica na cianobactéria heterocitada *Cronbergia* sp. quando cultivada em meios BG-11 e BG-11₀, bem como sob alta (140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) e baixa (60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) intensidade luminosa. Para isso, foi realizado um experimento em laboratório, com duração de 20 dias. A cepa *Cronbergia* sp. UFLA-35 pertencente à Coleção de Cultura de Cianobactérias filamentosas (CCF/UFLA), foi inoculada em meios BG-11 e BG-11₀, com variação de intensidade luminosa, conforme descrito acima. Contamos heterócitos (91.044), e o número de células vegetativas (40.245), este último como uma medida do tamanho do filamento. As diferenças entre produção de heterócitos e produção de células vegetativas foram interpretadas como plasticidade morfológica. Para avaliar se houve efeito dos tratamentos na produção de heterócitos foi feita análise de variância (Anova), e a diferença entre os pares avaliados pelo teste de Tukey. Da mesma forma, para verificar se houve efeito dos tratamentos no tamanho dos filamentos dado pelo crescimento vegetativo, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, e a posterior foi aplicado o teste de Dunn. Também foi feita correlação de Spearman para verificar se há relação entre os dados obtidos. O número de heterócitos foi maior em tratamentos com meio BG-11₀. Já o número de células vegetativas foi superior em tratamentos com o meio BG-11. Por fim, observamos que quanto maior a produção de heterócitos, menor foi a produção de células vegetativas. Verificou-se ainda um trade-off entre a produção dessas células. Sabe-se que a nutrição é um fator importante no desenvolvimento das cianobactérias e que a escassez de nitrogênio acarretou aumento na produção de heterócitos. Entretanto, a presença de nitrogênio no meio proporcionou um aumento das células vegetativas. O trade-off entre células de heterócitos e vegetativas indica que a produção das primeiras tem alto custo para a cepa. Já a intensidade luminosa parece não ter se diferenciado entre si como baixa e alta, talvez por não atingirem uma radiação relevante para *Cronbergia* no nível nutricional em que estavam sendo mantidas.

Palavras-chave: Células especializadas; Cianobactérias heterocitadas; Trade-off.

ABSTRACT

Some species of cyanobacteria are capable of differentiating vegetative cells into specialized cells called heterocysts, which then have the sole function of fixing atmospheric nitrogen (N₂) through biological nitrogen fixation (BNF). The fixed nitrogen is converted into assimilable forms through the action of the enzyme nitrogenase and is subsequently transported to other cells. In *Cronbergia*, the formation of heterocysts occurs through the differentiation and division of intercalary vegetative cells, and after trichome rupture, the heterocysts are arranged terminally. For the cultivation of heterocystous cyanobacteria, the most commonly used medium is BG-11 and its variation BG-11₀ (nitrogen-free), a complex of important nutrients for the development of these microorganisms. Since they are photosynthetic, light is an important factor in the cultivation of these organisms because oxygenic photosynthesis provides the energy conservation necessary for biological processes such as BNF. Considering that there is an energy expenditure in the production of heterocysts, the objective of this work was to analyze the existence of morphological plasticity in the heterocystous cyanobacterium *Cronbergia* sp. when cultivated in BG-11 and BG-11₀ media, as well as under high (140 μmol/m/s) and low (60 μmol/m/s) light intensity. For this, an experiment was conducted in the laboratory, lasting 20 days. The strain *Cronbergia* sp. UFLA-35 belonging to the Collection of Filamentous Cyanobacteria Culture (CCF/UFLA) was inoculated in BG-11 and BG-11₀ media, with variation in light intensity, as described above. We counted heterocysts (91,044) and the number of vegetative cells (40,245), the latter as a measure of filament size. The differences between heterocyst production and vegetative cell production were interpreted as morphological plasticity. To evaluate whether there was an effect of the treatments on heterocyst production, analysis of variance (ANOVA) was performed, and the difference between pairs was evaluated by the Tukey test. Similarly, to verify if there was an effect of the treatments on filament size given by vegetative growth, the Kruskal-Wallis test was performed, and subsequently, the Dunn test was applied. Spearman correlation was also performed to check for any relationship between the obtained data. The number of heterocysts was higher in treatments with BG-11₀ medium. On the other hand, the number of vegetative cells was higher in treatments with BG-11 medium. Finally, we observed that the higher the production of heterocysts, the lower the production of vegetative cells. There was also a trade-off between the production of these cells. It is known that nutrition is an important factor in the development of cyanobacteria and that nitrogen scarcity resulted in an increase in heterocyst production. However, the presence of nitrogen in the medium led to an increase in vegetative cells. The trade-off between heterocyst and vegetative cell production indicates that the production of the former has a high cost for the strain. High and low light intensity did not seem to differentiate between them, perhaps because they did not reach a radiation level relevant to *Cronbergia* at the nutritional level at which they were being maintained.

Keywords: Specialized cells; Heterocystous cyanobacteria; Trade-off.

INDICADORES DE IMPACTO

Os resultados deste trabalho apresentam dados de caracterização do ciclo de vida, analisando potenciais gatilhos para diferenciação celular de uma linhagem de cianobactéria. Por se tratar de uma linhagem ainda não identificada, estes resultados são de extrema importância no processo de classificação da mesma dentro de um táxon existente ou quando indicativo de espécie nova. Considerando se tratar de um organismo que possui influência principalmente em ecossistemas aquáticos, estes resultados se encaixam perfeitamente na área de Meio Ambiente como definido pela Política Nacional de Extensão. De um modo geral as cianobactérias são microrganismos indicadores de qualidade da água, que apresentam respostas de extremo impacto ao ambiente aquático quando em condições de eutrofismo. O comportamento descrito como “bloom” pode ocorrer tanto em ambientes naturais quanto em reservatórios, comprometendo a funcionalidade do ecossistema local e da saúde humana. Assim, de acordo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável definidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), este trabalho tem impacto relevante principalmente no estudo da vida na água, mas também tem potencial aplicação em água potável e saneamento.

IMPACT INDICATORS

The results of this study provide data characterizing the life cycle, analyzing potential triggers for cellular differentiation of a strain of cyanobacteria. As it concerns a strain not yet identified, these results are of extreme importance in the classification process of the same within an existing taxon or when indicative of a new species. Considering it to be an organism that primarily influences aquatic ecosystems, these results fit perfectly into the field of Environment as defined by the National Extension Policy. In general, cyanobacteria are indicators of water quality, exhibiting responses of extreme impact on the aquatic environment under conditions of eutrophication. The behavior described as "bloom" can occur in both natural environments and reservoirs, compromising the functionality of the local ecosystem and human health. Thus, according to the Sustainable Development Goals defined by the United Nations (UN), this work has significant impact primarily on the study of aquatic life, but also has potential applications in drinking water and sanitation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Área e material de estudo.....	16
3.2 Preparação e montagem do experimento.....	17
3.3 Coleta de dados.....	19
3.4 Análise de dados.....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias estão distribuídas nos mais variados ecossistemas, seja de vida livre ou em associações com outros organismos (Adams; Duggan, 1999; Dismukes *et al.*, 2001). Alguns grupos de cianobactérias apresentam capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), se tornando um recurso valioso tanto para eles quanto para a comunidade fitoplanctônica (Allen; Arnon, 1955). A FBN ocorre nas células vegetativas de grupos homocitados e em células especializadas chamadas heterócitos de grupos heterocitados (Wolk; Ernst; Elhai, 1994; De Vries; De Vries, 2018).

A diferenciação de células vegetativas em heterócitos ocorre a partir de mudanças morfológicas e fisiológicas. Sendo esta uma célula especializada para a função de FBN, a formação de heterócito é induzida quando o nitrogênio se torna escasso (Destro; Moutinho; Nordi, 2018). Nas cepas do gênero *Cronbergia* a formação desta célula ocorre por meio da diferenciação e divisão de células vegetativas dispostas de forma intercalar ao longo do filamento e posteriormente, ocorre o rompimento na junção dos pré-heterócitos dando origem a dois novos tricomas com heterócitos terminais. A frequência na diferenciação dessa célula dependerá da disponibilidade de nitrogênio que o ambiente apresenta (Komarek, 2010; Komarek; Johansen, 2015).

