**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise genômica de isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii*
com enfoque em cilindrospermopsina e fixação biológica de N₂**

Patricia Dayane Carvalho Schaker

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2012**

Patricia Dayane Carvalho Schaker
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Análise genômica de isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii* com enfoque em cilindrospermopsina e fixação biológica de N₂

Orientador:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Schaker, Patricia Dayane Carvalho

Análise genômica de isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii* com enfoque em cilindrospermopsina e fixação biológica de N₂ / Patricia Dayane Carvalho Schaker.- - Piracicaba, 2012.
138 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cianobactérias 2. Cianotoxinas 3. Fixação biológica de nitrogênio 4. Genomas
5. Heterócitos 6. Metabólitos secundários I. Título

CDD 589.46
S296a

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas
que eu mais amo: meus pais
Jamil e Soili, meus irmãos
Felipe e Letícia e meu noivo
Gabriel. Sem vocês nada faz
sentido...Com vocês tudo é
possível...Por vocês tudo vale a
pena...*

AGRADECIMENTOS

Agradecer se torna uma tarefa difícil quando notamos o número incontável de pessoas que passam em nossa vida e de alguma forma nos conduzem para construção de uma história única. Muitas pessoas cruzaram meu caminho, deixaram sempre um pouco de si e levaram um pouco de mim...

Agradeço primeiramente aos meus pais, Jamil e Soili, por ter semeado em mim o valor da educação e terem me oferecido condições para que este sonho vigorasse. Pelo exemplo de vida que são para mim, pela dedicação e amor com que sempre me ampararam e por acreditarem sempre que eu seria capaz de ir além do que eu imaginava. Aos meus irmãos, Felipe e Letícia, por todo amor, companheirismo e alegria dos momentos que passamos juntos. Vocês são tudo para mim.

Ao meu noivo Gabriel pelos momentos de felicidade, pelas conquistas e pelos sonhos que construímos juntos. Pela paciência e pelo amor incondicional que me conforta... “Não importa o quanto essa nossa vida nos obriga a sermos sérios, todos nós procuramos alguém para sonhar, brincar, amar, e tudo que precisamos é de uma mão para segurar e um coração para nos entender”.

A meus sogros Alda e Ênio, por terem acompanhado minha caminhada durante o mestrado, sempre torcendo para o sucesso.

A Professora Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação durante o período do mestrado e sua disposição para auxiliar quando necessário, pelas oportunidades oferecidas, por sempre buscar a melhor forma para que o trabalho fosse realizado, e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Andresa, Carol Hoff, Carol Pamplona, Danillo, Diego, Elaine, Estela, Karina, Janaína, Marcelo, Mariana, que mais do que colegas hoje são grandes amigos. Obrigada pelo companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos de dúvida e angústia e também nos de alegria. Vocês são especiais, e com certeza fizeram tudo valer a pena...Agradeço especialmente aos amigos Carol H. e Danillo pela ajuda em todas as análises, pelas ideias, discussões, correção do trabalho e amizade especial!

A Esalq e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

Aos professores da Esalq pelo conhecimento transmitido durante as disciplinas cursadas e pela sua disposição em auxiliar sempre que necessário durante a execução do projeto. Ao Dr. Alessandro Varani pelo auxílio nas análises.

A CAPES e ao CNPQ pela concessão de bolsa.

Ao grupo do Laboratório de Polimorfismo de DNA da UFPA, pelo conhecimento transmitido durante o período de treinamento. A família do Sr. Eliude Introvini (Rose, Djanara, Maria e Renaldo) que me acolheu na cidade de Belém.

Finalmente, meu agradecimento especial a Deus pelo dom da vida, por ter guiado meus passos e me conduzido sempre para o melhor caminho. Pela oportunidade de mais uma conquista e a sorte de estar cercada de tantas pessoas maravilhosas.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Aspectos gerais das cianobactérias.....	23
2.2 Fixação do N ₂ atmosférico por cianobactérias	25
2.3 O gênero <i>Cylindrospermopsis</i>	27
2.4 Síntese de metabólitos secundários por cianobactérias	30
2.4.1 Cilindrospermopsina.....	32
2.4.1.1 Métodos de detecção de CYN	34
2.4.1.2 Genes envolvidos na biossíntese de CYN	35
2.5 Sequenciamento genômico de nova geração	40
3 OBJETIVOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Linhagens utilizadas e manutenção	47
4.2 Avaliação da produção de CYN	48
4.3 Detecção de genes relacionados com a síntese de CYN	49
4.3.1 Desenho de iniciadores.....	49
4.3.2 Produção de biomassa	50
4.3.4 Extração de DNA.....	51
4.3.5 Amplificação dos genes relacionados com a síntese de CYN.....	52
4.3.6 Clonagem e transformação	52
4.3.7 Sequenciamento Sanger.....	53
4.3.8 Processamento dos dados e análise filogenética.....	54
4.4 Sequenciamento dos genomas utilizando a plataforma Illumina	54
4.4.1 Concentração de DNA.....	55
4.4.2 Construção da biblioteca genômica.....	55
4.4.2.1 Fragmentação do DNA.....	55
4.4.2.2 Reparo das extremidades	57
4.4.2.3 Adenilação das extremidades 3'	57

4.4.2.4 Ligação dos adaptadores	57
4.4.2.5 Purificação dos produtos ligados aos adaptadores	58
4.4.2.6 Enriquecimento	59
4.4.2.7 Validação da biblioteca	59
4.4.2.8 Clusterização e sequenciamento	60
4.4.6 Análise dos dados gerados	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Avaliação da produção de CYN	63
5.2. Detecção de genes relacionados com a síntese de CYN	66
5.2.1 Lavagem das células cianobacterianas	66
5.2.2 Amplificação por PCR e sequenciamento dos genes envolvidos na síntese de CYN	67
5.3 Sequenciamento dos genomas	74
5.3.1 Fragmentação do DNA	74
5.3.2 Validação da biblioteca	76
5.3.3 Dados gerados pelo sequenciamento genômico	76
5.3.4 Montagem <i>ab initio</i>	79
5.3.5 Busca por genes relacionados com a síntese de CYN	81
5.3.6 Busca por agrupamentos gênicos relacionados à síntese de compostos de interesse produzidos por cianobactérias	97
5.3.7 Busca por genes relacionados com a fixação biológica do N ₂ e diferenciação dos heterócitos	100
6 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	135

RESUMO

Análise genômica de isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii* com enfoque em cilindrospermopsina e fixação biológica de N₂

A espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* pertence a ordem Nostocales e tem a capacidade de realizar a fixação biológica do N₂ atmosférico, sintetizar cianotoxinas e também de proliferar em águas doces formando florações de cianobactérias nocivas. A população de *C. raciborskii* encontrada no Brasil é conhecida por produzir derivados de saxitoxina (STX), enquanto cilindrospermopsinas (CYN), as quais são detectadas em isolados de outros países, não têm sido detectada em isolados brasileiros. Neste estudo, a produção de CYN por dois isolados brasileiros de *C. raciborskii*, CENA302 e CENA303, submetidos a diferentes condições nutricionais, foi avaliada usando o teste imunológico ELISA específico para detecção de CYN. Em seguida, genes envolvidos na biossíntese de CYN foram buscados no genoma dessas duas linhagens usando amplificações por PCR com iniciadores específicos e posterior sequenciamento Sanger, bem como sequenciamento genômico na plataforma HiScan SQ. Além disso, foram realizadas buscas nos dois genomas obtidos pela plataforma HiScan SQ de genes envolvidos com a síntese de algumas outras moléculas já descritas em cianobactérias, bem como aqueles relacionados com a fixação biológica de N₂ e diferenciação do heterócito. Apesar da utilização de diferentes condições nutricionais, não foi detectada a produção de CYN no ensaio de ELISA em ambos os isolados de cianobactérias. No sequenciamento Sanger, dos nove genes sintetases de CYN buscados, quatro foram amplificados e sequenciados na linhagem *C. raciborskii* CENA302 e três na linhagem CENA303. Estas sequências de nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos, e as funções das proteínas e os domínios preditos confirmaram a sua identidade como genes sintetase de CYN. O sequenciamento dos genomas completos das duas linhagens apresentou altos valores de qualidade de bases e elevada cobertura genômica. A busca por genes sintetase de CYN nos dois genomas foi realizada pelo mapeamento por referência das leituras, mostrando que algumas porções do agrupamento estavam contempladas no genoma, representando aproximadamente 10% do agrupamento de CYN. A anotação das regiões entre os genes descritos como flanqueadores do agrupamento CYN mostrou uma inversão gênica indicando a ocorrência de eventos que podem ter levado a perda ou dispersão no genoma deste agrupamento. Os genes anotados relacionados com fixação biológica de N₂ e diferenciação do heterócito nas linhagens CENA302 e CENA303 apresentaram altas identidades com genes homólogos descritos em *C. raciborskii*. A ausência de alguns nucleotídeos no gene *hetP* envolvido na formação do heterócito possivelmente levou a perda de sua função na *C. raciborskii* CENA303, impedindo a diferenciação das células vegetativas em heterócitos, uma vez que não foi observado a presença dessa célula diferenciada em nenhuma das condições nutricionais avaliadas. Todos os genes de moléculas bioativas conhecidas de cianobactérias buscados pelo mapeamento por referência das leituras não foram encontrados nos genomas das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303. Os resultados obtidos neste estudo revelaram a possibilidade de estar ocorrendo eventos evolutivos que estão causando a perda dos genes responsáveis pela síntese de CYN nos isolados brasileiros de *C. raciborskii*, demonstrando divergência alopátrica.

Palavras-chave: Cianobactérias; Sequenciamento de nova geração; Genomas; Cianotoxinas; Heterócito; Metabólitos secundários

ABSTRACT

Genomic analysis of *Cylindrospermopsis raciborskii* Brazilian isolates with a focus on cylindrospermopsin and biological N₂ fixation

The cyanobacterial species *Cylindrospermopsis raciborskii* belongs to the order Nostocales and has the ability to perform biological nitrogen fixation, synthesize cyanotoxins and also to proliferate in freshwaters to form harmful cyanobacterial blooms. The *C. raciborskii* population from Brazil is known to produce saxitoxin derivatives (STX), while cylindrospermopsin (CYN), which is commonly detected in isolates from other countries, has thus far not been detected in Brazilian strains. In this study, the production of CYN by two Brazilian isolates of *C. raciborskii* CENA302 and CENA303, under different nutritional conditions, was evaluated using ELISA immunoassay specific for the detection of CYN. Then, genes involved in the biosynthesis of CYN were searched in the genome of these two strains using PCR amplification with specific primers and subsequent Sanger sequencing, as well as genomic sequencing on the platform HiScan SQ. Furthermore, searches were performed in the two genomes obtained by the platform HiScan SQ of genes involved in the synthesis of several other molecules already described in cyanobacteria, as well as those related to the biological N₂ fixation and heterocyte differentiation. Despite the use of different nutritional conditions, no CYN production was detected by the ELISA assay for both cyanobacterial isolates. In the Sanger sequencing, of the nine CYN synthetase gene searched, four were amplified and sequenced in the *C. raciborskii* strain CENA302 and three in the strain CENA303. These nucleotide sequences were translated into amino acids, and the predicted protein functions and domains confirmed their identity as CYN synthetase genes. The complete genome sequencing of the two strains showed high values of bases quality and high genomic coverage. The search for CYN synthetase genes in the two genomes was performed by mapping reads to reference, showing that some portions of the cluster were contemplated in the genome, representing approximately 10% of CYN cluster. The annotation of regions between the genes described as flanking the CYN cluster showed a gene inversion indicating the occurrence of events that may have caused the loss or dispersion in the genome of this cluster. The annotated genes related to biological N₂ fixation and heterocyte differentiation in the CENA302 and CENA303 strains showed high identities with homologous genes from other strains of *C. raciborskii*. The absence of a few nucleotides in the *hetP* gene involved in the heterocyte formation perhaps led to the loss of its function in the *C. raciborskii* CENA303, preventing the differentiation of vegetative cells into heterocyte, since it was not observed the presence of this differentiated cell in any of the nutritional conditions evaluated. All genes of known cyanobacterial molecules searched by mapping reads to reference were not found in the genomes of the *C. raciborskii* strains CENA302 and CENA303. The results of this study revealed the possibility of being occurring evolutionary events that are leading to loss of the genes responsible for the synthesis of CYN in the *C. raciborskii* Brazilian isolates, demonstrating allopatric divergence.

Keywords: Cyanobacteria; Next generation sequencing; Genome; Cyanotoxins, Heterocyte; Secondary metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Linhagens representantes do gênero *C. raciborskii*: A-E: CENA302; F-G: CENA303, H:CYP-011K. As indicações em vermelho representam as estruturas: a) acineto e h) heterócito 28
- Figura 2 - Representação esquemática dos domínios enzimáticos de: A) NRPS e B) PKS. Abreviações: C: domínio de condensação; A: domínio de adenilação; PCP: proteína carreadora de peptidil; MT: metiltransferase; E: epimerase; AT: aciltransferase; ACP: proteína carreadora de acila; KS: cetossintase; KR: cetorreductase; DH: desidratase; ER: enoil-redutase; TE: tioesterase. Adaptado de (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011)..... 32
- Figura 3 - Estrutura da cilindrospermopsina (CYN) e suas variantes naturais (MAZMOUZ et al., 2010)..... 34
- Figura 4 - Agrupamentos gênicos de CYN em três gêneros de cianobactéria. A. *C. raciborskii* AWT205; B. *Oscillatoria* sp. PCC6506, C. *Aphanizomenon* sp. Adaptado de MAZMOUZ et al. (2010); MIHALI et al. (2008); STÜKEN; JAKOBSEN (2010)..... 37
- Figura 5 - Via biossintética da CYN. (Adaptado de MIHALI et al., 2008) 38
- Figura 6 - Etapas do sequenciamento utilizando a plataforma Illumina HiScan SQ 44
- Figura 7 - Localização dos pontos das amostragens de água de onde as linhagens utilizadas neste estudo foram isoladas. 1) Braço Riacho Grande da Represa Billings, linhagem *C. raciborskii* CENA302. 2) Lago Theobaldo Dick, linhagem *C. raciborskii* CENA303. 3) Lago Julius, Queensland, Austrália, linhagem *C. raciborskii* CYP-011K 48
- Figura 8 - Características morfológicas das linhagens de *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 em diferentes meios de cultivo. A) CENA303 – ASM-1 com N; B) CENA302 – ASM-1 com N, C) CENA302 – ASM-1 sem N; D) CENA303 - Z8 com N; E) CENA302 - Z8 com N; F) CENA302 - Z8 sem N; G) CENA303 – BG-11 com N; H) CENA302 - JM com N; I) CENA303 - JM sem N. “H”: heterócito 66
- Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrD. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó..... 69
- Figura 10 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrE. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó..... 69

- Figura 11 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrF. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó70
- Figura 12 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrK. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó70
- Figura 13 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrI. As linhagens brasileiras que apresentam o fragmento estão marcadas em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó70
- Figura 14 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrG. A linhagem brasileira que apresentam o fragmento está marcada em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó71
- Figura 15 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrN. A linhagem brasileiras que apresenta o fragmento está marcada em negrito71
- Figura 16 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrH. A linhagem brasileira que apresentam o fragmento está marcada em negrito71
- Figura 17 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrO. As linhagens brasileiras que apresentam o fragmento estão marcadas em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó72
- Figura 18 - Padrão de fragmentação do DNA genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA 302 (A-K) e *C. raciborskii* CENA303 (K) em sonicador utilizando diferentes tempos de exposição e intensidades. As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K indicam as diferentes condições usados conforme especificadas na Tabela 275
- Figura 19 - Amostras de DNA purificadas após o processo de fragmentação75
- Figura 20 - Visualização do DNA fragmentado ligado aos adaptadores e indexadores das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 prontas para o sequenciamento genômico76
- Figura 21 - Qualidade média das leituras geradas no sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA30278
- Figura 22 - Qualidade média das leituras geradas no sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA30379

- Figura 23 - Mapeamento das leituras geradas no sequenciamento das linhagens (A) *C. raciborskii* CENA 302 e (B) *C. raciborskii* CENA 303 contra o agrupamento gênico de CYN da linhagem *C. raciborskii* AWT205. A figura mostra as regiões que foram mapeadas e as respectivas coberturas relativas obtidas 82
- Figura 24 - Organização dos genes flanqueadores do agrupamento gênico de CYN nas linhagens *C. raciborskii* CENA302, CENA303 (não produtoras de CYN) e CS-505 (produtora de CYN), mostrando a inversão do gene *hypF* nas linhagens não produtoras..... 89
- Figura 25 - Alinhamento das sequências entre os genes *hypF* e *hypC* das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 90
- Figura 26 - Organização dos genes que flanqueiam a proteína hipotética das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 que apresenta similaridade com o gene *cyrO* 91
- Figura 27 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *cyrO* e sequências de proteínas hipotéticas codificadas por linhagens não produtoras de CYN. Os quadros em rosa mostram o sítio de anelamento do par de iniciadores *cyrO-F* e *R*. Os quadros em preto mostram os aminoácidos que diferem entre as sequências e permitem a separação de produtoras e não produtoras de CYN..... 91
- Figura 28 - Análise filogenética de sequências do gene que codifica para a subunidade 16S do rRNA (~1410 pb) usando o método *Neighbor Joining* – NJ. As linhagens brasileiras utilizadas neste trabalho estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó. Linhagens não produtoras de CYN estão destacadas no quadro designado “Grupo I”, linhagens produtoras de CYN destacadas no quadro designado “Grupo II”. A linhagem *Raphidiopsis curvata* HB1 foi utilizada como grupo externo..... 96
- Figura 29 - Organização estrutural dos genes relacionados à fixação do N₂ nas linhagens de *C. raciborskii* A) CENA302, B) CS-505 e C) CENA303..... 101
- Figura 30 - Alinhamento das sequências de aminoácidos codificados pelo gene *hetP* das linhagens *C. raciborskii* CS-505 e CENA303, mostrando a perda de uma parte deste gene na linhagem brasileira 102
- Figura 31 - Organização dos genes referentes à formação da camada glicolipídica do heterócito em linhagens de *C. raciborskii* 104
- Figura 32 - Organização dos genes referentes à formação da camada polissacarídica do heterócito em linhagens de *C. raciborskii* 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores desenhados para amplificação de genes relacionados com a síntese de CYN.....	50
Tabela 2 - Condições testadas para a fragmentação do DNA genômico por sonicação	56
Tabela 3 - Crescimento das linhagens estudadas em diferentes meios de cultivo com e sem fonte de nitrogênio (N)	64
Tabela 4 - Genes de CYN amplificados e sequenciados nas linhagens estudadas	69
Tabela 5 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene <i>cyrI</i> em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN	72
Tabela 6 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene <i>cyrG</i> em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN	72
Tabela 7 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene <i>cyrN</i> em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN	73
Tabela 8 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene <i>cyrH</i> em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN	73
Tabela 9 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene <i>cyrO</i> em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN	73
Tabela 10 - Número de <i>contigs</i> gerados e pares de bases do maior <i>contig</i> com as diferentes abordagens utilizadas na montagem <i>ab initio</i>	80
Tabela 11 - Número de leituras do sequenciamento das linhagens <i>C. raciborskii</i> CENA302 e <i>C. raciborskii</i> CENA303 que mapearam com as referências de agrupamentos gênicos de CYN utilizados e o respectivo tamanho em pares de base (pb) da sequência consenso gerada	81
Tabela 12 - Resultados do BLASTn obtidos utilizando a sequência consenso gerada do mapeamento utilizando como referência o agrupamento gênico de CYN da linhagem <i>C. raciborskii</i> AWT205.	83
Tabela 13 - Número de pares de base (pb) da sequência consenso gerada pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento da linhagem <i>C. raciborskii</i> CENA302 utilizando como referência os genes de cilindropermopsina de diferentes agrupamentos gênicos descritos utilizando o programa <i>CLC Genomics Workbench</i> e a respectiva porcentagem do gene que é representada pela sequência consenso gerada.....	85
Tabela 14 - Número de pares de base (pb) da sequência consenso gerada pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento da linhagem <i>C. raciborskii</i> CENA303 utilizando como referência os genes de cilindropermopsina de diferentes	

agrupamentos gênicos descritos utilizando o programa <i>CLC Genomics Workbench</i> e a respectiva porcentagem do gene que é representada pela sequência consenso gerada.	86
Tabela 15 - Resultados obtidos pelo mapeamento das leituras do sequenciamento genômico da linhagem <i>C. raciborskii</i> CENA302 utilizando como referência os fragmentos gênicos sequenciados pelo método de Sanger	87
Tabela 16 - Resultados obtidos pelo mapeamento das leituras do sequenciamento genômico da linhagem <i>C. raciborskii</i> CENA303 utilizando como referência os fragmentos gênicos sequenciados pelo método de Sanger	87
Tabela 17 - Dados gerados pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento das linhagens <i>C. raciborskii</i> CENA302 e <i>C. raciborskii</i> CENA303 utilizando como referência agrupamentos gênicos de substâncias ativas descritas em cianobactérias	99
Tabela 18 - Valores de similaridade entre as sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela fixação do N ₂ nas linhagens de <i>C. raciborskii</i> CENA302, CENA303 e CS-505	101
Tabela 19 - Genes relacionados à diferenciação dos heterócitos na espécie <i>C. raciborskii</i> . Dados obtidos pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento genômico utilizando como referência os genes descritos na linhagem <i>C. raciborskii</i> CS-505	102
Tabela 20 - Valores de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela formação da camada glicolipídica dos heterócitos em linhagens de <i>C. raciborskii</i>	103
Tabela 21 - Valores de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela formação da camada polissacarídica dos heterócitos em linhagens de <i>C. raciborskii</i>	104

1 INTRODUÇÃO

O interesse no estudo das cianobactérias se baseia especialmente na necessidade do ser humano em entender o passado, o presente e o futuro. Estas bactérias gram-negativas iniciaram sua história evolutiva na Terra há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 2000) e são reconhecidas pela sua indispensável participação na oxigenação da atmosfera terrestre por meio da fotossíntese oxigênica.

A capacidade de realizar a fotossíntese oxigênica é uma característica globalmente distribuída no filo Cyanobacteria, sendo que alguns gêneros possuem ainda a habilidade de fixar o N_2 atmosférico, um dos processos biológicos mais importantes que asseguram a vida na Terra. O processo de fixação biológica do nitrogênio (N_2) em cianobactérias pertencentes à ordem Nostocales ocorre em células vegetativas diferenciadas, conhecidas como heterócitos, característica assegura que a enzima nitrogenase permaneça protegida da ação deletéria do oxigênio. Desta forma, a combinação das rotas metabólicas das cianobactérias permitem a sua ampla distribuição nos mais diversos ambientes.

Os metabólitos secundários produzidos por este filo são alvos de grande parte dos estudos conduzidos com cianobactérias. Estas substâncias podem apresentar atividade citotóxica, anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, imonossupressiva, antiprotease, entre outros. No entanto, os metabólitos mais intensamente estudados são os com ação tóxica, conhecidos como cianotoxinas. Essas substâncias são produzidos por grande parte das cianobactérias já descritas, e podem atuar de diversas formas nos organismos vivos, apresentando efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos ou dermatotóxicos.

Na última década, o alcaloide cilindrospermopsina (CYN), uma família formada por três variantes estruturais (CYN, 7-epi-CYN e 7-deoxi-CYN), tem sido considerada de grande interesse científico devido à sua disseminação em regiões tropicais e temperadas, sendo algumas vezes correlacionada com os fenômenos ocasionados pelo aquecimento global (DYBLE, TESTER; LITAKER, 2006; GALLO et al., 2009). Essa toxina tem efeitos hepatotóxicos, em geral citotóxicos (RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002) e neurotóxicos (KISS et al., 2002), além de ser um potencial carcinógeno (HUMPAGE et al., 2000).

Diversos gêneros de cianobactérias foram descritos como produtores de CYN, entre eles *Cylindrospermopsis* (HAWKINS et al., 1985), *Aphanizomenon* (BANKER et al., 1997; PREUßEL et al., 2006), *Umezakia* (HARADA et al., 1994), *Raphidiopsis* (LI et al., 2001a), *Anabaena* (SPOOF et al., 2006) e *Lyngbya* (SEIFERT et al., 2007), os quais são

frequentemente encontrados em florações detectadas em águas brasileiras. Porém, até o momento, no Brasil esta toxina somente foi detectada em florações e nenhum estudo confirmou a produção de CYN em isolados cianobacterianos. Linhagens de *C. raciborskii* brasileiras são, por outro lado, descritas como produtoras de saxitoxina - STX (LAGOS et al., 1999, HOFF-RISSETI, 2012). Ambas as toxinas (CYN e SXT) parecem estar relacionadas com a aquisição de nutrientes no ambiente (FRANGÓPULOS et al., 2004; BAR-YOSEF et al., 2010). No entanto, um estudo recente mostrou que isolados brasileiros de *C. raciborskii* possuem fragmentos gênicos relacionados á síntese de CYN (HOFF-RISSETI, 2012). Desta forma, o estudo do potencial de produção de compostos secundários tóxicos por esta espécie torna-se importante no âmbito de saúde pública e também para o entendimento das relações evolutivas que ocorrem para formação de diferentes genótipos tóxicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais das cianobactérias

As cianobactérias são um grupo monofilético e altamente diverso de bactérias autotróficas, incluindo 150 gêneros e cerca de 2000 espécies (APELDOORN et al., 2007). A evidência mais direta do surgimento deste grupo de organismos foi a descoberta de amostras de xisto da Austrália Ocidental que continham os compostos 2 α -metilhopanos (BROCKS et al., 1999), responsáveis por conferir rigidez à membrana encontrados em grande parte das cianobactérias, sendo assim considerados como biomarcadores. Estes compostos são úteis uma vez que os três domínios da vida (Bacteria, Archaea e Eucaria) possuem lipídeos de membrana exclusivos contendo esqueletos de carbono recalcitrantes, os quais se transformam em hidrocarbonetos nos sedimentos e podem ser preservados (SUMMONS et al., 1999).

Estudos filogenéticos do gene que codifica para a subunidade 16S da molécula de rRNA indicam uma origem retardatária das cianobactérias em relação à evolução dos procariotos (WOESE, 1987), surgindo após linhagens atualmente associadas com a redução de sulfato (*Thermodesulfobacteriales*), fotossíntese anoxigênica (*Chloroflexales*), fermentação (*Thermotogales*) e quimiolitotrofia (*Aquificales*) (VARGAS et al., 1998). Entre os procariontes fotossintéticos, as cianobactérias constituem o maior, mais diverso e amplamente distribuído grupo, sendo caracterizadas como gram-negativas devido à estrutura e composição química da parede celular. São distinguíveis dos outros dois principais grupos de bactérias fotossintéticas, as bactérias púrpuras e verdes, tanto pela natureza do seu sistema de pigmentos fotossintéticos quanto por sua capacidade de realizar fotossíntese oxigênica, o que lhes confere o caráter fisiológico de fotoautotróficos oxigênicos (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). Por esta razão, seus ancestrais são reconhecidos como responsáveis pela oxigenação da Terra. Neste sentido, a evolução das cianobactérias foi um dos eventos mais significativos na história do desenvolvimento da vida na Terra (CANFIELD et al., 2005). O oxigênio formado na fotossíntese é oceptor final de elétrons utilizado por inúmeros organismos nos processos de obtenção de energia. No entanto, reconstruções filogenéticas das sequências de proteínas da citocromo-oxidase, que catalisam a redução de O₂ para H₂O na respiração aeróbia, indicam uma origem primitiva deste processo (CASTRESANA; SARASTE, 1995), o qual parece ter surgido anteriormente à evolução das cianobactérias. De acordo com Castresana, Lübben e Higgins (1994), a fotossíntese é um processo encontrado apenas em bactérias, e não em arqueias, razão pela qual se aceita que a fotossíntese oxigênica se desenvolveu depois da separação dos domínios Archaea de Bacteria. No entanto,

sequências codificadoras de citocromo-oxidase são encontradas nestes dois grupos de organismos, indicando que um ancestral oxidase evoluiu antes da separação dos mesmos, ou seja, estava presente no último ancestral comum de ambos domínios da vida e, portanto, estavam presentes antes do aparecimento da primeira bactéria fotossintética, e, consequentemente, antes do surgimento do oxigênio na atmosfera devido à fotossíntese oxigênica. Pereira, Santanna e Teixeira (2001) estenderam estes primeiros estudos com análises estruturais de complexos de citocromo-oxidase e concluiu, novamente, que essas enzimas são anteriores à evolução das cianobactérias. Uma possível fonte inicial de O_2 poderia ter sido resultante de reações com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), realizadas por catalases, que nos organismos modernos removem o H_2O_2 para combater o efeito tóxico dos produtos derivados deste composto, como os radicais hidroxila (BLANKENSHIP; HARTMAN 1998), ou reações de fotólise da água podem ter disponibilizado pequenas quantidades de oxigênio em regiões localizadas na superfície dos oceanos (KASTING, 1993), criando ambientes restritos onde houve o início de um metabolismo aeróbio rudimentar.

Apesar destas constatações, a atmosfera essencialmente aeróbia com concentrações de oxigênio ideais para a evolução dos organismos aeróbios somente foi possível após o advento das cianobactérias. Além disso, a capacidade fotossintética de organismos como plantas e algas somente foi possível devido a eventos endossimbióticos entre as cianobactérias e estes organismos, que deram origem aos cloroplastos (AHMED; STAL; HASNAIN, 2010). Certamente, a principal razão para o sucesso das cianobactérias nos mais diversos ambientes é a combinação das suas vias metabólicas. Elas estão entre os poucos grupos que realizam a fotossíntese oxigênica e a respiração simultaneamente, além de algumas espécies serem capazes de fixar o N_2 atmosférico, podendo sobreviver e prosperar em diversas condições ambientais (VERMAAS, 2001).