Em experimentos realizados com microrganismos é comum encontrar estudos que avaliam o efeito da alteração de nutrientes no meio de cultivo (Healey; Hendzel, 1979; Allen; Arnon, 1955; Destro; Moutinho; Nordi, 2018). O meio de cultivo mais comumente usado para as cianobactérias é o BG-11, o qual é formado por um complexo de nutrientes contendo o $NaNO_3$ em sua formulação (Allen; Arnon, 1955; Touloupakis *et al.*, 2023). Esse meio possui a variação BG-11₀ em que o $NaNO_3$ não é adicionado, diminuindo a concentração de nitrogênio sendo usado para o cultivo de cianobactérias filamentosas heterocitados (Allen; Arnon, 1955; Peters; Mayne, 1974; Touloupakis *et al.*, 2023).

No cultivo de microrganismos autotróficos obrigatórios a luz é um componente indispensável. A atividade fotossintética é o principal meio de armazenamento energético e de obtenção de carboidratos para esse grupo (Brandimarte; Santos, 2014). Em grupos de cianobactérias a incidência de luz é um fator ambiental resultante em alterações morfológicas e de crescimento. (Tonk *et al.*, 2005; Destro; Moutinho; Nordi, 2018; Baracaldo; Cardona, 2020).

Assim, considerando os serviços ecossistêmicos como a fotossíntese oxigênica e a FBN realizados por cianobactérias e a importância de se obter maior conhecimento sobre

esses organismos, objetivamos analisar a existência de plasticidade morfológica na cianobactéria heterocitada *Cronbergia* sp. quando cultivada em meios BG-11 e BG-11₀, bem como sob dois níveis de intensidade luminosa, 140 $\mu\text{mol/m/s}$ e 60 $\mu\text{mol/m/s}$. Para alcançar nosso objetivo pretendemos responder às seguintes perguntas: I) A presença de nitrogênio no meio de cultivo, via meio de cultivo BG-11 diminui a produção de heterócitos? II) A intensidade luminosa interfere no número de heterócitos produzidos? III) Estas variáveis, meio de cultura e intensidade luminosa, interferem no número de células vegetativas no filamento? Para isto testamos as seguintes hipóteses: O cultivo de *Cronbergia* sp. (UFLA 35) em meio BG-11₀ produzirá um maior número de heterócitos; Em cultivo sob intensidade luminosa de 140 $\mu\text{mol/m/s}$ ocorrerá maior número de heterócitos; Quando cultivada em meio BG-11 e sob intensidade luminosa de 140 $\mu\text{mol/m/s}$, ocorrerá alocação de recursos para o aumento de células vegetativas no filamento; O investimento em heterócitos implica em uma diminuição do investimento em células vegetativas, devido ao alto custo de produção das primeiras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Cyanobacteriota (Oren; Mares; Rippika, 2022) refere-se a um grupo taxonômico composto por microrganismos (bactérias) que realizam fotossíntese oxigênica. Possuem diferentes variações morfológicas, com distribuição cosmopolita (Newton; Burgess, 1983; De Rivers, 2006; Dvořák *et al.*, 2017; Kvíderová *et al.*, 2019). Esses organismos realizam funções ecossistêmicas de extrema importância para a manutenção da vida no planeta, contribuindo principalmente como produtores primários via fotossíntese oxigênica e como fixadores de nitrogênio (FBN) (Newton; Burgess, 1983; Fransceschini *et al.* 2010; De Rivers, 2006; Brandimarte; Santos, 2014). A aproximadamente 2,8 bilhões de anos atrás, as cianobactérias foram responsáveis por uma drástica alteração atmosférica. Em um contexto histórico, as cianobactérias são responsáveis pela primeira extinção em massa após o surgimento da fotossíntese oxigênica. A constante liberação de O₂ na atmosfera alterou sua composição que ocasionou a extinção de muitos organismos anaeróbicos, mas que também permitiu o surgimento de seres de respiração aeróbica (ADAMS; DUGGAN, 1999; DISMUKES *et al.*, 2001; BRANDIMARTE; SANTOS, 2014; BARACALDO; CARDONA, 2020). A FBN é um processo biológico complexo, pois apesar do nitrogênio (N) ser indispensável na realização de processos metabólicos e manutenção da vida no planeta este elemento não é encontrado em abundância no ambiente. Em uma perspectiva de Stainer e Cohen (1977) para conversão do dinitrogênio atmosférico de forma eficaz é necessário a presença da enzima nitrogenase, ao contrário da molécula de O₂ que precisa ser ausente por tem potencial inibitório sobre a atividade da nitrogenase. Após essa regulação as células são capazes de converter o N₂ em NH₃ e, posteriormente, em outros compostos assimiláveis (Wolk; Ernst; Elhai, 1994; Kim; Rees, 1994; De Vries; De Vries, 2018).

As células fixadoras de N₂, os heterócitos, são formados em cianobactérias com morfologia filamentosa. Esse tipo de organização apresenta uma conexão intracelular mais direta, com trocas metabólicas constantes permitindo a passagem dos produtos da fixação do N₂ para as outras células do filamento. Isto as torna mais eficientes e resistentes a adversidades ambientais (Dvořák *et al.*, 2017; Kieninger; Maldener, 2021). Um agrupamento filamentoso de cianobactérias pode ser definido por sua multicelularidade e conexão entre as células por meio de micro plasmodesmos (Komárek; Johansen, 2015), que podem apresentar filamentos uni ou multisseriados, e também se fragmentar formando hormogônios (Adams, 1992; Schirrmeister; Antonelli, 2011).

As cianobactérias filamentosas são divididas em grupos de organismos homocitados (células iguais), apenas células vegetativas, e heterocitados (apresenta diferenciação celular), ou seja, esta última apresenta tanto células vegetativas quanto heterócitos e acinetos. O heterócito, como citado acima, é uma célula especializada em fixar o nitrogênio atmosférico, e é originado a partir de células vegetativas. Algumas funções fisiológicas de uma célula especializada são reduzidas, outras portanto são potencializadas, se tratando da finalidade a qual a célula servirá. Em heterócitos o fotossistema II (FSII) é dissolvido impedindo a oxidação da molécula de água e liberação de O₂, aumentando a eficiência da nitrogenase no processo de fixação de nitrogênio, desta forma a cianobactéria heterocitada deixa de realizar a FBN em apenas um período e passa a ser funcional em período integral. Morfologicamente os heterócitos se diferem das demais células por possuírem tamanhos e formas variadas, além da parede celular espessa (Wolk *et al.*, 1994; Adams; Duggan, 1999) como forma de evitar a difusão de gases como o O₂ que são inibidores da enzima nitrogenase, desta forma a célula consegue realizar a FBN de forma contínua. Segundo Mariscal e colaboradores (2007), as cianobactérias filamentosas possuem uma membrana externa a parede celular que recobre as células de todo o tricoma e assim facilita o transporte de nitrogênio fixado e carbono reduzido entre heterócito e célula vegetativa. Esse tipo de transporte por vias externas foi sugerido em estudos realizados por Montesinos e colaboradores (1995), e posteriormente reavaliado por Picossi e colaboradores (2005).