Devido às suas características fisiológicas, as cianobactérias são de fundamental importância como produtores primários na cadeia trófica, na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia no meio ambiente (RAMAKRISHNAN et al., 2010), assim como possuem diversas vantagens quando utilizadas em processos industriais, entre eles o requerimento de nutrientes simples para sua sobrevivência e reprodução, tolerância a diversas condições ambientais, o uso de CO_2 atmosférico no processo de fotossíntese, gerando aplicações ligadas às mudanças climáticas que visam reduzir as concentrações deste gás de efeito estufa na atmosfera, e sua potencialidade para engenharia genética. Além disso, a maioria dos processos industriais conta com micro-organismos que metabolizam carboidratos para gerar uma gama

diversificada de produtos químicos valiosos, tais como aminoácidos, vitaminas e ácidos orgânicos. Neste contexto, o custo da matéria-prima é uma fração significativa do custo total da produção. O uso de organismos fotossintéticos oferece uma abordagem de produção alternativa, em que os custos de matéria-prima de carboidratos seriam eliminados. Além disso, com a problemática do aquecimento global, há um interesse crescente em processos em que o CO_2 é capturado para a síntese química através do uso de micro-organismos fotossintéticos (DUCAT; WAY; SILVER, 2011). Desta forma, as cianobactérias têm sido estudadas no ramo alimentício, farmacêutico e agrícola pelo seu alto valor nutritivo, potencial farmacológico e pela influência que exercem sobre a fertilidade de solos e qualidade das águas (CARNEIRO; LEITE, 2007).

Apesar das inúmeras aplicações biotecnológicas das cianobactérias, estes micro-organismos são produtores de toxinas, que podem apresentar efeitos neurotóxicos, dermatotóxicos, hepatotóxicos e citotóxicos de acordo com o seu mecanismo de ação. Desta forma, seu uso na agricultura, bem como na indústria, deve levar em consideração seu efeito tóxico. Outro problema de grande impacto para a saúde pública é a presença de florações de cianobactérias tóxicas nas águas utilizadas para abastecimento e recreação. Daí o principal interesse em estudos sobre os impactos no meio ambiente e na saúde gerados pelas cianotoxinas.

2.2 Fixação do N_2 atmosférico por cianobactérias

O nitrogênio é um dos elementos indispensáveis para qualquer organismo vivo, fazendo parte de componentes essenciais como aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, peptideoglicano e açúcares aminados. Na natureza, o nitrogênio é encontrado tanto na forma inorgânica quanto orgânica, sendo a primeira a mais abundante, representada pela porção de amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) e N_2 . A amônia e o nitrato são facilmente assimilados pelos organismos vivos, enquanto que o N_2 atmosférico necessita ser reduzido pelo processo de fixação do N_2 atmosférico, sendo este processo crucial para o desenvolvimento da vida na Terra, sendo realizado apenas por alguns organismos vivos.

A ocorrência esporádica da fixação do N_2 dentro do grupo dos procariontes sugere que esta capacidade surgiu durante seu período inicial de evolução, sendo esta informação genética perdida em muitas linhagens devido à adaptação a mudanças nas condições ambientais (BÖHME, 1998). Quando presente nas cianobactérias, a fixação biológica do N_2 é realizada por proteínas codificadas pelos genes *nif*. A enzima central é a nitrogenase, um complexo de metaloproteínas com estrutura e mecanismo de ação conservados entre os

organismos fixadores (MAZUR; RICE; HASELKORN, 1980; RUVKUN; AUSUBEL, 1980). A nitrogenase é uma combinação de duas proteínas, conhecidas como proteína dinitrogenase (MoFe, molibdênio-ferro dependente) e a proteína dinitrogenase redutase (Fe, ferro dependente). A primeira contém o sítio ativo para fixação do N_2 enquanto que a segunda tem função de doadora de elétrons ATP dependente.

A dinitrogenase possui aproximadamente 250 KDa e é composta por quatro subunidades, formando o heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$. As subunidades α e β são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente. A dinitrogenase redutase é um homodímero γ_2 , codificado pelo gene *nifH* (LATYSHEVA et al., 2012). Outros genes também expressam proteínas relacionadas a este processo biológico. NifB e NifX participam da síntese do cofator MoFe, NifS está envolvida na formação da cisteína dessulfurase, NifU no processamento da dinitrogenase, NifE participa da síntese a inserção do cofator FeMo na dinitrogenase e NifW tem função relacionada à proteção da nitrogenase contra a ação deletéria do oxigênio (CANNON et al., 1985). Ainda ocorrem as ferridoxinas que transferem elétrons para dinitrogenase redutase durante a catálise da nitrogenase (ORME-JOHNSON, 1985), e os genes *hesA* e *hesB* codificam para uma proteína de ligação ao NAD/FAD e uma proteína acessório, respectivamente (STUCKEN et al., 2010).

Por produzirem oxigênio molecular no processo de fotossíntese, as cianobactérias fixadoras de N_2 apresentam adaptações evolutivas que protegem a enzima nitrogenase da ação deletéria do oxigênio. Estas adaptações incluem uma separação temporal durante o fotoperíodo, onde a fixação do N_2 ocorre durante a fase escura e a fotossíntese durante a fase clara, e em outros casos ocorre uma segregação espacial, na qual a fixação de N_2 encontra-se confinada em uma célula especializada, chamada heterócito (BERMAN-FRANK et al., 2011). Existe ainda um terceiro tipo híbrido, ou seja, apresenta separação tanto espacial quanto temporal do processo de fixação do N_2 e fotossíntese, além daqueles organismos fixadores que se desenvolvem em ambientes microaerofílicos (FIORE; HONDA, 2008). Esta função metabólica é fundamental na formação de associações simbióticas de cianobactérias com outras bactérias, bem como com os eucariontes, onde a função da simbiose é fornecer a seu hospedeiro o nitrogênio fixado (AHMED; STAL; HASNAIN; 2010). O simbiote pode obter carbono orgânico ou nutrientes dos hospedeiros e também ser protegido de predadores ou de condições ambientais extremas, tais como a alta intensidade luminosa ou dessecação. A capacidade de fixação do N_2 também é essencial para prevalência destes organismos em florações e sua distribuição cosmopolita na Terra.

2.3 O gênero *Cylindrospermopsis*

Cylindrospermopsis (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju 1972 pertence à ordem Nostocales, família Nostocaceae (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005). Filogeneticamente, esse gênero está mais proximamente relacionado com o gênero *Rhaphidiopsis* (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2010). A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi descrita em 1912 a partir de amostras planctônicas de lagos localizados em Java, na Indonésia, e foi inicialmente classificada como *Anabaena raciborskii* (WOLOSZYNSKA, 1912). Posteriormente, após a descrição do gênero *Anabaenopsis* (MILLER, 1923), a espécie *Anabaena raciborskii* foi renomeada *Anabaenopsis raciborskii* principalmente devido à semelhança na posição terminal dos heterócitos (ELENKIN, 1923). Entretanto, estudos posteriores mostraram diferenças no desenvolvimento dos heterócitos, sendo que em *Anabaenopsis* os heterócitos são formados a partir da divisão desigual de duas células intercalares contíguas e posterior quebra do tricoma, enquanto que em *Cylindrospermopsis* também ocorre uma divisão celular desigual antes da formação dos heterócitos, no entanto, eles se desenvolvem a partir de células terminais (SINGH, 1962). Em decorrência dessas observações, em 1972 foi proposta a criação de um novo gênero, *Cylindrospermopsis*, designando *C. raciborskii* AWT205 (Figura 1) como a linhagem-tipo (SEENAYYA; SUBBA RAJU, 1972), isolada do reservatório de um lago ornamental (Oatley Pond) em Sidney, Austrália (HAWKINS et al., 1997; CASTENHOLZ, 2001). Desde então, nove novas espécies foram descritas, sendo elas *C. acuminato-crispa* (COUTE; BOUVY, 2004), *C. africana* (KOMÁREK; KLING, 1991), *C. catemaca* (KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ; TAVERA, 1996), *C. curvispora* (WATANABE, 1995), *C. cuspis* (KOMÁREK; KLING, 1991), *C. helicoidea* (CRONBERG; KOMÁREK, 2003), *C. philippinensis*, *C. tavae* e *C. sinuosa* (COUTE; LEITÃO; SARMENTO, 2004).

As principais características morfológicas do gênero *Cylindrospermopsis* são: filamentos isopolares, solitários, retos ou espiralados, com flutuação livre, cilíndricos ou ligeiramente estreitados em ambas as extremidades; desenvolvimento de heterócito apenas a partir de células terminais, estreitas, após a divisão celular assimétrica da parte apical menor; desenvolvimento de acinetos facultativamente ao lado ou um pouco distante dos heterócitos, solitários, em pares ou em pequenas séries (KOMÁRKOVÁ, 1998). Esses micro-organismos planctônicos dulciaquícolas fixadores de N₂ atmosférico possuem a habilidade de migrar pela coluna d'água à procura de melhores condições para crescimento devido à presença de aerótopos (SHAFIK et al., 2003). Essas características proporcionam vantagem competitiva deste gênero em relação a outros organismos fitoplanctônicos e, quando sob condições

ótimas, como pH acima de 7,5, temperatura média acima de 25 °C, baixa intensidade luminosa e baixas concentrações de nitrogênio e fósforo inorgânico dissolvidos (PADISÁK, 1997; BRIAND et al., 2002; MISCHKE, 2003), podem apresentar crescimento exagerado, caracterizando as florações.

Figura 1 - Linhagens representativas do gênero *C. raciborskii*: A-E: CENA302; F-G: CENA303, H: CYP-011K. As indicações em vermelho representam as estruturas: a) acineto e h) heterócito

A espécie *C. raciborskii* foi descrita originalmente como sendo uma espécie tropical (WOLOSZYNSKA, 1912). Entretanto, sua presença já foi documentada em todos os continentes, frequentemente como componente de florações em lagos e reservatórios, inclusive de regiões temperadas (PADISÁK, 1997; BRIAND et al., 2004; WIEDNER et al., 2007). O sucesso ecológico desta espécie parece estar relacionada à sua capacidade de tolerar um vasto leque de condições climáticas (BERGER et al., 2006). No Brasil, embora existam registros da ocorrência das espécies *C. phillipinensis*, *C. catemaco* (HUSZAR et al., 2000) e *C. acuminato crispata* (COUTÉ; BOUVY, 2004), a espécie *C. raciborskii* tem sido predominantemente encontrada em corpos-d'água de todo o país. A primeira informação de ocorrência de população de *C. raciborskii* foi registrada para o Lago Paranoá, em Brasília, em 1969 (BRANCO; SENNA, 1991). Nos anos 80, essa espécie foi documentada nos levantamentos florísticos realizados na represa de Serraria, SP (SANT'ANNA; XAVIER; SORMUS, 1988) e na Lagoa dos Patos, RS (TORGAN; GARCIA, 1989). Desde então,

inúmeros relatos sobre a ocorrência de *C. raciborskii* no Brasil foram publicados (SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; PEDROSA; CALASANS; REZENDE, 1999; KOMÁRKOVÁ; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999; LAGOS et al., 1999; BOUVY et al., 1999; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000; BOUVY et al., 2000, 2003; CHELLAPPA; COSTA, 2003; TUCCI; SANT'ANNA, 2003; YUNES; PROENÇA; MONSERRAT, 2003; COUTÉ; BOUVY 2004; COSTA et al., 2006; SANT'ANNA et al., 2007; SOARES; HUZCAR; ROLAND, 2007; CHELLAPPA; BORBA; ROCHA, 2008; CROSSETTI; BICUDO, 2008; DANTAS et al., 2008; FONSECA; BICUDO, 2008; FERRÃO-FILHO et al., 2009; FIGUEREDO; GIANI, 2009; GEMELGO; MUCCI; NAVAS-PEREIRA, 2009; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009; SOARES et al., 2009). No Estado de São Paulo, existem registros de *C. raciborskii* para o Lago das Garças, no Instituto de Botânica de São Paulo (LAGOS et al., 1999; TUCCI; SANT'ANNA, 2003; CROSSETTI; BICUDO, 2008; FONSECA; BICUDO, 2008), para a represa Billings (SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; YUNES; PROENÇA, MONSERRAT, 2003; SANT'ANNA et al., 2007; GEMELGO; MUCCI; NAVAS-PEREIRA, 2009; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009), para os reservatórios Jundiaí, Ponte Nova e Pirapora (SANT'ANNA et al., 2007) e para a represa de Serraria (SANT'ANNA; XAVIER; SORMUS, 1988).

A presença de *C. raciborskii* em corpos-d'água, principalmente aqueles utilizados para captação de água para abastecimento público é preocupante devido à sua capacidade de produção de cianotoxinas. Até 1999, isolados dessa espécie de cianobactéria eram conhecidos pela produção do alcaloide citotóxico CYN (OHTANI; MOORE; RUNNEGAR, 1992; NEILAN et al., 2003; CHONUDOMKUL et al., 2004; FALCONER; HUMPAGE, 2006), confirmado em inúmeros estudos realizados em linhagens de *C. raciborskii* de vários países (HAWKINS et al., 1997; SAKER; THOMAS; NORTON, 1999; LI et al., 2001b; BERNARD et al., 2003; FASTNER et al., 2003; SAKER et al., 2003; WOOD; STIRLING 2003; CHONUDOMKUL et al., 2004). Entretanto, não existem relatos de produção dessa toxina por linhagens brasileiras dessa espécie. Os registros da ocorrência de CYN no Brasil referem-se ao encontrado no carbono e resina do sistema de tratamento de água de uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco (AZEVEDO et al., 2002) e recentemente em uma floração de *C. raciborskii* e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, anteriormente conhecida como *Aphanizomenon aphanizomenoides* (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011). Porém, estudos com linhagens de *C. raciborskii* isoladas de regiões brasileiras mostraram que elas produziam análogos da neurotoxina saxitoxina – STX (LAGOS et al., 1999, HOFF-RISSETI et al., 2012). Desde então, as análises químicas realizadas em isolados brasileiros de *C.*

raciborskii mostram a produção dessas neurotoxinas (MOLICA et al., 2002; FERRÃO-FILHO et al., 2010) e não de CYN (KELLMANN; MILLIS; NEILAN, 2006). Outras duas linhagens de *C. raciborskii*, ITEP-018 e CYRF-01, isoladas do reservatório Tabocas, Pernambuco (MOLICA et al., 2002), e do reservatório Funil, Resende, Rio de Janeiro (FERRÃO-FILHO et al., 2010), respectivamente, também mostraram produção de análogos de STX e não de CYN. Entretanto, recentemente, fragmentos de genes envolvidos com a síntese de CYN (*cyrA*, *cyrB* e *cyrC*) foram amplificados e sequenciados em linhagens brasileiras de *C. raciborskii* isoladas de ambientes aquáticos, apresentando similaridade significativa com os mesmos genes em linhagens produtoras de CYN e indicando o potencial da produção desta toxina por tais linhagens (HOFF-RISSETI et al., 2012).

2.4 Síntese de metabólitos secundários por cianobactérias

Em contraste com o metabolismo primário, o metabolismo secundário não é vital para a manutenção das atividades celulares básicas, como o crescimento e reprodução. Em função disso, o metabolismo primário tende a ser conservado entre todos os organismos ou em um grupo de organismos, enquanto que os produtos derivados do metabolismo secundário são mais diversos e muitas vezes específicos para determinadas espécies ou até mesmo isolados (SASSO et al., 2011), tornando os organismos produtores destes metabólitos atrativos devido à maior possibilidade de se encontrar novos compostos que apresentem bioatividade.

As cianobactérias são produtoras de uma vasta gama de metabólitos secundários, apresentando funções desde a inibição de enzimas até efeitos tóxicos em procariontes e eucariontes, sendo que os peptídeos são um dos principais grupos. Investigações sobre a bioquímica responsável pela formação destes peptídeos revelaram a ocorrência de dois tipos de mecanismo: a síntese ribossomal com subsequente modificação pós-transcricional e processamento, e a síntese não-ribossomal por meio da ação de peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS, do inglês “*non-ribosomal peptide synthetase*”) e policetídeos sintase tipo I (PKS, do inglês “*polyketide synthase*”), sendo este último exclusivo do metabolismo secundário (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011). A principal diferença entre os dois mecanismos é que a síntese ribossomal é limitada a um conjunto de 20 aminoácidos para a formação dos peptídeos, ao passo que cerca de 300 substratos podem ser utilizados na síntese não ribossomal, gerando uma grande diversidade de estruturas (FINKING; MARAHIEL, 2004; KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011).

As NRPS possuem uma estrutura modular (Figura 2A), sendo que cada módulo é responsável pela incorporação ou modificação do aminoácido (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; von DÖHREN et al., 1997). Estes módulos são constituídos por diferentes domínios, entre eles o domínio de adenilação (~550 aminoácidos), responsável pelo reconhecimento e seleção do aminoácido que será incorporado, ou seja, controla a sequência primária do peptídeo final, e também pela ativação do aminoácido; o domínio PCP (*Peptidyl Carrier Protein*, ~80 – 100 aa) responsável pelo transporte dos aminoácidos de um centro catalítico para o próximo; o domínio de condensação (~450 aa), responsável pela formação da ligação peptídica, sendo por isso o módulo central da síntese não ribossomal por garantir o alongamento da cadeia polipeptídica; e o domínio tioesterase (~250 aa) que é importante para a liberação do produto (FINKING; MARAHIEL, 2004; BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). Porém, outros domínios também podem fazer parte da estrutura de uma NRPS, entre eles o metiltransferase (MT), epimerase (E) e halogenase (ROUNGE et al., 2009), ou ainda os módulos podem conter apenas um domínio (WELKER; von DOHREN, 2006). Em bactérias, estes módulos são normalmente distribuídos em várias NRPS, cujos genes estão organizados na forma de agrupamento (FINKING; MARAHIEL, 2004). As NRPS fazem parte da síntese de microcistina (TILLET et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2004), cianopeptolina (ROUHIAINEN et al., 2000; TOOMING-KLUNDERUD et al., 2007; ROUNGE et al., 2007), aeruginosina (ISHIDA et al., 2009), STX (KELLMANN et al., 2008), CYN (MIHALI et al., 2008; MAZMOUZ et al., 2010; STÜKEN; JAKOBSEN, 2010), entre outros compostos sintetizados por cianobactérias.

As enzimas PKS do tipo I, assim como as NRPS, são enzimas multifuncionais organizadas em módulos (Figura 2B), porém utilizam diferentes tipos de ácidos carboxílicos para a síntese do composto final. Normalmente, são compostas pelos domínios cetossintase (KS, do inglês “*ketosynthase*”), aciltransferase (AT, do inglês “*acyltransferase*”), cetorredutase (KR, do inglês “*ketoreductase*”), desidratase (DH, do inglês “*dehydratase*”), enoil-redutase (ER, do inglês “*enoyl reductase*”) e proteína carreadora de acila (ACP, do inglês “*acyl carrier protein*”) (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011).

Figura 2 - Representação esquemática dos domínios enzimáticos de: A) NRPS e B) PKS. Abreviações: C: domínio de condensação; A: domínio de adenilação; PCP: proteína carreadora de peptídeo; MT: metiltransferase; E: epimerase; AT: aciltransferase; ACP: proteína carreadora de acila; KS: cetossintase; KR: cetorreductase; DH: desidratase; ER: enoil-redutase; TE: tioesterase. Adaptado de (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011)

A maioria dos metabólitos bioativos isolados de cianobactérias são policetídeos, peptídeos não ribossomais, ou híbridos destas duas classes. As cianotoxinas são metabólitos secundários sintetizados por cerca de 40 espécies de cianobactérias (CARMICHAEL, 1992; von DÖHREN et al., 1997). A síntese destes metabólitos utiliza uma grande variedade de substratos, muitos dos quais são aminoácidos não proteicos, hidroxiácidos e substâncias policetônicas, especialmente elaborados para serem incorporados na estrutura peptídica. Portanto, muitas vezes, na estrutura de uma mesma molécula observam-se ligações peptídicas, funções cetônicas, insaturações e funções aromáticas (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; von DÖHREN et al., 1997).

2.4.1 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYN - $C_{15}H_{21}N_5O_7S$) pertence à classe dos alcaloides, contendo uma porção guanidino central funcional e uma hidroximetil uracila ligada a um esqueleto de carbono tricíclico, apresentando uma massa molecular de 415 Da (Figura 3, OHTANI; MOORE; RUNNEGAR, 1992). Essa toxina possui efeitos hepatotóxicos, em geral citotóxicos (RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002) e neurotóxicos (KISS et al., 2002), além de ser um potencial carcinógeno (HUMPAGE et al., 2000). A CYN foi identificada pela primeira vez em 1979 quando 148 indígenas da Ilha de Palm em Queensland, Austrália, foram hospitalizados com sintomas de hepatointerite após a ingestão de água da represa Solomon, sendo este incidente associado à presença de floração de *C. raciborskii* (HAWKINS et al.,

1985). Posteriormente, a estrutura dessa toxina foi identificada e ela recebeu o nome de CYN (OHTANI; MOORE; RUNNEGAR, 1992). Desde então, além de representantes do gênero *Cylindrospermopsis*, a CYN já foi encontrada em linhagens dos gêneros *Aphanizomenon* (BANKER et al., 1997; PREUßEL et al., 2006), *Umezakia* (HARADA et al., 1994), *Raphidiopsis* (LI et al., 2001a), *Anabaena* (SPOOF et al., 2006) e *Lyngbya* (SEIFERT et al., 2007).

A toxicidade de CYN é mediada pela inibição da glutatona da síntese proteica e do citocromo P450 (RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002; FROSCIO et al., 2003), sendo que em mamíferos o envenenamento pode causar danos no fígado, rim, baço, coração e outros órgãos (TERAO et al., 1994; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Em camundongos a DL₅₀ (ip.) após 24 horas é de 2 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, enquanto que após cinco dias a DL₅₀ (ip.) passa a ser de 0,2 mg.Kg⁻¹ (TERAO et al., 1994). Por administração via oral, a DL₅₀ após cinco dias é de aproximadamente 6 mg.Kg⁻¹ (SEAWRIGHT et al., 1999). Até o momento, apenas duas variantes estruturais naturais desta toxina foram descritas, a 7-epi-CYN produzida por *Aphanizomenon ovalisporium* e *Oscillatoria* sp. PCC6506 (BANKER et al., 2000; MAZMOUZ et al., 2010) e 7-deoxi-CYN produzida por *C. raciborskii*, *Raphidiopsis curvata* e *Lyngbya wollei* (NORRIS et al., 1999; LI et al., 2001a, 2001b; SEIFERT et al., 2007), sendo que a 7-epi-CYN é considerada tão tóxica como a CYN (Figura 3).

A portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) exige o monitoramento de cianobactérias, tentando identificar os diferentes gêneros presentes no ponto de captação do manancial superficial, além da realização de análises de clorofila-a para indicar o potencial aumento da densidade de cianobactérias. A análise de CYN deve ser realizada quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores desta toxina, observando o valor máximo aceitável de 1,0 µg.L⁻¹ da toxina. Quando detectada a presença de CYN e de outras cianotoxinas na água tratada, é obrigatória a comunicação imediata às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis. Este valor de 1,0 µg.L⁻¹ foi primeiramente adotado no *Guide-lines for Drinking-water Quality Management* da Nova Zelândia, revisto em 2008, e se baseou na identificação experimental da dose oral máxima a qual um animal pode ser continuamente exposto ao longo de um período crônico ou subcrônico sem qualquer efeito adverso significativo, chamado de “no-observed-adverse-effect level” (NOAEL), que foi considerado de 30 mg.kg⁻¹ de massa corpórea para CYN (HUMPAGE; FALCONER, 2003).

Variante	R1	R2	Massa molecular
CYN (7- <i>R</i>)	OH	H	415,42
7-Epi-CYN (7- <i>S</i>)	H	OH	415,42
7-Deoxi-CYN	H	H	399,42

Figura 3 - Estrutura da cilindrospermopsina (CYN) e suas variantes naturais (MAZMOUZ et al., 2010)

2.4.1.1 Métodos de detecção de CYN

Até o desenvolvimento de métodos de detecção analíticos e moleculares da presença de CYN, devido à inexistência de uma relação entre características fisiológicas e morfológicas com a produção de toxina, era complexo determinar sua produção, uma vez que se baseava apenas em bioensaios com animais (bactérias, invertebrados e ratos) (LI et al., 2001a; 2001b; GRIFFITHS; SAKER, 2003; MOHAMED, 2007; PEARSON; NEILAN, 2008; BERRY et al., 2009). Estes métodos têm como principal desvantagem não permitir a determinação de baixas concentrações de cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999; MASANGO et al., 2008), além de serem poucos sensíveis, apresentarem custos elevados, além das questões relacionadas à bioética (PEARSON; NEILAN, 2008).

O desenvolvimento de métodos analíticos mais robustos para o monitoramento de toxinas de cianobactérias em amostras ambientais tem sido alvo de inúmeros estudos. A determinação de CYN pode ser realizada utilizando diversas técnicas analíticas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou do inglês HPLC, “*High Performance Liquid Chromatography*”) com detecção de UV foi utilizada por diversos autores para detecção e quantificação de CYN (HAWKINS et al., 2001; WELKER; BICKEL; FASTNER, 2002; GRIFFITHS; SAKER, 2003; BRIENT et al., 2009; KOKOCINSKI et al., 2009). Esta técnica permite providenciar uma informação quantitativa e qualitativa, contudo, para tal análise são necessários padrões da toxina purificada, os quais por vezes são difíceis de serem obtidos, além de necessitar de grandes volumes de amostra quando a toxina se encontra em baixas concentrações, e de passos para purificação das amostras (RIVASSEAU et al., 1999; RAPALA et al., 2002; MATHYS; SURHOLT, 2004; SANGOLKAR; MASKE;

CHAKRABARTI, 2006; PEARSON; NEILAN, 2008). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a LC-MS/MS também são métodos muito difundidos que fornecem resultados mais precisos sobre a presença desta toxina, bem como disponibilizam dados referentes aos picos gerados pela ionização e fragmentação da molécula (CHISWELL et al., 1999; FALCONER et al., 1999; NORRIS et al., 1999; LI et al., 2001a; LI et al., 2001b; FASTNER et al., 2003; HUMPAGE et al., 2005; FROSCIO et al., 2008; RASMUSSEN et al., 2008; YLMAZ et al., 2008; BLÁHOVÁ et al., 2009; GALLO et al., 2009; PREUßEL et al., 2009; MAZMOUZ et al., 2010; MEREL et al., 2010; ANTAL et al., 2011; BALLOT et al., 2011; EVERSON et al., 2011; MAZMOUZ et al., 2011; Mc GREGOR et al., 2011).

Outra metodologia empregada baseia-se nos ensaios imunológicos com anticorpos mono ou policlonais (SANGOLKAR; MASKE; CHAKRABARTI, 2006). O teste ELISA (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) é rápido e requer pouca quantidade de amostra, sendo capaz de detectar quantidades dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Este método já foi utilizado com o objetivo de avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de CYN (BLÁHOVÁ et al., 2009, MAZMOUZ et al., 2010, STÜKEN; JAKOBSEN, 2010), sendo que a principal vantagem quando comparado com as técnicas que utilizam a cromatografia líquida é o menor limite de detecção (METCALF; CODD, 2003). Apesar disto, a elevada variação estrutural que ocorre entre as diferentes variantes de uma mesma cianotoxina pode levar a reações cruzadas entre os anticorpos com diferentes variantes da toxina ou com outros compostos que possam estar presentes nas amostras, podendo não exprimir corretamente os valores de concentração da toxina (RAPALA et al., 2002; SANGOLKAR; MASKE; CHAKRABARTI, 2006), além de não providenciar informação sobre as variantes que estão sendo produzidas (MASANGO et al., 2008).

2.4.1.2 Genes envolvidos na biossíntese de CYN

No ano de 2000 foi proposto que na biossíntese da CYN o guanidinoacetato era o substrato inicial para uma enzima PKS, sendo que sucessivas adições de cinco unidades intactas de acetato no guanidinoacetato e reações complementares, tais como C-metilação, sulfotransferência e ciclização completavam a síntese da molécula (BURGOYNE et al., 2000). Em 2002, três genes, *aoaA*, *aoaB* e *aoaC*, supostamente envolvidos na biossíntese de CYN foram identificados em *Aphanizomenon ovalisporum*, os quais codificam as enzimas amidinotransferase, NRPS/PKS híbrida e PKS, respectivamente (SHALEV-ALON et al., 2002). Em 2008, o agrupamento gênico da biossíntese da CYN (*cyr*) da *C. raciborskii*

AWT205 foi completamente sequenciado (MIHALI et al., 2008). Esse agrupamento possui 43 kb e contém 15 genes que codificam todas as funções necessárias para a biossíntese, regulação e exportação da toxina (Figura 4A).

O primeiro passo na formação do esqueleto de carbono da CYN envolve a síntese de guanidinoacetato pela transamidinação da glicina (Figura 5). Uma amidinotransferase codificada pelo gene *cyrA* transfere um grupo guanidino da arginina para a glicina, formando guanidinoacetato. Na segunda etapa, uma NRPS/PKS híbrida codificada pelo gene *cyrB* ativa o guanidinoacetato, que é então transferido, via PCP, para o domínio β -cetossintase (KS). O domínio aciltransferase (AT) da enzima CyrB ativa o malonil-CoA e liga-o à proteína carreadora de acila (ACP). Em seguida, no domínio KS, ocorre uma reação de condensação entre o guanidinoacetato ativado e o malonil-CoA. O domínio da metiltransferase (MT), identificado em CyrB, realiza a metilação do C-13. A CyrB contém dois módulos de redução, cetorredutase (KR) e desidratase (DH). Essas duas reações combinadas reduzem o grupo ceto a uma hidroxila, seguido pela eliminação de H₂O, resultando em uma dupla ligação entre C-13 e C-14. Um ataque nucleofílico do grupo amidino no N-19 na recém-formada ligação dupla entre C-13 e C-14, ocorre via reação de adição de Michael. A ciclização segue as regras de Baldwin para o fechamento do anel (BALDWIN et al., 1977), resultando na formação do primeiro anel da CYN. Essa reação pode ser espontânea e não exigir a catálise enzimática, pois é energeticamente favorável.