Desde o seu surgimento, identificado por datação de seus ancestrais, as cianobactérias desenvolveram uma variedade de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para responder a mudanças ambientais que lhes permitem colonizar quase todos os ecossistemas, isso pela grande capacidade adaptativa, a qual, possivelmente, favoreceu as divisões interespecíficas e o sucesso evolutivo desses organismos (Tandeau De Marsac; Houmard, 1993; Baracaldo; Cardona, 2020). Elas podem fazer parte do fitoplâncton, mas também associadas às plantas aquáticas. Em um estudo realizado por Peters e Mayne (1974), a associação endofítica encontrada entre macrófita-cianobactéria, e posteriormente, revisada por Peters e Meeks (1989), descreve o processo de simbiose espécie-específico entre a cianobactéria *Anabaena azollae* encontrada dentro das folhas da samambaia aquática *Azolla caroliniana*. Pimenta e colaboradores (2021), relataram uma associação epifítica entre várias linhagens de cianobactérias filamentosas em raízes da samambaia aquática *Salvinia auriculata*. Em um estudo anteriormente realizado por nosso grupo de trabalho (dados não publicados – Biondi, M., UFLA, Brasil) também foi identificado cianobactérias filamentosas associadas ao perifiton das raízes de *Pistia stratiotes*, das quais foram recolhidas e isoladas

em laboratório. Após isolamento dessas linhagens, o material foi caracterizado por características morfológicas em nível de gênero. Dentre os grupos caracterizados morfológicamente, destaca-se o gênero *Cronbergia* pouco citado devido a sua recente validação como gênero independente (Komárek *et al.*, 2010; Genuário *et al.*, 2018). Anteriormente *Cronbergia* estava circunscrito ao gênero *Cylindrospermum* por disposição de seus heterócitos. No estudo realizado por Komárek e colaboradores (2010), foi observado em algumas cepas uma formação de heterócitos com morfologia diferente das demais espécies do gênero, com desenvolvimento semelhante ao que ocorre com o gênero *Anabaenopsis*, mas ainda sim divergindo em formação. O grupo taxonômico *Cronbergia* compreende cianobactérias de organização filamentosa com disposição de heterócitos terminais, com formação em pares originária de um célula vegetativa ocasionando a quebra do filamento (Komárek *et al.*, 2010; Genuário *et al.*, 2018). A célula de resistência, acineto, possui tanto uma formação apo quanto paraheterocítica podendo ser observada ao longo do filamento ou adjacente às células fixadoras de nitrogênio (Genuário *et al.*, 2018). Até a presente data poucas espécies pertencentes ao gênero *Cronbergia* foram descritas e identificadas; *C. siamensis*, *C. paucicellularis* e *C. planctonica* são espécies antes pertencentes ao gênero *Cylindrospermum*, que sofreram uma nova análise e foram realocadas por Komárek e colaboradores (2010) para compor o novo gênero; *C. amazonensis* identificada por Genuário e colaboradores (2018) encontrada no Rio Solimões sendo a primeira espécie brasileira identificada pertencente ao novo gênero.

O manejo e cultivo de cianobactérias surge a partir do interesse de diversas áreas científicas sobre esses organismos. Do ponto de vista ecológico, as cianobactérias apresentam um importante papel como bioindicadoras de qualidade da água, pois o excesso de nutrientes advindo de forma artificial favorece seu crescimento populacional, ou “*bloom*” que consecutivamente afetar todo ecossistema local causando a morte de outros organismos (Pinotti; Segato, 1991; Ferrão *et al.*, 2009; Bellém *et al.*, 2012). Esse fenômeno é também de extrema importância para área da saúde pois, existem espécies que produzem toxinas e podem crescer em locais de armazenamento e abastecimento de água em casas e cidades, apresentando um risco à saúde pública quando não há saneamento adequado (Chorus; Welker, 2021). Já do ponto de vista econômico o foco é a comercialização de suplementos a base de metabólitos secundários e/ou biomassa da própria cianobactéria, assim como o uso da associação cianobactéria-macrófita como biofertilizante em cultivares (Nierzwicki, 2018; Adhikari, 2020). Segundo Castro e colaboradores (2003), o biofertilizante ou adubo verde produzido com macrófitas é bastante utilizado no cultivo de arroz por diversos países,

principalmente pela capacidade de disponibilização de nitrogênio fixado que ocorre pela presença de cianobactérias fixadoras de N_2 em suas raízes. Kolla e colaboradores, (2015) confirmam a eficácia do uso de adubos verdes através do estudo realizado com o gênero *Azolla*, uma macrófita que apresenta simbiose endofítica com cianobactérias fixadoras de nitrogênio. A presença de nitrogênio fixado pode ser abundante no adubo sendo um benefício para o cultivo.

A metodologia empregada no processo de cultivo de cianobactérias é semelhante ao processo realizado com outros microrganismos, como por exemplo bactérias e fungos. Esse método consiste na disponibilização de um meio líquido ou pastoso contendo um complexo nutricional essencial para o desenvolvimento e a sobrevivência do organismo, em ambiente controlado ou não. Allen e Arnon (1955), realizaram um estudo avaliando a necessidade nutricional para o cultivo de *Anabaena cylindrica*. Neste estudo, criaram um meio de cultura que agrupava nutrientes necessários para o cultivo de cianobactérias. Com o avanço da ciência no estudo do sobre cianobactérias, vários outros meios de cultivo foram criados e adaptados para as diferentes variações morfológicas desses organismos com base em sua necessidade nutricional: BG-11 (Allen, 1968); meio de Fogg (Fogg, 1949; Jacobson, 1951); o meio CFTRI (Venkataraman e BECKER, 1984) e meio de Zarrouk (ZARROUK, 1966). O meio Blue-Green ou BG-11 e sua variante BG-11₀ (ausência $NaNO_3$), são constantemente empregados em estudos com interesse no cultivo *in vitro* de cianobactéria; a variação BG-11₀ geralmente é utilizada para cultivo de organismos unicelulares ou filamentos heterocitados, diferente do meio completo (BG-11) usado para manter cepas homocitadas (Rippka *et al.*, 1979; Nehul, 2019 ; Touloupakis *et al.* 2023). Em um estudo recente realizado por Touloupakis e colaboradores (2023), foi avaliado o desempenho fotossintético e o crescimento de *Nostoc linckia* quando cultivado em meio BG-11 e sua variação, apresentando um resultado favorável a influência do meio com nitrato em sua composição quando comparado ao meio BG-11₀.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e material de estudo

O experimento foi realizado em laboratório utilizando uma cepa que faz parte da Coleção de Cultura de Cianobactérias filamentosas (CCF/UFLA), pertencente ao gênero *Cronbergia* sp. (UFLA 35) isolada a partir das raízes da planta aquática *Pistia stratiotes*, Importante ressaltar que este gênero foi identificado com base em critérios morfológicos e

ecológicos utilizando chave de identificação Komarék e colaboradores, (2014). As cepas foram mantidas em crescimento em meio BG-11₀ (ausência NaNO₃), uma variação do meio BG-11 já descrito por Allen e Mary Menne, (1968) como meio de cultivo próprio para cianobactérias heterocitadas (TABELA 1).

Tabela 1 - Lista de componentes do meio BG-11, indicado para o cultivo de cianobactérias de água doce e terrestres. Sua variante BG-11₀ não possui a adição de NaNO₃.

Componentes	Estoque (g/l)	Uso por litro	Concentração final (g/l)
NaNO ₃	150	10 ml	1,5
K ₂ HPO ₄	40	1 ml	0,04
MgSO ₄ 7H ₂ O	75	1 ml	0,075
CaCl ₂ 2H ₂ O	36	1 ml	0,036
Ácido cítrico	6	1 ml	0,006
Citrato de amônio férico	6	1 ml	0,006
Na ₂ EDTA	1	1 ml	0,001
Micronutrientes *	-	1 ml	-
Carbonato de Sódio	20	1 ml	0,02

*Composição (g/l): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂4H₂O, 1,81; ZnSO₄7H₂O, 0,222; ZnSO₄7H₂O, 0,39; CuSO₄5H₂O, 0,079; Co(NO₃)₂6H₂O, 0,049.

Fonte: adaptado de Allen e Mary Manne, 1968.

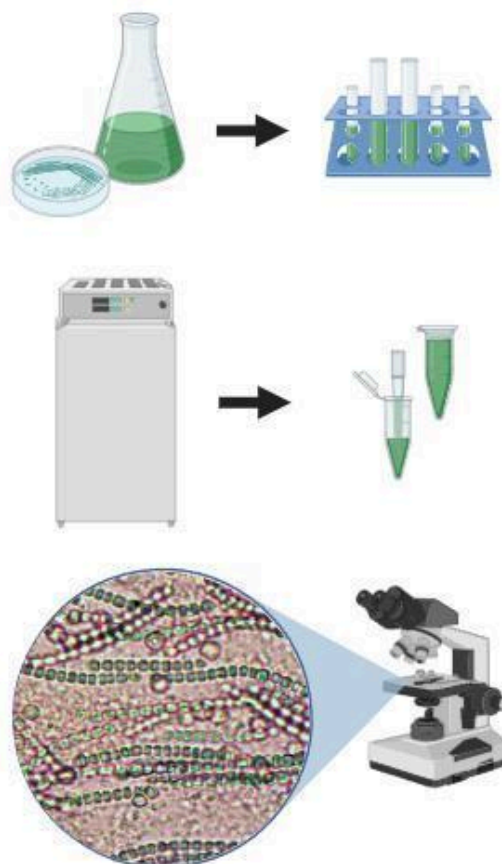
3.2 Preparação e montagem do experimento

Antes da montagem do experimento, um processo de produção de biomassa foi feito através da inoculação da cepa em meio BG-11₀. Após isso, realizamos um acompanhamento da densidade óptica para estimar a concentração do pré-inóculo. Este material passou por um processo de centrifugação e análise em espectrofotometria, a fim de confirmar a densidade óptica ideal por análise de absorvância através do comprimento de luz de 680, foi obtido o valor de 0,760 por ml. Foram preparados 12 tubos de ensaio com capacidade máxima de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultivo, sendo seis tubos contendo meio BG-11₀ (ausência de nitrato) e outros seis com meio BG-11 (presença de nitrato). Foi inoculado, por tubo, 10 % de biomassa de cianobactérias referente ao total de meio de cultivo. Após inoculação, com os

frascos devidamente tampados, o experimento foi mantido em câmara B.O.D vertical com variação luminosa, controle de temperatura a 26 °C, em fotoperíodo de 12h/12h. A intensidade luminosa da B.O.D foi medida pela luz incidente utilizando o espectrorradiômetro, obtendo então os valores de 60 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ nas extremidades e, 140 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ no centro da câmara. O parâmetro para as medidas de intensidade luminosa foi baseado em 40 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ e 100 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ utilizado por Myers e colaboradores (2011) em linhagens de cianobactérias encontradas na Austrália.

O experimento conta com quatro tratamentos com 3 tubos (réplicas) cada: tubos contendo meio BG-11₀ com luminosidade a 140 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ (T1); tubos contendo meio BG-11₀ com luminosidade a 60 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ (T2); tubos contendo meio BG-11 com luminosidade a 140 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ (T3); tubos contendo meio BG-11 com luminosidade a 60 $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{s}$ (T4). O experimento teve duração de 20 dias. Dentro deste período foram realizadas coletas de 1 mL a cada cinco dias começando no primeiro dia da montagem. O material coletado foi armazenado em Eppendorfs contendo solução de fixação Transeau na concentração 1:1ml e mantido ao abrigo da luz (Figura 1).

Figura 1 – Modelo experimental utilizado.

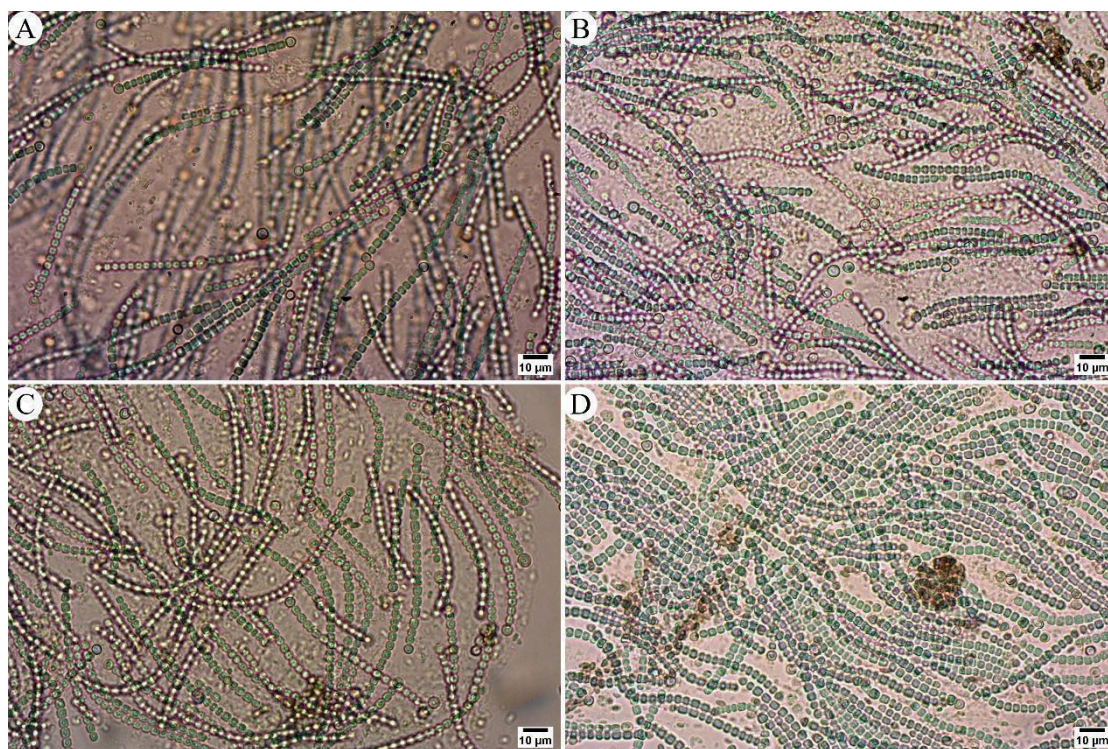


Fonte: Biorender.

3.3 Coleta de dados

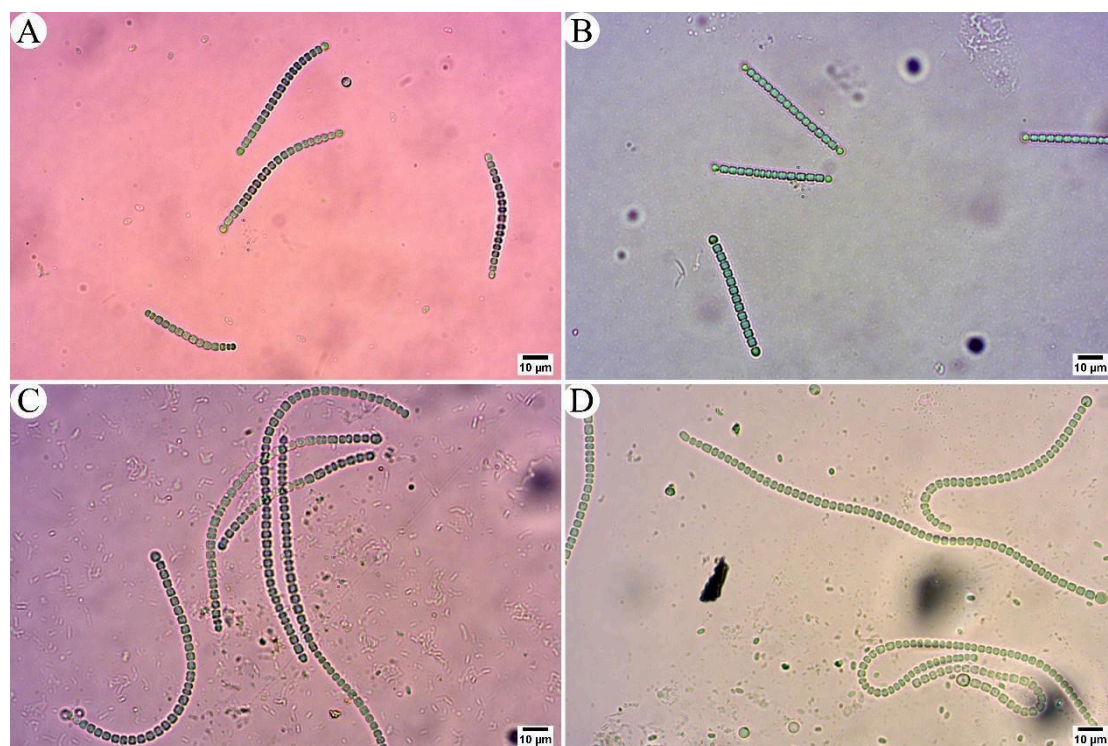
As amostras fixadas foram analisadas em microscopia óptica de luz com câmera acoplada, do qual foram registrados por meio de imagens 54 campos por tratamento, que por sua vez foram selecionados aleatoriamente: 27 campos contendo heterócitos (Figura 2) e outros 27 contendo três filamentos (Figura 3). As imagens serviram para contagem dos heterócitos, bem como das células vegetativas presentes nos filamentos, esse processo foi feito por meio da ferramenta ImageJ 1.53^a (Figura 4). Os dados obtidos foram plotados em tabela para análise futura.