Figura 4 - Agrupamentos gênicos de CYN em três gêneros de cianobactéria. A. *C. raciborskii* AWT205; B. *Oscillatoria* sp. PCC6506, C. *Aphanizomenon* sp. Adaptado de MAZMOUZ et al. (2010); MIHALI et al. (2008); STÜKEN; JAKOBSEN (2010)

Figura 5 - Via biosintética da CYN. (Adaptado de MIHALI et al., 2008)

A terceira etapa da biossíntese da CYN envolve o gene *cyrC*, que codifica uma PKS que apresenta os domínios KS, AT, KR e ACP. A ação desses domínios resulta no alongamento da cadeia crescente por um acetato via ativação do malonil-CoA pelo domínio AT, sua transferência para o ACP e condensação no domínio KS com o produto da CyrB. A

cadeia alongada é ligada ao ACP da CyrC, e o domínio KR reduz o grupo ceto a um grupo hidroxila no C-12. Em seguida ocorre a ação da enzima CyrD, uma PKS. A ação do módulo PKS no produto da CyrC resulta na adição de um acetato e redução do grupo ceto no C-10 a uma hidroxila e desidratação de uma dupla ligação entre C-9 e C-10. Essa dupla ligação é o sítio de um ataque nucleofílico pelo grupo amidino do N-19 via reação de adição de Michael, que também segue as regras de Baldwin para o fechamento do anel, resultando na formação do segundo anel da CYN. O intermediário produzido por CyrD é o substrato para CyrE (etapa 5). A enzima PKS, CyrE, catalisa a adição de um acetato e a formação de uma dupla ligação entre C-7 e C-8. Essa dupla ligação é atacada por N-18 via reação de adição de Michael, ocorrendo a terceira ciclização. O gene *cyrF* codifica o último módulo PKS, contendo domínios KS, AT e ACP. A enzima CyrF atua sobre o produto da CyrE e alonga a cadeia pela adição de um acetato, deixando o C-4 e C-6 não reduzidos.

A etapa 7 envolve a formação do anel uracila, o qual é crucial para a toxicidade da CYN. Essa etapa consiste de duas enzimas, CyrG e CyrH, que são semelhantes às enzimas da família amido-hidrolases/ureases/di-hidro-orotases, cujos membros catalisam a formação e clivagem de ligações N-C. Essas enzimas transferem um segundo grupo guanidino de uma molécula doadora, tal como a arginina ou ureia, para C-6 e C-4 da CYN, resultando na formação do anel uracila. A primeira reação consiste na formação de uma ligação covalente entre o N do doador guanidino e C-6 da CYN, seguida pela eliminação de H₂O, formando uma dupla ligação entre C-5 e C-6. A segunda reação catalisa a formação de uma ligação entre o segundo N do doador guanidino e C-4 da CYN, concomitantemente com a quebra da ligação tioéster entre a ACP da CyrF e CYN, causando a liberação da molécula do complexo enzimático. A terceira reação catalisa a clivagem do grupo guanidino de outra molécula doadora, que não ureia.

A sulfatação da CYN no C-12 é provavelmente realizada pela ação de uma sulfotransferase. O gene *cyrJ* codifica uma proteína que é muito semelhante à 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS) sulfotransferase-dependente. Enzimas similares foram recentemente relacionadas com a sulfatação de outras cianotoxinas (KELLMANN et al., 2008). O agrupamento gênico da CYN também codifica uma adenilsulfato quinase (ASK), ou seja, CyrN. ASKs são enzimas que catalisam a formação de PAPS, que é o doador de sulfato para as sulfotransferases. A CyrJ sulfata a CYN no C-12, enquanto a CyrN cria o "pool" de PAPS requerido para essa reação. A reação final complementar é realizada pela CyrI, a qual supostamente catalisa a hidroxilação de C-7, um resíduo que, juntamente com o anel de uracila, confere a toxicidade da CYN.

O agrupamento gênico da CYN contém ainda o gene *cyrK*, cujo produto se assemelha à enzima MATE (multidrogas e extrusão de substâncias tóxicas) da família de NorM. CyrK poderia, então, funcionar como uma transportadora de CYN, com base nessa similaridade e na sua localização central no agrupamento. Outro gene relacionado à síntese de CYN é o *cyrO*, que codifica uma proteína hipotética que apresenta similaridade com as proteínas repetitivas WD, as quais têm diversos papéis regulatórios e de transdução de sinal. CyrO também pode ter um papel importante na regulação da transcrição e na ligação do DNA. Ela também tem similaridade com proteínas da família AAA, que frequentemente desempenham funções semelhantes às chaperonas e ajudam na montagem, operação ou desmontagem de complexos proteicos.

No ano de 2010, três novos agrupamentos gênicos *cyr* encontrados nas linhagens *C. raciborskii* CS-505 (STÜKEN et al., 2010), *Oscillatoria* sp. PCC6506 (Figura 4B - MAZMOUZ et al., 2010) e *Aphanizomenon* sp. 10E6 (Figura 4C – STÜKEN; JAKOBSEN, 2010) foram descritos. O agrupamento *cyr* da linhagem australiana *C. raciborskii* CS-505 mostrou perfeita sintenia e alta conservação nas sequências com a também linhagem australiana *C. raciborskii* AWT205 (STÜKEN et al., 2010). Entretanto, o agrupamento *cyr* da linhagem *Aphanizomenon* sp. 10E6, isolada do lago Melangsee, na Alemanha, quando comparado com os das linhagens AWT205 e CS-505 de *C. raciborskii*, mostrou extensos rearranjos na ordem dos genes, mas a conservação das sequências de nucleotídeos de todos os genes foi maior que 95% (STÜKEN; JAKOBSEN, 2010). Além do mais, os genes *cyrL*, *cyrM*, *cyrN* e *cyrO* não foram encontrados no genoma da *Aphanizomenon* sp. 10E6. Da mesma maneira, a linhagem de *Oscillatoria* sp. PCC6506 de origem desconhecida apresentou diferente sintenia, embora as identidades entre os genes correspondentes tenham sido altas, e também os genes *cyrL*, *cyrM*, *cyrN* e *cyrO* também não foram encontrados (MAZMOUZ et al., 2010). Essa topologia variada dos três agrupamentos *cyr* sugere a ocorrência de eventos de transposição múltiplos ao longo da evolução da biossíntese de CYN nas cianobactérias, sugerindo, assim, a necessidade de caracterizar esses genes para cada organismo.

2.5 Sequenciamento genômico de nova geração

Em 1977, Frederick Sanger e colaboradores publicaram dois trabalhos metodológicos sobre a determinação rápida da sequência de DNA (SANGER et al., 1977, SANGER; NICKLEN; COULSON; 1977), que viriam a transformar a biologia como um todo, fornecendo uma ferramenta para decifrar os genes e, mais tarde, genomas completos. O método melhorou drasticamente as metodologias de Maxam e Gilbert, desenvolvidas no

mesmo ano, e o método “*plus and minus*” descritos pelo próprio Sanger e Coulson, publicados dois anos antes. As vantagens da redução do uso de produtos tóxicos e radioisótopos fez o método de “Sequenciamento de Sanger” tornar-se rapidamente a técnica mais utilizada durante os trinta anos que seguiram (SCHUSTER, 2008).

A experiência do sequenciamento do genoma humano pela técnica de Sanger (VENTER et al., 2001; LANDER et al., 2001) demonstrou claramente a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias capazes de gerar uma quantidade imensa de dados a baixo custo. A partir de então a geração de dados genômicos tem crescido expressivamente devido ao desenvolvimento de novos processos de sequenciamento de DNA, realizados a partir de diversas abordagens metodológicas. Esses chamados “sequenciadores de segunda geração” começaram a ser comercializados em 2005, com o lançamento do equipamento 454 GS20 pela empresa *Roche*. O sequenciamento nesta plataforma baseia-se na geração de uma biblioteca de DNA contendo sequências flanqueadoras de adaptadores, os quais são utilizados para imobilizar os fragmentos de DNA e, em seguida, realizado o enriquecimento por meio da PCR em emulsão e a geração das leituras por pirosequenciamento (ANDERSON; SCHRIJVER, 2010). Originalmente descrito em 1996 por Ronaghi e colaboradores, o pirosequenciamento usa a molécula de pirofosfato liberada pela adição de um dNTP durante o processo de extensão. Esta molécula é convertida em ATP pela ação da sulfúrilase, que é então utilizado pela luciferase para converter a luciferina em oxiluciferina, reação que gera luz, a qual pode ser detectada (RONAGHI et al., 1996).

A partir de então, as novas técnicas de sequenciamento evoluíram rapidamente. Em 2007, a empresa Illumina lançou a plataforma Solexa GA, seguida pela plataforma SOLiD (Applied Biosystems) e Heliscope (Helicos). Essas tecnologias promovem o sequenciamento de milhões de pares de bases em uma única corrida (CARVALHO; SILVA, 2010), no entanto, diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, volume de dados gerados, precisão de bases, tamanho do fragmento gerado por leitura e custo operacional (McCLEAN; JONES; STUDHOLME, 2009)

O sequenciamento utilizando a plataforma Illumina difere da estratégia utilizada no equipamento 454 e SOLiD especialmente por realizar a amplificação dos fragmentos *in situ*, ou seja, na própria superfície de clonagem (*flow cell*), não sendo necessária a PCR em emulsão (ANDERSON; SCHRIJVER, 2010). Além disso, o sequenciamento nesta plataforma, assim como no sequenciamento de Sanger, é realizado pela ação da enzima DNA polimerase capaz de incorporar nucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos (ANSORGE, 2009).

Na *flow cell* adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados. Uma vez que os fragmentos de DNA da amostra também são ligados a adaptadores em ambas as extremidades durante o preparo da biblioteca genômica, é possível fixá-los à *flow cell* por hibridização a um dos adaptadores fixados (Figura 6 B).

No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que ocorra a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados à sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em forma de “ponte” na superfície de sequenciamento (Figura 6C), e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte” (Figura 6D). No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas (Figura 6E). Esses ciclos são repetidos 35 vezes e, assim, as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de sequenciamento (Figura 6F) que possui aproximadamente 1.000 clones (SHENDURE; JI, 2008). Após os ciclos de desnaturação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada *cluster* (Figura 6G). A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência, gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores, tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada (Figura 6H). Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção da porção 3' bloqueado, e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior, para que a reação de sequenciamento prossiga (Figura 6I). A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. A maior fonte de erros é a incorporação errônea de nucleotídeos, a remoção incompleta do marcador fluorescente ou do terminador (ANDERSON; SCHRIJVER, 2010).

Para as cianobactérias a era genômica iniciou-se no ano de 1996, quando o genoma da linhagem unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 foi completamente sequenciado utilizando 107 clones de cosmídeos, 15 clones lambda e 17 produtos de PCR, contendo aproximadamente 3,5 Mb (KANEKO et al., 1996). As informações geradas permitiram revelar a estrutura do genoma, identificar genes e mapear as posições relativas de cada gene

no genoma. Além disso, a função de aproximadamente metade dos genes foi deduzida, baseando-se na similaridade da sequência com genes que apresentam função conhecida. Um dos fatos importantes também foi o estudo da maquinaria fotossintética destas bactérias. Desde então, aproximadamente 90 linhagens de cianobactérias têm sido completamente sequenciadas, incluindo representantes filamentosas, unicelulares, heterocitadas e homocitadas. A linhagem *C. raciborskii* CS-505 foi recentemente sequenciada, mas seu genoma ainda encontra-se na forma de *draft* no banco de dados do NCBI, apresentando um conteúdo % GC de 40,2 e 3.501 genes (STUCKEN et al., 2010).

Figura 6 – Etapas do sequenciamento utilizando a plataforma Illumina HiScan SQ

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi realizar análise genômica em isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii* visando principalmente verificar a presença de genes de CYN, avaliar o potencial genético para síntese de alguns outros metabólitos secundários já descritos em outros gêneros de cianobactérias, além de caracterizar agrupamentos gênicos envolvidos com a fixação biológica de N₂ e diferenciação de heterócitos.

Os objetivos específicos foram:

I) Avaliar a produção de CYN em dois isolados brasileiros em diferentes condições nutricionais;

II) Desenvolver iniciadores para amplificação de fragmentos de genes relacionados à síntese de CYN e detectar sua presença nos dois isolados brasileiros;

III) Realizar o sequenciamento genômico das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303;

IV) Utilizar os dados gerados no sequenciamento genômico das duas linhagens para mapeamentos e buscas por genes relacionados à síntese de metabólitos secundários, com foco principal na CYN e genes relacionados à fixação biológica do N₂ e diferenciação dos heterócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens utilizadas e manutenção

Neste estudo foram utilizados os isolados brasileiros *C. raciborskii* CENA302 e *C. raciborskii* CENA303 e o isolado australiano *C. raciborskii* CYP-011K. A linhagem *C. raciborskii* CENA302 foi isolada em maio de 2008, pelo então estudante de doutorado Ricardo Yukio Honda do braço Riacho Grande (23°46'33.9"S 46°31'54.4"L) da Represa Billings, município de São Bernardo do Campo, SP (Figura 7A). A represa Billings é um dos maiores e mais importantes reservatórios de água da Região Metropolitana de São Paulo, sendo que o braço Riacho Grande é utilizado para abastecimento de água potável e também para pesca amadora. A linhagem *C. raciborskii* CENA303 foi isolada em julho de 2009 no Lago Theobaldo Dick (29°27'54.47"S, 51°58'15.51"L), localizado na cidade de Lajeado, RS (Figura 7B) e cedida pela Professora Dra. Vera Regina Werner do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. O parque “Professor Theobaldo Dick” é considerado o principal local de lazer e turismo da cidade de Lajeado, RS, e declarado como Área de Preservação Permanente pelo Decreto Municipal nº 1.482, de 20/08/1976, com uma área de 165.200,97 m² (Figura 7), sendo que o lago possui uma área aproximada de 10.400 m² e profundidade média de 1,50 metros. A linhagem *C. raciborskii* CYP-011K isolada pelo Dr. Peter Baker do Australian Water Quality Center (AWQC), Salisbury, SA, Austrália, do Lago Julius, Queensland, Austrália, foi obtida do laboratório da Profa. Sandra M.F.O. Azevedo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, sendo utilizada como controle positivo na amplificação de genes de CYN.

Figura 7 - Localização dos pontos das amostragens de água de onde as linhagens utilizadas neste estudo foram isoladas. 1) Braço Riacho Grande da Represa Billings, linhagem *C. raciborskii* CENA302. 2) Lago Theobaldo Dick, linhagem *C. raciborskii* CENA303. 3) Lago Julius, Queensland, Austrália, linhagem *C. raciborskii* CYP-011K

Os isolados utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e são mantidos em meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964, Anexo A), em câmara de crescimento com temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 14 h claro : 10 h escuro e irradiância de $40 \mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

4.2 Avaliação da produção de CYN

A produção de CYN pelos isolados brasileiros foi avaliada em células expostas a diferentes condições nutricionais fornecidas pelos diferentes meios de cultura usados: ASM-1 (GORHAM et al., 1964), Z8 (KOTAI, 1972), BG-11 (ALLEN, 1968) e Jaworski (THOMPSON et al., 1988), além de variações em cada um destes meios pela ausência de fonte de nitrogênio prontamente assimilável. Inicialmente, 5 mL de cultura com 20 dias de crescimento (item 4.1) foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultivo e mantidas nas mesmas condições do inóculo inicial durante 20 dias, realizando novo repique por quatro vezes para um bom estabelecimento das condições de crescimento das cianobactérias.

As características morfológicas desenvolvidas pelas linhagens nas diferentes condições nutricionais foram avaliadas por imagens obtidas utilizando microscópio óptico Carl Zeiss GmbH equipado com sistema digital de imagem AxionVisionLE 4.6 (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha).