Figura 2 - Representação de campos microscópicos observados para contagem de heterócitos; tratamento T1(A); tratamento T2(B); tratamento T3(C) e tratamento T4(D).



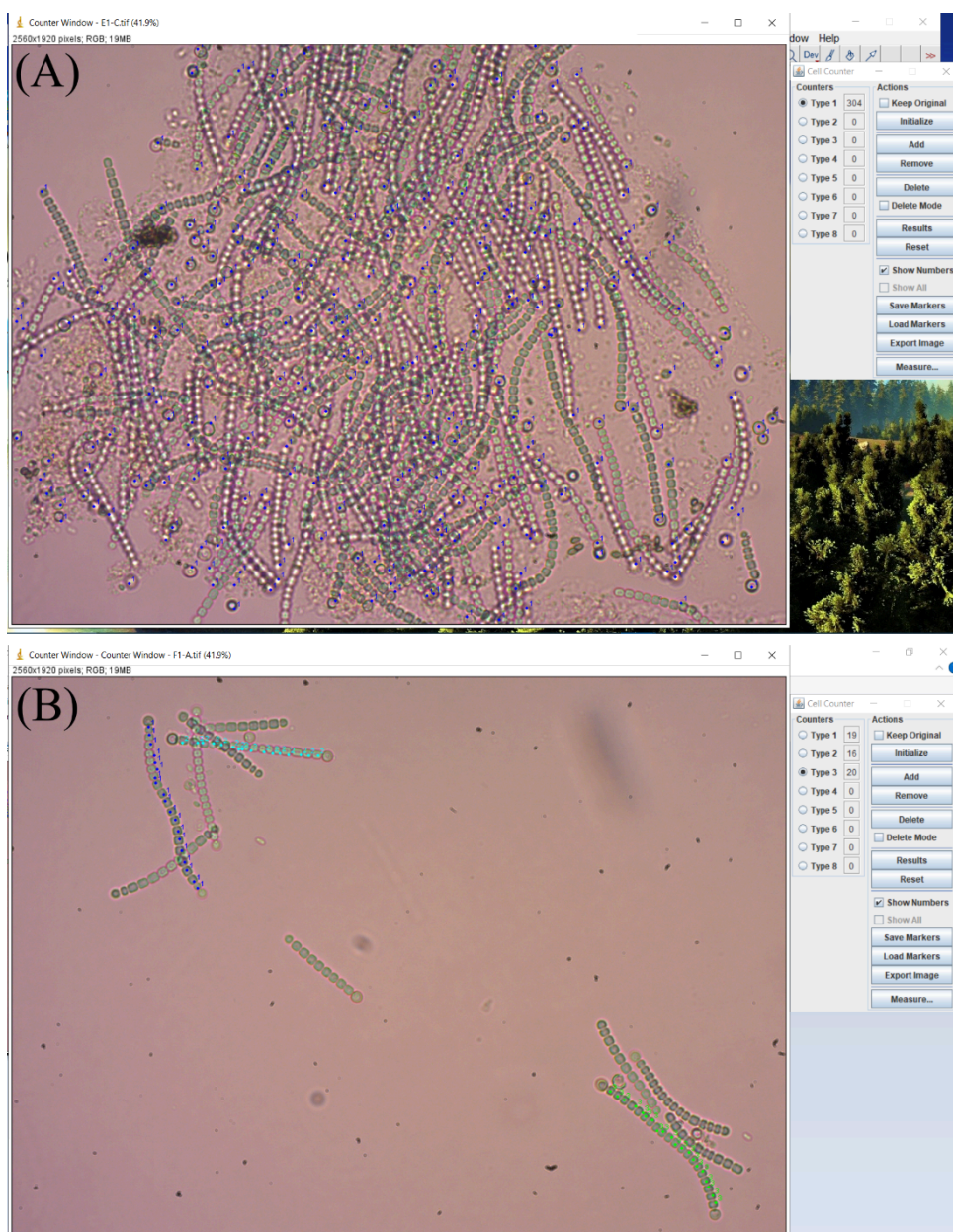
Fonte: do autor.

Figura 3 – Representação de campos microscópicos observados para contagem de células vegetativas em filamentos; tratamento T1(A); tratamento T2(B); tratamento T3(C) e tratamento T4(D).



Fonte: do autor.

Figura 4 – Processo utilizado para contagem de células: heterócitos (A); células vegetativas(B).



Fonte: do autor.

3.4 Análise de dados

O teste de análise de variância (ANOVA) foi realizado para verificar se houve efeito dos tratamentos no número de heterócitos produzidos. Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para analisar as diferenças entre as médias. Um teste de Kruskal Wallis foi realizado para analisar o efeito dos tratamentos sobre o número de células vegetativas por filamento, e posteriormente, foi feito o teste de Dunn para comparar as médias. Por último, foi realizada

uma análise de comparação múltipla de médias semelhantes (stepwise e step-down). Em adição, o efeito da produção de heterócitos na produção de células vegetativas foi também testado usando com uma correlação de Spearman, e uma análise de regressão linear foi empregada para avaliar a ocorrência de um possível trade-off entre o número de heterócitos e o número de células vegetativas. As análises foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics versão 26.

4. RESULTADOS

O número de heterócitos produzidos por *Cronbergia* sp. (UFLA 35) foi afetado pelos tratamentos ($F = 6,412$; $p = 0,001$). O número total de heterócitos foi maior nos tratamentos T1, T2 (sem nitrogênio) e T4 comparado ao tratamento T3 (Tabela 2) (Figura 5A). Entre os tratamentos, a produção de heterócitos em T3 foi menor comparado a T1 ($F = 6,412$; $p = 0,002$) e T2 ($F = 6,412$; $p = 0,007$), mas não diferiu do T4 ($F = 6,412$; $p = 0,548$). O tratamento T1 não apresentou diferença na produção de heterócitos quando comparado a T2 ($F = 6,412$; $p = 0,965$) e T4 ($F = 6,412$; $p = 0,070$), assim como o tratamento T2 não diferiu do T4 ($F = 6,412$; $p = 0,188$).

Tabela 2 – Número total de heterócitos e de células vegetativas ao longo de todo o experimento por tratamento.