A detecção e quantificação de CYN utilizando o kit ELISA PN522011 (Abraxys, Warminster, Pensilvânia, Estados Unidos) foi realizada após rompimento das células contidas em 1 mL de cultura usando o sonicador UP50H (Hielsher, Alemanha) durante 3 minutos a 80 Hz. Em seguida, de acordo com a recomendação do fabricante, uma alíquota de 50 µL da amostra em análise, da amostra controle (solução de CYN) e das soluções padrões foram adicionadas aos poços da microplaca. Posteriormente adicionou-se 50 µL da solução enzima-conjugado e 50 µL da solução de anticorpo. A microplaca foi agitada suavemente por 30 segundos e incubada à temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi descartado e o conjugado aderido a microplaca foi lavado quatro vezes com 250 µL de solução tampão de lavagem 1x. Em seguida, adicionou-se 100 µL do substrato (solução de cor) aos poços da microplaca, incubando-a por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 100 µL da solução de parada e realizada leitura em espectrofotômetro Zenyth 200rt (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) no comprimento de onda de 450 nm. Os dados obtidos foram utilizados para construção da curva padrão e para o cálculo da concentração de CYN nas amostras analisadas.

4.3 Detecção de genes relacionados com a síntese de CYN

4.3.1 Desenho de iniciadores

Vários conjuntos de iniciadores foram desenhados visando amplificar fragmentos de genes de CYN. Para tanto, sequências inteiras dos genes *cyrD*, *cyrE*, *cyrF*, *cyrG*, *cyrH*, *cyrI*, *cyrK*, *cyrN* e *cyrO* depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram selecionadas e alinhadas no programa BioEdit (HALL, 2001) utilizando ClustalW 1.8 (THOMPSON et al., 1994). Após o alinhamento, a sequência de regiões conservadas foi utilizada no programa PRIMER3 0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), gerando as opções de iniciadores. No programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) foi avaliada a qualidade dos iniciadores em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamentos indesejáveis, como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*auto-dimer*) ou entre o par de iniciadores (*cross-dimer*). A sequência, número de pares de bases amplificadas,

temperatura de *melting* (T_m) e a função de cada gene na biossíntese de CYN estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores desenhados para amplificação de genes relacionados com a síntese de CYN

Iniciador	Sequência	pb amplif.	T_m	Enzima codificada
cyrD-F	5'-CTAAACTAAAGACACCCGCC-3'	896	54	PKS
cyrD-R	3'-G TTCAGAACCTTGTGGATT-5'			
cyrE-F	5'-CGAGAGGTTTCTATTGCGGC-3'	540	60	PKS
cyrE-R	3'-GGGTATGTTCGGCAGGACAACT-5'			
cyrF-F	5'-GTCCTCACNCCATCGGCAAA-3'	561	61	PKS
cyrF-R	3'-CCATTACCAAACCGCTTATACT-5'			
cyrG-F	5'-TTCGATGAAATTGGGGTACG-3'	208	57	Citosina deaminase
cyrG-R	3'-ATATCCGCCGCCTGTAGTC-5'			
cyrH-F	5'-TTTGTTGAATAAGGCGGTCA-3'	836	57	Citosina deaminase
cyrH-R	3'-GAGGCGTTGCTGAGTCATTT-5'			
cyrI-F	5'-ATGAATGYCCAACCTCAAAGC-3'	203	52	Proil 4- hidroxilase
cyrI-R	3'-CAATCAAACATCCCYATGTC-5'			
cyrK-F	5'-AAGGGAAAGGAGCCACAGA-3'	310	56	MatE
cyrK-R	3'-GAAAGCCAACCACAAGATATG-5'			multidrogas e extrusão de substâncias tóxicas
cyrN-F	5'-GGTGAGCAGTTCTGTTTGG-3'	347	52	Adenilsulfato quinase
cyrN-R	3'-GGTCTTTCCTGTAAGGTGAA-5'			
cyrO-F	5'-GGTGGAAGTGAACGACTGAAT-3'	476	56	Sim. com chaperonas
cyrO-R	3'-CCTGACTACCCTGGGACAAA-5'			

4.3.2 Produção de biomassa

A produção de biomassa das linhagens *C. raciborskii* CENA302, *C. raciborskii* CENA 303 e *C. raciborskii* CYP-011K, necessária para extração de DNA, foi realizada em frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio de cultura ASM-1 líquido, nas mesmas condições especificadas no item 4.1, durante 20 dias. Após o crescimento, 50 mL de inóculo foram concentradas por centrifugação a $9000 \times g$ por 5 minutos (Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Como a cultura era monoespecífica (somente uma cianobactéria presente), mas não axênica (outros grupos de bactérias estavam presentes), foram realizadas várias lavagens visando diminuir a carga bacteriana contaminante. Assim, procederam-se três lavagens com 50 mL de água ultrapura seguida de homogeneização em vórtex, centrifugação a $15.000 \times g$ durante 10 minutos e descarte do sobrenadante. As células concentradas foram submetidas a uma nova lavagem com a adição de uma solução de extran 0,05 % seguida de homogeneização, centrifugação a $5.000 \times g$ por 10 minutos e descarte do sobrenadante. O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes com solução contendo NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8,0 e etanol 50 %, e uma vez com solução salina 0,85

% a $9000 \times g$. Para confirmar a eficácia do processo foram realizadas diluições seriadas de amostras antes e após a lavagem, e plaqueamento em meio sólido LB, após 48 horas realizada contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia). As células lavadas foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração do DNA genômico.

4.3.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o protocolo descrito por Lin et al., (2010), com modificações. Inicialmente, 200 μL de células lavadas e concentradas foram ressuspensas em 500 μL de tampão de lise (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 9,0) e 5 μL de lisozima (100 mg.mL^{-1}) e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos em bloco aquecido (LabLine Instruments, Illinois, IL, Estados Unidos). Em seguida foram adicionados 10 μL de proteinase K (20 mg.mL^{-1}), 20 μL de SDS 10% e incubado a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas em banho-maria BM-100 (Fanen, Guarulhos, São Paulo, Brasil). Após o período de incubação foram adicionados 600 μL de uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguida por homogeneização até a formação de emulsão. Esta amostra foi centrifugada a $14000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 600 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), homogeneizado gentilmente e centrifugado ($14000 \times g$, 5 minutos). Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 4 μL de RNase (10 mg.mL^{-1}) e incubou-se por 20 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em bloco aquecido. Em seguida foram adicionados à amostra 100 μL de acetato de sódio (3 M, pH 4,8) e 600 μL de isopropanol e centrifugou-se a $14000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μL de etanol 70%, procedendo com uma nova centrifugação ($14000 \times g$, 5 minutos). O pélete, após a retirada do sobrenadante, foi seco a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em bloco aquecido e reidratado em 50 μL de água ultrapura esterilizada. A integridade do DNA extraído e sua concentração foram verificadas aplicando alíquotas de 1 μL de DNA extraído acrescidas de 2 μL de tampão de carregamento (sacarose 40% e azul de bromofenol 0,25%) contendo SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos), à concentração de $1\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,0% e submetidas à corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (1X TBE: 45Mm Tris-borato, 1mM EDTA pH 8,0). A quantificação da concentração de DNA foi realizada pela comparação com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A documentação do gel foi realizada em fotodocumentador Gel Logic 212 Imaging System (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, Estados Unidos).

4.3.4 Amplificação dos genes relacionados com a síntese de CYN

Os testes de amplificação foram realizados utilizando os iniciadores descritos no item 4.3.1 para as linhagens *C. raciborskii* CENA302, *C. raciborskii* CENA303 e *C. raciborskii* CYP-011K, sendo esta última usada como controle positivo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em solução contendo tampão para a reação PCR 1x (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 20 ng de DNA, 10 pmol de cada iniciador e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra), utilizando a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 segundos, anelamento por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para cada iniciador foram testadas temperaturas de anelamento situadas entre -5°C e +5°C da temperatura de anelamento calculada ($T_m - 4^\circ\text{C}$, Tabela 1).

Após a reação de PCR, 5 µL dos produtos acrescidos de tampão de carregamento contendo SYBR Green foram aplicados em gel de agarose 1,0% e submetidos à corrida eletroforética em tampão TBE 0,5x. A documentação do gel foi realizada em fotodocumentador Gel Logic 212 Imaging System. O reconhecimento do tamanho dos fragmentos foi realizado pela comparação com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder*. O material foi armazenado a -18°C até a próxima etapa de análise.

4.3.5 Clonagem e transformação

Os produtos de PCR que apresentaram fragmentos de DNA com o tamanho esperado para cada iniciador testado foram utilizados para ligação no vetor de clonagem pGem-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH45α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRISTSCH; MANIATIS, 1989), e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside) e IPTG. As colônias transformantes, com coloração branca, foram selecionadas aleatoriamente, inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹), e incubadas por 16 horas em estufa MA 830/A (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 37° sob agitação de 250 rpm. Estes inóculos foram utilizados para confirmação da presença dos insertos. Para tanto, 1 µL da cultura foi utilizado na reação de PCR com os iniciadores M13F

(GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA) e M13R (GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG), na seguinte ciclagem térmica: 94 °C por 5 minutos; 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto; 4 °C por tempo indefinido.

Após a confirmação do inserto nas células transformantes foi realizada a extração dos plasmídeos recombinantes pelo método de hidrólise alcanina (BIRBOIN; DOLY, 1979), com algumas modificações. Para tanto 3 mL da cultura foram centrifugados a $5000 \times g$ por 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de solução I (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 e 50 mM de glicose). Adicionou-se, em seguida, 200 µL da solução II (SDS 1%, NaOH 0,2 M) e os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de potássio 3M e ácido acético glacial 10%), os micro tubos mantidos em gelo por 7 minutos e centrifugados a $15000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 270 µL de isopropanol 100% e a amostra foi centrifugada a $15000 \times g$ por 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µL de etanol 70% e a amostra foi centrifugada a $15000 \times g$ por 2 minutos a 4°C. O pélete foi seco a 37°C e ressuspensado em 28 µL de água ultrapura esterilizada acrescidos de 2 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹). Após incubação a 37 °C por 30 minutos a integridade do plasmídeo extraído e a concentração foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder*.

4.3.6 Sequenciamento Sanger

Após a extração dos plasmídeos, os produtos da PCR clonados foram reamplificados por PCR com o kit *ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing* (Life Technologies, Foster City, CA, Estados Unidos). Na reação de amplificação foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial contendo o inserto, 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores M13F e M13R, 2,0 µL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mM MgCl₂.6H₂O), e o volume da reação completado para 10 µL com água ultrapura esterilizada. A ciclagem térmica usada para amplificação foi: 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos; 10 °C por tempo indefinido.

O produto da PCR foi precipitado da seguinte forma: adicionou-se 2 µL de tampão Acetato de Sódio/EDTA e 600 µL de etanol 100% aos tubos e os mesmos foram centrifugados por 15 minutos a $13.000 \times g$ a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 µL de etanol 70%, procedendo com uma nova centrifugação por 5 minutos a $13.000 \times g$ a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras mantidas à temperatura

ambiente ao abrigo da luz por 12 horas. Para o sequenciamento as amostras foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Life Technologies) e inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies). Os dados gerados foram coletados e processados pelo programa ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software versão 3.7 (Life Technologies).

4.3.7 Processamento dos dados e análise filogenética

As sequências geradas foram analisadas quanto à qualidade e montadas utilizando o pacote contendo os programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux. As regiões que continham bases de índice de qualidade menor que 20 foram novamente submetidas ao sequenciamento. As sequências de nucleotídeos foram traduzidas para aminoácidos no *frame* correto de leitura utilizando o programa ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, Uniprot, APPEL; BAIROCH; HOCHSTRASSER, 1994; BAIROCH; APPEL; PEITSCH, 1997), e comparadas com as depositadas no banco de dados públicos GenBank do NCBI, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSHUL et al., 1990). As sequências mais próximas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 2001), procedendo com o ajuste das extremidades para que todas as sequências apresentassem o mesmo tamanho em pares de bases. As sequências foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas pelo método da distância utilizando o algoritmo “*Neighbor-Joining*” (NJ) e a visualização gráfica foi feita no programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

4.4 Sequenciamento dos genomas utilizando a plataforma HiScan SQ

O sequenciamento genômico foi realizado para as linhagens *C. raciborskii* CENA302 e *C. raciborskii* CENA303 utilizando a plataforma HiScan SQ (Illumina Inc. San Diego, CA, Estados Unidos). Os procedimentos iniciais necessários para o sequenciamento em larga escala (produção de biomassa, lavagem das células, e extração de DNA) foram os mesmos descritos nos itens 4.3.2, 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente.

4.4.1 Concentração de DNA

A obtenção da grande quantidade de DNA genômico necessária para fragmentação (20 µg em 100 µL), visando obter fragmentos de aproximadamente 300 – 400 pb, uma exigência do kit de sequenciamento usado, foi alcançada concentrando as amostras de DNA

extraído com o kit *Microcon Ultracel YM-100* (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. Para tanto, 500 μL das amostras de DNA extraído foram colocados na coluna concentradora e a mesma em um tubo coletor, ambos fornecidos pelo kit. Os tubos contendo a amostra foram centrifugados a $3.000 \times g$ durante o tempo necessário para que restassem apenas 100 μL de volume na coluna. Em seguida, a mesma foi invertida em um novo tubo e realizada uma nova centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 segundos com a finalidade de recuperar o DNA retido na coluna.

4.4.2 Construção da biblioteca genômica

A construção da biblioteca genômica envolveu a fragmentação do DNA genômico por sonicação, reparo das extremidades (*End Repair*), adenilação da extremidade 3', ligação dos adaptadores, purificação, enriquecimento e validação da biblioteca, para as quais foi utilizado o kit *TruSeqTM DNA Sample Preparation v2* (Illumina). Para a clusterização e sequenciamento foram utilizados os kits *TruSeqTM PE Cluster Generation v3* (Illumina) e *TruSeqTM SBS v3* (Illumina), respectivamente.

4.4.2.1 Fragmentação do DNA

Inicialmente uma amostra de DNA genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA302 na concentração de $0,1 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ foi submetida à fragmentação utilizando o sonicador CPX-600 (Cole-Parmer, Illinois, IL, Estados Unidos) em diferentes potências e tempos de exposição (Tabela 2) para escolha da condição que permitisse a obtenção de fragmentos com o tamanho de 300 a 400 pb, necessários para a construção da biblioteca. Após cada condição testada foram aplicados 3 μL de amostra de DNA fragmentado acrescidos de 2 μL de tampão de carregamento contendo SYBR Green, à concentração de $1 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, em gel de agarose 1,5% e submetidas à corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X, a 85V por 30 minutos. A fragmentação foi confirmada pela comparação com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder*. A documentação dos géis foi realizada em fotodocumentador sob luz UV (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc.). A melhor condição de fragmentação utilizada para a linhagem *C. raciborskii* CENA302 foi testada também para a linhagem *C. raciborskii* CENA303.

Tabela 2 - Condições testadas para a fragmentação do DNA genômico por sonicação

Condição	Descrição	
	Tempo.....	Potência (*)
A	0m10s.....	75%
B	0m25s.....	75%
C	1m45s.....	75%
D	1m15s.....	75%
E	1m45s.....	75%
F	2m25s.....	75%
G	3m25s.....	75%
H	4m.....	95%
I	7m.....	95%
J	7m.....	95%
K	2m.....	100%
	7m.....	95%
	5m.....	100%

* A potência máxima do equipamento (correspondente a 100%) é de 50 Hz.