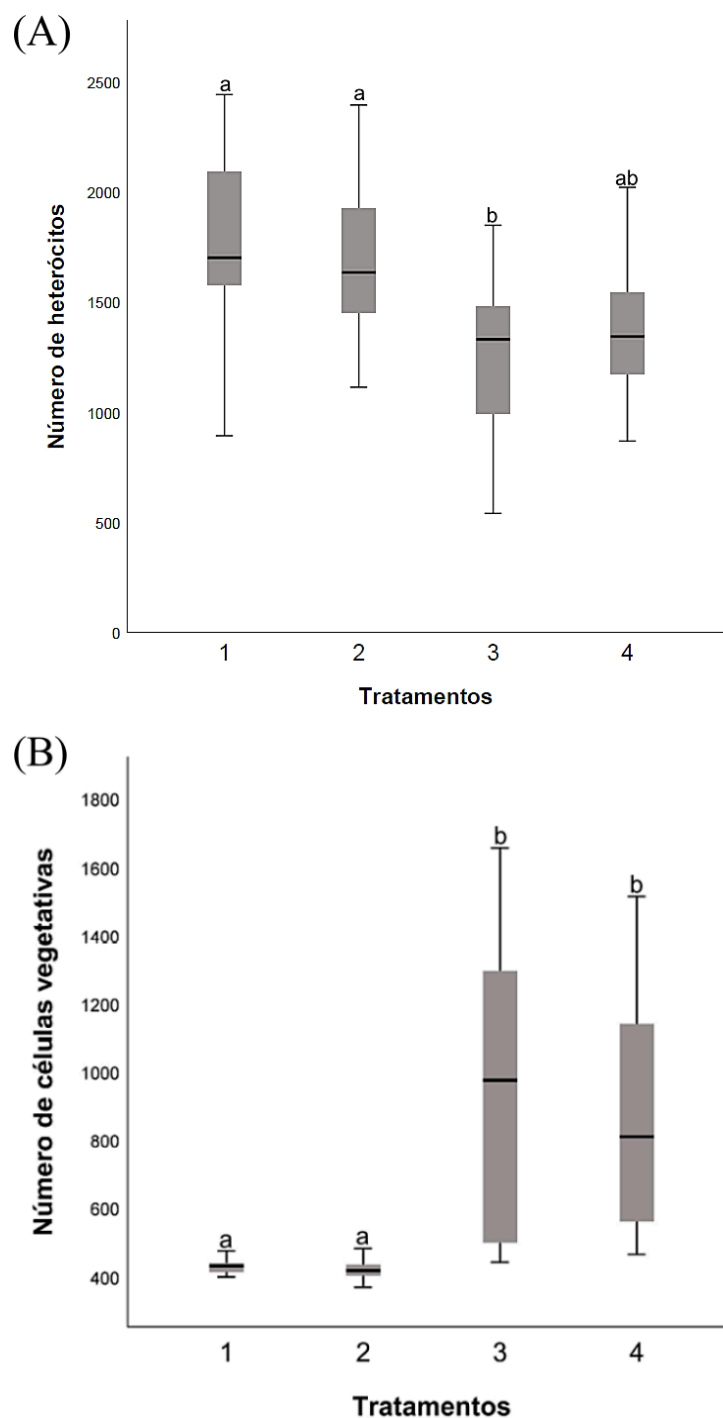
Número de células	Tratamentos				Total
	T1	T2	T3	T4	
Heterócitos	26.633	25.557	17.917	20.937	91.044
Células vegetativas	6.379	6.291	14.492	13.033	40.245

Fonte: do autor.

Os dados referentes ao número de células vegetativas mostram que essa variável também foi afetada pelos tratamentos ($KW = 39,366$; $p = 0,000$), já que o número de células vegetativas por filamento foi menor nos tratamentos T1 e T2, cultivadas em meio BG-11₀, comparado aos tratamentos T3 e T4 contendo meio BG-11 (Tabela 2)(Figura 5B). O número de células vegetativas foi menor no tratamento T1 quando comparado aos tratamento T3 (Dunn = -27,867; $p < 0,01$) e T4 (Dunn = -26,500; $p < 0,01$). O tratamento T2 também

apresentou menor número de células vegetativas quando comparado aos tratamentos T3 (Dunn = -29,967; $p < 0,01$) e T4 (Dunn = -28,600; $p < 0,01$). Já os tratamentos T1 e T2 não foram diferentes (Dunn = 2,100; $p = 0,742$), bem como T3 e T4 (Dunn = 1,367; $p = 0,830$).

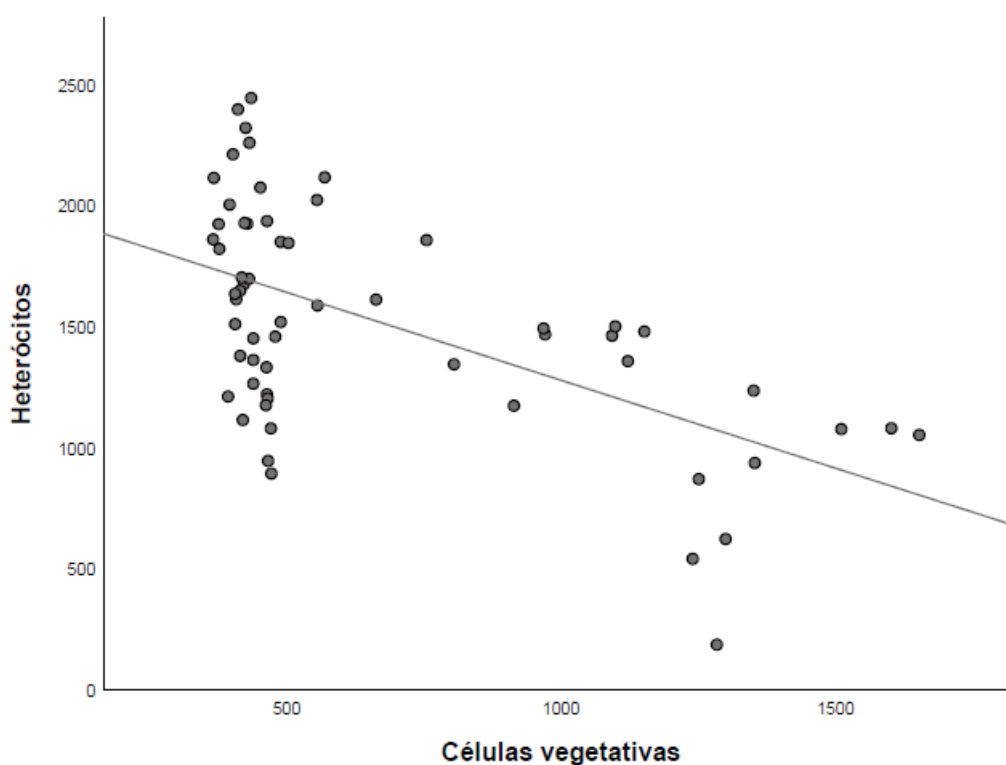
Figura 5 – Número total de heterócitos(A) e células vegetativas(B) produzidas em cada tratamento: (1) meio BG-11₀ e 140 $\mu\text{mol/m/s}$; (2) meio BG-11₀ e 60 $\mu\text{mol/m/s}$; (3) meio BG-11 e 140 $\mu\text{mol/m/s}$; (4) meio BG-11 e 60 $\mu\text{mol/m/s}$.



Fonte: programa SPSS.

Nossos dados também mostram que a produção de heterócitos foi negativamente correlacionada com o número de células vegetativas ($r = -0,578$; $p < 0,01$; $r^2 = 0,332$), assim, quanto maior o número de células vegetativas por filamento, menor é o número de heterócitos produzidos (Figura 6).

Figura 6 - Produção de heterócitos em função do número de células vegetativas ao final do experimento.



Fonte: programa SPSS.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a cepa de *Cronbergia* sp. (UFLA 35) cultivada em meios de diferentes concentrações de nitrogênio apresentou diferentes densidades de heterócitos e células vegetativas por contagem de células. Myers e colaboradores (2011) verificaram em *Nodularia spumginea* uma diminuição na produção de heterócitos mediante ao aumento de nitrato em 100 $\mu\text{mol/m/s}$, mas não teve efeito quando aplicado esse aumento em 40 $\mu\text{mol/m/s}$, concordando então com a afirmativa de que na presença de nitrogênio a produção de heterócitos diminui. Segundo Harish e Kunal (2020) as cianobactérias iniciam o processo de diferenciação ao mínimo sinal de deficiência de nitrogênio que induz a produção de heterócito. A falta de nitrogênio desencadeia sínteses de proteínas reguladoras, que são

responsáveis pelo equilíbrio C-N e diferenciação em heterócito (Harish; Kunal, 2020). O estresse oxidativo dado pela atividade fotossintética também é um importante regulador da diferenciação em heterócito, como inibidor do complexo enzimático a presença de O₂ foi o principal fator de compartimentalização da fotossíntese oxigênica e FBN em diferentes tipos celulares (Flores; Herrero, 2009; Teramoto et al, 2018; Harish; Kunal, 2020).

O número de heterócitos maior em tratamentos sem adição de nitrogênio corrobora com a hipótese de que a escassez deste nutriente estimula a produção dessas células. Segundo Teramoto e colaboradores (2018), em um estudo realizado com *Anabaena*, observaram que a privação de nitrogênio desencadeia o acúmulo de 2-oxaglutarato, promovendo desbalanço na relação carbono nitrogênio. A molécula de 2-oxaglutarato quando em grande concentração pode se ligar aos reguladores, que ativam genes de desenvolvimento de heterócito (Harish; Kunal, 2020; Favaro *et al.*, 2021). Na comparação entre os tratamentos, a intensidade luminosa pode ter sido um fator limitante à produção de heterócito. Isto se dá pela necessidade energética na produção e manutenção destas células, assim uma maior luminosidade, aumenta a atividade fotossintética que por sua vez produz mais energia. Bittencourt-Oliveira e colaboradores (2012) assumem que espécies da ordem Nostocales necessitam de alta incidência luminosa para suprir a demanda energética de manutenção de heterócitos. O tratamento T3 apresentou o menor número de heterócitos dentre os tratamentos. Além da presença de nitrogênio no meio sendo um inibidor da produção de heterócito, a alta intensidade de luz provavelmente influenciou o organismo a priorizar o crescimento vegetativo. Podendo então reafirmar que o processo de diferenciação celular em heterócitos é principalmente a falta do nitrogênio (Meeks *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2010; Harish; Kunal, 2020), A alta luminosidade também pode ser um fator estressante, de acordo com Vaz (2010), a intensidade luminosa acima de um limiar pode acarretar na degradação de ficobiliproteínas, que são responsáveis pela captação de luz em diferentes ondas. Esta condição acarreta na diminuição da atividade fotossintética o que prejudica a síntese energética e açúcares que seriam destinados a manutenção das células de heterócitos presentes (Vaz, 2010; Bittencourt-Oliveira *et al.* 2012). No tratamento T4 houve um aumento no número de heterócitos mesmo na presença de N. Esse resultado diverge de discussões encontradas na literatura de que em um contexto geral o parâmetro de crescimento de heterócitos é principalmente afetado por limitação de nitrogênio. Como ainda não se tem conhecimento de indivíduos do gênero *Cronbergia* sob pressões nutricionais ou variações luminosas, pressupomos que as respostas possam ser a níveis moleculares e resposta gênica.

Analisando o efeito dos tratamentos no número de células vegetativas, nota-se que estas foram nitidamente menores nos tratamentos T1 e T2, reforçando que a ausência de nitrogênio e o acúmulo de carbono, acarretam processos de regulação gênica e alocação de recursos para a diferenciação em heterócitos de forma a manter o equilíbrio C-N (Teramoto *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2021). Já os tratamentos T3 e T4 apresentam um maior número de células vegetativas corroborando com a hipótese que em meio BG-11, apresenta nitrato, o investimento em crescimento vegetativo é priorizado. Desta forma é esperado que a disponibilidade nutritiva do meio, quanto recursos advindos da atividade fotossintética sejam utilizados de diversas outras formas (Meeks *et al.*, 2002; Touloupakis *et al.*, 2023). Estudos com representantes de gêneros como *Anabaena*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* cultivados em meio controlado, identificaram um aumento em densidade celular também influenciado por variação luminosa que quando em altas incidências (geralmente acima de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) potencializam o crescimento de biomassa (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2012; Hongmei *et al.*, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2016; Dextro *et al.*, 2018). Há registros de respostas diferentes dentro de um mesmo grupo, como por exemplo *Cylindrospermopsis raciborskii*, de forma que Bonilla e colaboradores (2012) observaram um aumento dos tricomas da espécie sob condições de alta luminosidade (100 μmol) e, a mesma espécie como identificado por Wojciechowski e colaboradores (2016) apresentou um aumento dos tricomas sob baixa luminosidade (9 μmol), segundo eles como sendo uma resposta adaptativa de otimizar a absorção de luz.

Nossos resultados mostram também que, no total, o número de heterócitos é inversamente proporcional ao número de células vegetativas, de forma a apresentar uma relação de trade-off. Esse tipo de relação é comum em plantas, de modo a alocar recursos para uma função e não disponibilizá-las a outra, considerando o custo benefício do investimento (Luo *et al.*, 2016; Celho *et al.*, 2020). Meng e colaboradores, (2022) descreveram uma relação de trade-off em *Dolichospermum flos-aquae* (Nostocales), entre biomassa e diâmetro celular, quando no escuro. De modo geral, ainda não se tem muitos registros sobre a presença de trade-offs em cianobactérias, especialmente em *Cronbergia*, gênero ainda pouco estudado. De qualquer forma, trade-offs são esperados, seja quando os recursos estão limitados, seja quando uma estrutura requer um gasto energético maior que outra em sua produção (Stearns, 1989; Weiner, 2004). Uma vez que a variação no padrão de alocação tem implicações na adaptação do organismo no ambiente (Luo *et al.*, 2016), sugerimos que o investimento em células especializadas, com alto valor energético, ocorra às custas de um menor investimento em células vegetativas. Destacamos a importância da descrição deste comportamento em

cianobactérias, uma vez que trade-offs podem ser moldados pelo ambiente e produzir adaptações.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossa pesquisa demonstra que o investimento de *Crombergia* sp. (UFLA 35) em produção de heterócitos foi favorecido em meio BG-11₀, enquanto que a produção de células vegetativas foi favorecida em meio BG-11. A exposição à intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol/m/s}$ não representou o estresse esperado de uma baixa luminosidade, portanto, menores valores devem ser abordados. Já a exposição a 140 $\mu\text{mol/m/s}$ no tratamento com meio BG-11 pode ter sido um fator estressante na produção de heterócitos.

A descoberta de trade-off, é uma importante e inovadora característica dentro do grupo de cianobactérias. Porém, a escassez de dados sobre organismos do gênero reforça a necessidade de estudos com esse tipo de relação de investimento entre características morfológicas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. G. Multicellularity in cyanobacteria. In: **SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY**. Cambridge University Press, 1992. p. 341-341.
- ADAMS, David G.; DUGGAN, Paula S. Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. **New Phytologist**, v. 144, n. 1, p. 3-33, 1999.
- ADHIKARI, Kripa et al. An overview of azolla in rice production: a review. **Reviews in Food and Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 04-08, 2020.
- AGUIAR, Rosane et al. A NOVEL EPIPHYTIC CYANOBACTERIAL SPECIES FROM THE GENUS BRASILONEMA CAUSING DAMAGE TO EUCALYPTUS LEAVES. **Journal of Phycology**, v. 44, n. 5, p. 1322-1334, 2008.
- ALLEN, Mary B.; ARNON, Daniel I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. **Plant Physiology**, v. 30, n. 4, p. 366, 1955.
- ALLEN, Mary Mennes. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates 1, 2. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1968.
- BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1984.
- BEGON, Michael; TOWNSEND, Colin R. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed editora, 2023.
- BEHLE, Anna. Recipe for standard BG-11 media. 2019.
- BELLÉM, Fernando et al. Cianobactérias e toxicidade: impacto na saúde pública em Portugal e no Brasil. 2012.
- BIONDI, M. 2021. Adaptações de cianobactérias filamentosas e seus efeitos nas estratégias reprodutivas de *Pistia stratiotes*. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Botânica Aplicada, Universidade Federal de Lavras.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, Maria do Carmo et al. Effects of light intensity and temperature on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) with straight and coiled trichomes: growth rate and morphology. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 343-351, 2012.
- BRANDIMARTE, Ana Lucia e SANTOS, Deborah Yara Alves Cursino dos. Fotossíntese e Quimiossíntese. Diversidade biológica, História da vida na Terra e Bioenergética. Tradução . São Paulo: USP/Univesp/Edusp, 2014. . . Acesso em: 25 out. 2023.
- BONILLA, Sylvia et al. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*?. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 594-607, 2012.

COELHO, Flávia F. *et al.* Sex allocation in aquatic ferns: The role of body size. **Plant Species Biology**, v. 36, n. 3, p. 425-435, 2021.