Após a escolha da melhor condição de fragmentação uma amostra de cada linhagem contendo 20 μg ($0,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de DNA foi submetida à sonicação. Após a fragmentação todo o volume (100 μL) foi aplicado em gel de agarose 1,5% e submetido à corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 x, a 85V. A banda correspondente ao tamanho de fragmentos entre 300 e 400 pb de cada linhagem foi recortada do gel com auxílio de um bisturi e submetida à purificação com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), conforme as instruções do fabricante. Para tanto, o cubo de gel recortado foi transferido para um microtubo previamente pesado. Para cada 1 mg de cubo de gel foi adicionado 1 μL de tampão de captura e incubado a 60 °C por 15 minutos em bloco aquecido. A mistura foi transferida para uma coluna *GFX* com filtro contendo um tubo coletor que foi centrifugado por 30 segundos a $14.000 \times g$. A solução que passou pelo filtro foi descartada e foram adicionados à coluna 500 μL de tampão de lavagem, procedendo com uma nova centrifugação por 30 segundos a $14.000 \times g$. Este processo foi realizado duas vezes. A coluna foi então transferida para um novo microtubo e adicionados 50 μL de solução de eluição, incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a $14.000 \times g$. Após a purificação, a amostra foi submetida à quantificação no fluorômetro Qubit™ utilizando o kit *Quanti™ dsDNA BR Assay* (Invitrogen Life Technologies) e 1 μL utilizado para corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% a 85V para confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos. Em seguida, foi realizada uma diluição para a concentração final de 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em 50 μL (correspondente a 1 μg de DNA por amostra).

4.4.2.2 Reparo das extremidades

Inicialmente, 10 μ L do reagente *End Repair Control* e 40 μ L do reagente *End Repair Mix* foram adicionados aos poços da microplaca (96 poços) contendo 50 μ L da amostra de DNA de cada linhagem e homogeneizado gentilmente com auxílio da pipeta. As amostras foram seladas e incubadas a 30 °C por 30 minutos em termociclador PTG220 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, Estados Unidos). Em seguida, foram adicionados 160 μ L do reagente *AMPure XP Beads*, homogeneizado com auxílio da pipeta e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. A placa contendo as amostras foi colocada sobre o suporte magnético e mantida por 5 minutos até que a solução clareasse. Em seguida, 255 μ L do sobrenadante foram descartados e adicionados 200 μ L de etanol 80%. A placa foi incubada por 30 segundos à temperatura ambiente em contato com o suporte magnético e, em seguida, todo o sobrenadante descartado. Esta etapa de lavagem com etanol foi realizada por duas vezes e, em seguida, a placa foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos para que ocorresse a evaporação do líquido residual.

As esferas magnéticas foram ressuspensas em 17,5 μ L de *Ressuspension Buffer* e a microplaca incubada por 2 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida colocada no suporte magnético por 5 minutos. Após o clareamento da solução, 15 μ L do sobrenadante foram transferidos para novos poços da microplaca.

4.4.2.3 Adenilação das extremidades 3'

Aos poços contendo os 15 μ L das amostras com as extremidades reparadas foram adicionados 2,5 μ L de *A-Tailing Control*, 12,5 μ L de *A-Tailing Mix* e homogeneizado com auxílio da pipeta. A microplaca foi então incubada por 30 minutos a 37 °C em termociclador (MJ Research, Inc.).

4.4.2.4 Ligação dos adaptadores

Após a adenilação foram adicionados às amostras 2,5 μ L do reagente *Ligation Control*, 2,5 μ L de *Ligation Mix* e 2,5 μ L do *DNA Adapter Index*, homogeneizado com auxílio da pipeta e selado. Para a linhagem *C. raciborskii* CENA302 foi utilizado o indexador número AD002 (“CGATGT”) e para a linhagem *C. raciborskii* CENA303 o indexador número AD004 (“TGACCA”). A microplaca foi incubada por 10 minutos a 30 °C em termociclador (MJ Research, Inc.) Em seguida, foram adicionados 5 μ L de *Stop Ligation Buffer* e realizada a homogeneização. Adicionou-se 42,5 μ L de *AMPure XP Beads* e a placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a mesma foi colocada no

suporte magnético por 5 minutos e após o clareamento da solução 80 µL do sobrenadante foram descartados e adicionados 200 µL de etanol 80%. A microplaca foi incubada por 30 segundos à temperatura ambiente em contato com o suporte magnético e, em seguida, todo o sobrenadante descartado. Esta etapa de lavagem com etanol foi realizada duas vezes e a microplaca foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos para ocorrer a evaporação do líquido residual.

As esferas magnéticas foram ressuspensas em 52,5 µL de *Ressuspension Buffer* e mantidas à temperatura ambiente por 2 minutos, sendo, em seguida, colocadas em contato com o suporte magnético por 5 minutos. Após o clareamento da solução, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo poço da microplaca e foram adicionados 50 µL de *AMPure XP Beads*. A microplaca foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, colocada no suporte magnético. Após o clareamento da solução, 95 µL do sobrenadante foram descartados. Posteriormente procedeu-se com a lavagem das esferas com 200 µL de etanol 80% por duas vezes.

Após 15 minutos em temperatura ambiente para a evaporação total do líquido residual, foram adicionados 22,5 µL de *Ressuspension Buffer* e incubado por 2 minutos à temperatura ambiente e por 5 minutos no suporte magnético. Em seguida, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para novos poços da microplaca.

4.4.2.5 Purificação dos produtos ligados aos adaptadores

O volume total da amostra ligada aos adaptadores (20 µL) foi aplicado em gel de agarose 2,0%, corado com SYBR Gold (Invitrogen Life Technologies) juntamente com 4 µL de tampão de carregamento. O marcador de massa molecular foi preparado adicionando-se 17 µL de *Ressuspension Buffer*, 4 µL de tampão de carregamento e 3 µL do marcador 100 pb (Invitrogen Life Technologies). A corrida foi realizada por 2 horas, a 120 V em tampão TBE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador Dark Reader DR46B (Clare Chemical Research, Estados Unidos) e as bandas contendo 400 a 500 pb foram recortadas do gel e purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. As regiões do gel contendo fragmentos de 300-400 pb também foram recortadas e armazenadas a -20 °C. Para tanto, o gel recortado foi colocado em um microtubo de 1,5 mL previamente pesado e para cada volume de gel foram adicionados 3 volumes do reagente *QG*. Após a completa solubilização do gel à temperatura ambiente, foi adicionado 1 volume de isopropanol. A solução foi transferida para a coluna *QIAquick* e esta foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 × g. Em seguida, foram adicionados à coluna 500 µL

de tampão *QG* que foi centrifugado por 1 minuto a $13.000 \times g$. Novamente a solução que passou pela coluna foi descartada e adicionou-se 750 μL do tampão *PE*, mantendo à temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugou-se a $13.000 \times g$ por 1 minuto. A coluna foi colocada em um novo microtubo de 1,5 mL e o DNA eluído com 25 μL de tampão *EB* por meio de centrifugação a $13.000 \times g$ por 1 minuto.

4.4.2.6 Enriquecimento

Ao volume eluído da purificação das bandas, foram adicionados 5 μL do reagente *PCR Primer Cocktail* e 25 μL de *PCR Master Mix*, homogeneizado com auxílio de pipeta. As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador, utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 98 °C por 30 segundos; 12 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; 72 °C por 5 minutos, e mantidas por 10 °C até o próximo procedimento.

Após a ciclagem, foram adicionados 50 μL de *AMPure XP Beads*, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos em contato com o suporte magnético. Após o clareamento, 95 μL do sobrenadante foram descartados e adicionados 200 μL de etanol 80%. A microplaca foi incubada por 30 segundos à temperatura ambiente em contato com o suporte magnético e, em seguida, todo o sobrenadante descartado. Essa etapa de lavagem com etanol foi realizada duas vezes. Posteriormente, a placa foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos para que ocorresse a evaporação do líquido residual.

As esferas foram ressuspensas em 32,5 μL de *Ressuspension Buffer* e mantidas à temperatura ambiente por 2 minutos, e, em seguida, por 5 minutos em contato com o suporte magnético. Após o clareamento da solução, 30 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo poço da microplaca.

4.4.2.7 Validação da biblioteca

A validação da biblioteca foi realizada pela quantificação do DNA no fluorômetro *QuBit™ 2.0* (Invitrogen Life Technologies) utilizando o kit *QuBit dsDNA HS Assay* (Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante, e o tamanho dos fragmentos verificados em gel de agarose 1,5%. Para tanto, foram aplicados 3 μL de amostra acrescidos de 2 μL de tampão de carregamento contendo SYBR Green ($1 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e submetidas à corrida eletroforética em tampão TBE 1x, a 80V por 2 horas. O tamanho do

DNA fragmentado ligado aos adaptadores foi confirmado pela comparação com o marcador de massa molecular DNA Mass Ladder 100 pb (Invitrogen Life Technologies)

Após a quantificação utilizando fluorômetro, as amostras foram diluídas em tampão composto por *EB Buffer* (*Qiagen*, Valencia, CA, Estados Unidos) acrescido de 0,1% de Tween 20 (*Sigma-Aldrich Corporation*, St. Louis, MO, Estados Unidos) para uma concentração final de 10 pM de DNA. Para a reação de qPCR (*LightCycler 480II*, *Roche Molecular*, Mannheim, Alemanha) foram utilizados 4 µL da amostra diluída acrescidos de 6 µL de *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix* contendo *Primer Premix* (Illumina Inc.). Utilizou-se a seguinte ciclagem para a reação de amplificação: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 45 segundos. A curva padrão foi construída com reagentes contendo 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002 e 0,0002 pM, a qual foi utilizada para quantificação do DNA presente em cada amostra.

4.4.2.8 Clusterização e sequenciamento

A geração dos *clusters* foi realizada utilizando o kit *TruSeq Cluster v3* no equipamento cBot (Illumina, versão 8, cBotSoftware versão 1.4). Inicialmente foram adicionados a um microtubo 2 nM (10 µL) de DNA de cada amostra e 10 µL de uma solução NaOH 0,1N, que foi posteriormente homogeneizado usando vortex e centrifugado a $280 \times g$ por 1 minuto, sendo mantido, em seguida, por 5 minutos à temperatura ambiente para ocorrer a desnaturação do DNA. O volume total foi transferido para um novo microtubo contendo 980 µL do reagente HT1 (*Hybridization Buffer*). Em seguida, foi realizada uma diluição para uma concentração final de 10 pM de DNA, utilizando-se 500 µL de DNA desnaturado e 500 µL do reagente HT1. O volume final foi distribuído em 8 poços, cada um com 120 µL. A clusterização foi realizada utilizando os reagentes HP8 (*Index sequencing Primer*), HT2 (*Wash Buffer*) e HP3 (*Denaturation Solution*). Após este processo, as amostras foram submetidas ao sequenciamento utilizando o equipamento HiScan SQ (Illumina).

4.4.6 Análise dos dados gerados

Os mapeamentos por referência foram realizados utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, Dinamarca). As sequências depositadas no banco de dados do GenBank do NCBI referentes aos genes de interesse foram utilizadas como referência.

Outra abordagem utilizada foi a montagem *ab initio* do genoma, que consiste no agrupamento das leituras obtidas no sequenciamento a fim de representar o organismo que foi

sequenciado. Na estratégia de montagem *ab initio* as leituras são orientadas e ordenadas entre si sem a utilização de um genoma de referência, que neste estudo é a única possibilidade devido à inexistência até o momento de um genoma completo de *C. raciborskii*. Assim, nessa estratégia de montagem *ab initio* foram utilizados quatro programas especificados a seguir. O *CLC Genomics Workbench*, que é otimizado para a montagem de grandes volumes de dados de alta qualidade de uma maneira rápida e eficiente. Nesse programa foram utilizados os valores padrões de montagem disponibilizados. Também foi utilizado o programa Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008), que é baseado no gráfico de *Bruijn*, uma representação compacta com base em palavras curtas (“k-mers”), ideal para conjuntos de dados com cobertura alta e leituras curtas, sendo eficientes tanto para eliminar erros quanto para resolver repetições. Esta abordagem “quebra” as leituras em *k-mers* anteriormente à montagem dos *contigs*, que são formados por conectar duas leituras com “k” ou mais nucleotídeos que se sobrepõe. A escolha apropriada do valor de “k” é fundamental, uma vez que um valor pequeno favorece uma sobreposição errônea e uma cobertura não uniforme, enquanto que um valor elevado favorece regiões repetitivas (PENG et al., 2010). Foi utilizado o valor de *k-mer* de 27 para montagem dos genomas. Outro programa utilizado foi o Edena (*Exact De Novo Assembler*, HERNANDEZ et al., 2008), que utiliza o método de sobreposição-leiaute-consenso (POP et al., 2002). Inicialmente as leituras são processadas para remover a informação redundante, em seguida as sobreposições de tamanho mínimo são computadas e um gráfico de sobreposição é construído e os *contigs* são fornecidos na saída do programa. Nesse programa foi utilizado o valor de sobreposição de 75 pb. Outro programa usado foi o Celera (MYERS et al., 2000), que também utiliza o método sobreposição-leiaute-consenso, assim como o programa Edena. Nesse programa foram utilizados os valores padrões do programa.

Após a montagem dos genomas, os *contigs* contendo sequências de interesse foram submetidos à predição gênica automática, na qual são incorporadas todas as informações gênicas e proteicas correspondentes ao genoma. Para isto, foi utilizado o programa Glimmer (DELCHER et al., 1999, <http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/>, versão 3.02), que realiza a predição gênica em genomas microbianos, especialmente de bactérias, arqueias e vírus, utilizando modelos de Markov (IMMs) para identificar possíveis regiões codificantes e as distingue entre regiões não-codificantes. Todas as informações obtidas pela predição automática de ORFs foram incorporadas na anotação manual, realizada pelo programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). Este programa foi desenvolvido para a visualização de genomas e realização de anotação e curadoria manual, permitindo a

visualização de diversas características das sequências genômicas, como produto codificado pelo gene predito, presença de tRNAs e rRNAs, busca por similaridade proteica e nucleotídica em bancos de dados biológicos e visualização de conteúdo GC. Esses dados podem ser visualizados nas seis fases de leitura da tradução de DNA em proteínas (RUTHEFORD et al., 2000). Nos casos onde se buscou por sequências de inserção foi utilizado o programa ISFinder (SIGUIER et al., 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da produção de CYN

As duas linhagens brasileiras de *C. raciborskii*, CENA302 e CENA303, submetidas a oito variações das condições nutricionais pelo uso de diferentes meios de cultivo não apresentaram a produção de CYN a de acordo com os testes de ELISA (curva padrão $r^2=0,99$). Este método tem apresentado boas respostas quando utilizado para avaliar a produção de CYN, com resultados comparáveis aos obtidos pela técnica de cromatografia líquida (BALLOT et al., 2001, YLMAZ et al., 2008). Resultados obtidos por Bláhová et al. (2009) também mostraram uma boa concordância qualitativa entre os dados obtidos por ELISA e LC/MS. No entanto, as concentrações da toxina determinadas por ELISA foram sistematicamente maiores do que as concentrações determinadas pelo outro método, provavelmente devido à reatividade cruzada com outros derivados não identificados de CYN que ocorre no teste de ELISA. Dessa forma, quando se obtém resultado positivo utilizando a técnica de ELISA é indicada a análise por cromatografia líquida ou espectrometria de massas para confirmar a concentração de toxina na amostra bem como predizer as variantes presentes.