CAMPBELL, Elsie Lin; MEEKS, John C. Characteristics of hormogonia formation by symbiotic *Nostoc* spp. in response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 125-131, 1989.

CASSIER-CHAUVAT, Corinne; CHAUVAT, Franck. Cell division in cyanobacteria. **The cell biology of cyanobacteria**, p. 7-27, 2014.

CASTRO, R.; NOVO, R.; CASTRO, R. I. Influence of Azolla-anabaena symbiosis on rice (*Oryza sativa* L) crop as a nutritional alternative. **Cultivos Tropicales**, v. 24, n. 3, p. 77-82, 2003.

CHORUS, Ingrid; WELKER, Martin. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. Taylor & Francis, 2021.

DE REVIERS, Bruno. **Biologia e filogenia das algas**. Artmed Editora, 2006.

DE VRIES, Sophie; DE VRIES, Jan. Azolla: A model system for symbiotic nitrogen fixation and evolutionary developmental biology. In: **Current Advances in Fern Research**. Springer, Cham, 2018. p. 21-46.

DISMUKES, G. C. *et al.* The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2170-2175, 2001.

DEXTRO, Rafael Barty; MOUTINHO, Fellipe Henrique Martins; NORDI, Cristina Souza Freire. Growth and special structures production of *Nostoc paludosum* (Nostocaceae, Cyanobacteria) under nutrient starvation and different light intensities. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, 2018.

DVOŘÁK, Petr *et al.* Diversity of the cyanobacteria. **Modern topics in the phototrophic prokaryotes: Environmental and applied aspects**, p. 3-46, 2017.

FÁVARO, Ana; DO NASCIMENTO, Antônio Galvão; DE FREITAS COELHO, Flávia. Urban environmental influences on heterocyst investment in *Leptogium cyanescens* (Collemataceae). **Nova Hedwigia**, v. 113, n. 1-2, p. 259-277, 2021.

FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva *et al.* Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. 2009.

FIRÁKOVÁ, Silvia; ŠTURDÍKOVÁ, Mária; MÚČKOVÁ, Marta. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2007.

FLORES, Enrique; HERRERO, Antonia. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 39-50, 2010.

FOGG, G. E. Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* lemm.: II. in relation to carbon and nitrogen metabolism. **Annals of botany**, v. 13, n. 51, p. 241-259, 1949.

FRANCESCHINI, Iara Maria et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2009.

GENUARIO, 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.

HARISH; SETH, Kunal. Molecular circuit of heterocyst differentiation in cyanobacteria. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 9, p. 738-745, 2020.

HARWOOD, Thomas V.; RISSER, Douglas D. The primary transcriptome of hormogonia from a filamentous cyanobacterium defined by cappable-seq. **Microbiology**, v. 167, n. 11, p. 001111, 2021.

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

JACOBSON, Louis. Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. **Plant Physiology**, v. 26, n. 2, p. 411, 1951.

KIENINGER, Ann-Katrin; MALDENER, Iris. Cell–cell communication through septal junctions in filamentous cyanobacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 61, p. 35-41, 2021.

KIM, Jongsun; REES, Douglas C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.

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

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

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.

KVÍDEROVÁ, Jana; ELSTER, Josef; KOMÁREK, Jiří. Ecophysiology of cyanobacteria in the Polar Regions. In: **Cyanobacteria**. Academic Press, 2019. p. 277-302.

MARISCAL, Vicente; HERRERO, Antonia; FLORES, Enrique. Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. **Molecular microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1139-1145, 2007.

MEEKS, John C. et al. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Archives of microbiology**, v. 178, n. 6, p. 395-403, 2002.

MENG, Yangyang et al. Seasonal shifts in the morphological traits of bloom-forming cyanobacteria in lake Chaohu, China. **Diversity**, v. 14, n. 6, p. 435, 2022.

MONTESINOS, Maria Luz; HERRERO, Antonia; FLORES, Enrique. Amino acid transport systems required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 11, p. 3150-3157, 1995.

NEHUL, J. N. Studies on Effect of Different Culture Media on Growth and Production of Carotenoids in a Cyanobacterium *Scytonemaschmidtii*Gom.

NEWTON, William E.; BURGESS, Barbara K. Nitrogen fixation: its scope and importance. In: **Nitrogen Fixation**. Springer, Boston, MA, 1983. p. 1-19.

NIERZWICKI-BAUER, Sandra A. *Azolla-Anabaena* symbiosis: Use in agriculture. **CRC handbook of symbiotic cyanobacteria**, p. 119-136, 2018.

OREN, Aharon; MAREŠ, Jan; RIPPKA, Rosmarie. Validation of the names *Cyanobacterium* and *Cyanobacterium stanieri*, and proposal of *Cyanobacteriota* phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 005528, 2022.

PAL, Sagarika et al. Digging deeper into the taxonomy of *Cylindrospermum* and description of *Johanseniella tripurensis* gen. et sp. nov. from India. **FEMS Microbiology Letters**, v. 369, n. 1, p. fnac074, 2022.

PETERS, Gerald A.; MAYNE, Berger C. The *Azolla*, *Anabaena azollae* relationship: I. Initial characterization of the association. **Plant Physiology**, v. 53, n. 6, p. 813-819, 1974.

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

PICOSSI, Silvia et al. ABC-type neutral amino acid permease N-I is required for optimal diazotrophic growth and is repressed in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1582-1592, 2005.

PIMENTA, Larissa Langsdorff et al. Epiphytic cyanobacterial strains in the roots of *Salvinia auriculata* and the effect of light and nutrients on the production of heterocyst, akinete and hormogonia. **Aquatic Ecology**, p. 1-11, 2021.

PINOTTI, Maria Helena Pimenta; SEGATO, Rosimeire. Cianobactérias: importância econômica. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 12, n. 4, p. 275-280, 1991.

POSTIUS, C.; NEUSCHAEFER-RUBE, O.; HAID, V.; BÖGER, P. N₂-fixation and complementary chromatic adaptation in non-heterocystous cyanobacteria from Lake Constance. **FEMS microbiology ecology**, v. 37, n. 2, p. 117-125, 2001.

PRASANNA, Radha et al. Development of cyanobacterium-based biofilms and their in vitro evaluation for agriculturally useful traits. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 49-58, 2011.

RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

SÁNCHEZ-BARACALDO, Patricia; CARDONA, Tanai. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. **New Phytologist**, v. 225, n. 4, p. 1440-1446, 2020.

SCHIRRMESTER, Bettina E.; ANTONELLI, Alexandre; BAGHERI, Homayoun C. The origin of multicellularity in cyanobacteria. **BMC evolutionary biology**, v. 11, p. 1-21, 2011.

STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, Germaine. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 31, n. 1, p. 225-274, 1977.

STEARNS, Stephen C. **The evolution of life histories**. Oxford university press, 1998.

TAMULONIS, Carlos; POSTMA, Marten; KAANDORP, Jaap. Modeling filamentous cyanobacteria reveals the advantages of long and fast trichomes for optimizing light exposure. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22084, 2011.

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

TONK, Linda et al. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5177-5181, 2005.

TOULOUPAKIS, Eleftherios et al. Growth and photosynthetic performance of *Nostoc linckia* (formerly *N. calcicola*) cells grown in BG-11 and BG-11₀ media. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 795-807, 2023.

VAZ, Marcelo Gomes Marçal Vieira. Diferenciação celular em *Nostoc* spp: efeito da intensidade luminosa e do padrão de sobreposição dos filamentos. 2010.

WEIH, Martin. Trade-offs in plants and the prospects for breeding using modern biotechnology. **New Phytologist**, p. 7-9, 2003.

WOJCIECHOWSKI, Juliana; FERNANDES, Luciano Felício; FONSECA, Fernanda Vitória Buck. Morpho-physiological responses of a subtropical strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) to different light intensities. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, p. 232-238, 2016.

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

ZARROUK, C. Contribution to the study of a cyanophyceae: influence of various physical and chemical factors on the growth and photosynthesis of *Spirulina maxima*. **Paris: University of Paris**, 1966.