Os meios de cultivo utilizados e suas variações influenciaram de diferentes formas o crescimento das linhagens estudadas (Tabela 3). A ausência de uma fonte de nitrogênio prontamente assimilável impediu o desenvolvimento da linhagem *C. raciborskii* CENA303, bem como o meio Jaworski contendo nitrogênio não promoveu o crescimento desta cianobactéria. Este meio caracteriza-se pela baixa concentração de nitrogênio, que provavelmente é rapidamente esgotado nos primeiros ciclos de crescimento celular, impedindo o desenvolvimento da cianobactéria por longos períodos de tempo. No entanto, o gênero *Cylindrospermopsis* pertence à ordem Nostocales, sendo reconhecido pelo potencial de fixar o N_2 atmosférico e de proteger o complexo enzimático nitrogenase da ação deletéria do oxigênio pela realização deste processo em células diferenciadas chamadas heterócitos. A linhagem *C. raciborskii* CENA303 além de não crescer na ausência de nitrogênio não apresentou a formação de heterócitos em nenhuma das condições utilizadas, conforme pode ser observado na Figura 8. Possivelmente, os genes relacionados à diferenciação dos heterócitos ou fixação do N_2 podem ter sofrido mutações o que tornou desfavorável a realização destes processos. Por outro lado, a linhagem *C. raciborskii* CENA302 apresentou crescimento nos meios com e sem fonte de nitrogênio, exceto no meio BG-11 (Tabela 3), e apresentou formação de heterócitos (Figura 8), os quais foram visualizados em maior

quantidade quando a cultura foi submetida ao crescimento sem fonte de nitrogênio, o que era esperado devido à função biológica desta célula.

Tabela 3 - Crescimento das linhagens estudadas em diferentes meios de cultivo com e sem fonte de nitrogênio (N)

Meio de cultivo	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303
ASM-1 com N	+	+
ASM-1 sem N	+	-
Z8 com N	+	+
Z8 sem N	+	-
JM com N	+	-
JM sem N	+	-
BG-11 com N	-	+
BG-11 sem N	-	-

Estudo anterior (HOFF-RISSETI, 2012) realizado com as linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 detectou três fragmentos gênicos envolvidos na síntese de CYN e não verificou a produção da toxina em meio de cultivo ASM-1, o que incentivou a realização de testes modificando as condições nutricionais, as quais poderiam aumentar ou ativar a síntese deste metabólito. No entanto, a produção de CYN não foi observada em nenhuma das condições nutricionais usadas, o que sugere alterações nos genes envolvidos com a sua síntese. As condições de crescimento têm sido vastamente estudadas quanto à sua capacidade de interferir na produção de cianotoxinas, especialmente devido às evidências relacionadas às mudanças climáticas, as quais têm ocasionado o aumento da frequência de florações de cianobactérias em todo o mundo. Além disso, essas abordagens têm sido utilizadas devido à necessidade de se atrelar os dados genéticos relacionados à síntese de cianotoxinas com os fatores ambientais que podem estar envolvidos na regulação da produção das mesmas em nível molecular.

O aumento da temperatura tem se mostrado como um fator de repressão da síntese de CYN em *Aphanizomenon flos-aquae*, mas por outro lado não possui ação em algumas linhagens da mesma espécie, indicando que este efeito é específico para cada linhagem (PREUßEL et al., 2009). A luminosidade aparentemente não apresenta efeito significativo sobre a produção de CYN, enquanto que a interação entre temperatura e luminosidade apresenta efeitos significativos, porém inferiores ao efeito provocado pela mudança de temperatura (PREUßEL et al., 2009). Saker e Griffiyth (2000) também verificaram o mesmo comportamento em outras linhagens de *C. raciborskii*, as quais reduziram drasticamente a concentração de CYN quando submetidas ao aumento de temperatura, sendo que a 35°C a síntese foi completamente inibida. A concentração de nitrogênio também influencia na

concentração de CYN, como mostrado por Saker et al. (1999) e Hawkins et al. (2001), onde linhagens de *C. raciborskii* cultivadas na ausência de nitrogênio apresentaram um aumento da concentração da toxina em comparação com culturas correspondentes cultivadas em meio contendo nitrogênio. No entanto, as tentativas realizadas no presente estudo de induzir a produção de CYN pelas linhagens brasileiras de *C. raciborskii* pela retirada da fonte de nitrogênio do meio de cultura não foi suficiente para que as mesmas passassem a exibir o fenótipo de toxicidade. A baixa concentração de fosfato disponível no ambiente de crescimento também é um fator que aumenta a síntese de CYN (BAR-YOSEF et al., 2010). A concentração desse elemento apresenta variação nos meios de cultivo utilizados no presente estudo, porém também não estimulou a produção de CYN pelas linhagens estudadas.

Sabe-se que a síntese de determinado metabólito por um organismo depende tanto da presença dos genes responsáveis pelo processo quanto dos fatores ambientais envolvidos na promoção da expressão dos mesmos (DITTMAN et al., 1996; LANDSBERG, 2002). De acordo com Winter et al. (2011), os fungos e bactérias contêm um grande número de agrupamentos gênicos contendo PKS ou NRPS que permanecem silenciosos ou são pouco expressos sob condições de laboratório, o que pode estar ocorrendo com os genes relacionados à síntese de CYN nos isolados brasileiros estudados. Enquanto a expressão heteróloga tem sido utilizada com sucesso na identificação de substâncias sintetizadas por vias ribossomais, limitações relacionadas ao tamanho dos agrupamentos gênicos de moléculas não ribossomais aliadas aos agrupamentos multimodulares tornam a técnica de expressão heteróloga complexa para estes casos. Diversas abordagens para ativar estes agrupamentos silenciados têm sido aplicadas, entre elas a manipulação de reguladores específicos de certas vias metabólicas, que tem sido utilizada em fungos filamentosos (BERGMAN et al., 2007).

Outra possibilidade que explica a não detecção da produção de CYN nos isolados brasileiros é a perda de outros genes fundamentais para a síntese desta toxina, uma vez que além dos três genes já detectados (HOFF-RISSETI, 2012), doze outros genes também são descritos como responsáveis pela síntese de CYN em *C. raciborskii*. As abordagens moleculares realizadas neste estudo propiciam um melhor entendimento do potencial genético para produção de CYN nos dois isolados brasileiros de *C. raciborskii* CENA302 e CENA303.

Figura 8 – Características morfológicas das linhagens de *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 em diferentes meios de cultivo. A) CENA303 – ASM-1 com N; B) CENA302 – ASM-1 com N, C) CENA302 – ASM-1 sem N; D) CENA303 - Z8 com N; E) CENA302 - Z8 com N; F) CENA302 - Z8 sem N; G) CENA303 – BG-11 com N; H) CENA302 - JM com N; I) CENA303 - JM sem N. “H”: heterócito.

5.2. Detecção de genes relacionados com a síntese de CYN

5.2.1 Lavagem das células cianobacterianas

O procedimento de lavagem utilizado para remoção parcial de bactérias heterotróficas dos isolados cianobacterianos *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foi efetivo, sendo que houve uma redução de aproximadamente 99 % na contagem destas células em ambas as linhagens. Antes do processo de lavagem o isolado *C. raciborskii* CENA302 apresentou $3,4 \times 10^5$ células de bactérias heterotróficas por mL, sendo que após a lavagem este número reduziu para $3,8 \times 10^3$ células.mL⁻¹. A lavagem das células do isolado *C. raciborskii* CENA303 promoveu a redução do número de bactérias heterotróficas de $2,3 \times 10^5$ células.mL⁻¹ para $3,6 \times 10^3$ células.mL⁻¹ após a lavagem.

5.2.2 Amplificação por PCR e sequenciamento dos genes envolvidos na síntese de CYN

Os novos iniciadores desenhados neste estudo tendo como alvo vários genes envolvidos na biossíntese de CYN mostraram grande especificidade, uma vez que somente bandas únicas foram obtidas. Todos os genes testados foram amplificados e sequenciados no isolado australiano produtor de CYN, a *C. raciborskii* CYP-011K (Tabela 4). As sequências de aminoácidos obtidas pela tradução das sequências de nucleotídeos confirmaram as funções e domínios protéicos preditos, ou seja, genes das sintetases de CYN, e foram usadas para a construção de árvores filogenéticas (Figuras 9 a 17). As sequências Cyr de aminoácidos da linhagem *C. raciborskii* CYP-011K ficaram mais proximamente relacionadas às sequências das linhagens da mesma espécie e da espécie *R. curvata*, e distantemente posicionadas das sequências de *Anabaena* e *Oscillatoria*. Verificou-se uma similaridade acima de 98 % para todas as sequências, o que demonstra que os iniciadores desenhados apresentam alta especificidade e podem ser utilizados em outros estudos que tenham por objetivo avaliar o potencial genético para produção de CYN.

Para os isolados *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 apenas alguns dos fragmentos gênicos relacionados com a síntese de CYN foram amplificados e sequenciados (Tabela 4). Ambas as linhagens apresentaram fragmentos do gene *cyrI* (Figura 13, Tabela 5), responsável pela hidroxilação do C-7 da molécula de CYN. Na árvore filogenética é possível observar que a sequência de aminoácidos CyrI da linhagem *C. raciborskii* CENA302, embora agrupada e com 98 % de similaridade com sequências de linhagens de *C. raciborskii* conhecidas como produtoras de CYN, apresenta um ramo mais longo indicando maior número de modificações. A sequência CyrI da linhagem *C. raciborskii* CENA303 apresentou 100 % de similaridade com as sequências homólogas das linhagens produtoras *C. raciborskii* AWT205, CS-505 e CYP-011K e na árvore filogenética agrupou-se com estas linhagens.

Porções gênicas referentes aos genes *cyrG* e *cyrN* foram amplificadas e sequenciadas apenas na linhagem *C. raciborskii* CENA302. O gene *cyrG* é uma aminohidrolase, e está envolvido na formação do anel de uracila, essencial para a toxicidade de CYN. A sequência de aminoácidos CyrG da linhagem *C. raciborskii* CENA302 é 99 % similar às sequências homólogas de linhagens de *C. raciborskii* produtoras de CYN, conforme pode ser observado na Tabela 6. A árvore filogenética referente à sequência CyrG (Figura 14) mostra que apesar da linhagem *C. raciborskii* CENA302 estar agrupada com linhagens *C. raciborskii* produtoras de CYN, ela apresenta ramo mais longo indicando maior número de modificações do que as linhagens *C. raciborskii* produtoras de CYN, como também foi observado para a sequência de CyrI. O gene *cyrN* possui similaridade com uma adenilsulfato quinase, relacionada a doação

de grupos sulfato. A linhagem *C. raciborskii* CENA302 apresentou a sequência CyrN, porém esta ficou distantemente relacionada com linhagens produtoras de CYN (Figura 15), apesar de apresentar 99 % de similaridade com as mesmas (Tabela 7).

O gene *cyrH* foi amplificado e sequenciado apenas na linhagem *C. raciborskii* CENA303, apresentando função relacionada à formação do anel de uracila, fundamental para a toxicidade de CYN, assim como o gene *cyrG*, amplificado na linhagem *C. raciborskii* CENA302. A sequência CyrH da linhagem *C. raciborskii* CENA303 se agrupou com sequências provenientes de gêneros mais proximamente relacionados, porém apresentou um ramo mais longo, que indica um maior número de modificações em relação as outras linhagens apresentadas na árvore (Figura 16). A sequência CyrH proveniente do isolado brasileiro apresentou 99 % de identidade com as sequências homólogas de linhagens de *C. raciborskii* produtoras de CYN (Tabela 8).

O fragmento gênico de *cyrO* também foi sequenciado nos dois isolados brasileiros. Este gene parece estar relacionado à regulação da transcrição, porém essa função ainda não foi comprovada experimentalmente. As sequências CyrO dos isolados brasileiros apresentaram-se mais relacionadas com a sequência de uma proteína hipotética codificada pela linhagem *R. brookii* D9, também isolada do Brasil, não produtora de CYN e produtora de SXT, do que com CyrO de linhagens produtoras de CYN, conforme pode ser observado na Figura 17. Comparado com a similaridade obtida para as outras sequências de aminoácidos obtidas neste estudo (CyrG, CyrH, CyrI, CyrN) a sequência CyrO é a que apresenta menor similaridade com sequências homólogas de linhagens de *C. raciborskii* produtoras de CYN, sendo de 92 % para a linhagem *C. raciborskii* CENA302 e de 94 % para a linhagem *C. raciborskii* CENA303 (Tabela 9). Embora o iniciador para amplificar uma região do gene *cyrO* tenha sido desenhado usando sequências inteiras deste gene, os resultados obtidos neste estudo indicam que a região de anelamento deste iniciador não é específica para *cyrO*, podendo resultar na amplificação de outros genes não relacionados à síntese de CYN.

Tabela 4 - Genes de CYN amplificados e sequenciados nas linhagens estudadas

	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303	<i>C. raciborskii</i> CYP- 011K	T amplificação (°C)
<i>cyrD</i>	-	-	+	50,0
<i>cyrE</i>	-	-	+	56,0
<i>cyrF</i>	-	-	+	57,0
<i>cyrG</i>	+	-	+	59,2
<i>cyrH</i>	-	+	+	46,0
<i>cyrI</i>	+	+	+	59,0
<i>cyrK</i>	-	-	+	52,0
<i>cyrN</i>	+	-	+	50,0
<i>cyrO</i>	+	+	+	59,7

Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrD. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 10 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrE. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 11 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrF. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 12 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrK. As linhagens brasileiras não apresentaram amplificação deste fragmento, apenas a linhagem CYP-011K. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 13 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrI. As linhagens brasileiras que apresentam o fragmento estão marcadas em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 14 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrG. A linhagem brasileira que apresentam o fragmento está marcada em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Figura 15 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrN. A linhagem brasileira que apresenta o fragmento está marcada em negrito

Figura 16 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrH. A linhagem brasileira que apresentam o fragmento está marcada em negrito

Figura 17 - Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor Joining* (NJ) a partir de sequências de aminoácidos CyrO. As linhagens brasileiras que apresentam o fragmento estão marcadas em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Tabela 5 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene *cyrI* em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN

Linhagem	AA	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>C. raciborskii</i> AWT205	276	-						
2. <i>C. raciborskii</i> CS-505	276	100	-					
3. <i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6	276	96	96	-				
4. <i>Oscillatoria</i> sp. PCC_6506	276	90	90	88	-			
5. <i>C. raciborskii</i> CYP-011K	64	100	100	98	89	-		
6. <i>C. raciborskii</i> CENA302	64	98	98	97	88	98	-	
7. <i>C. raciborskii</i> CENA303	64	100	100	98	89	100	98	-

Tabela 6 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene *cyrG* em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN

Linhagem	aa	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>C. raciborskii</i> AWT205	478	-						
2. <i>C. raciborskii</i> CS-505	478	100	-					
3. <i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6	478	97	97	-				
4. <i>Raphidiopsis curvata</i> CHAB1150	478	99	99	97	-			
5. <i>Oscillatoria</i> sp. PCC_6506	478	88	90	90	88	-		
6. <i>C. raciborskii</i> CYP-011K	69	100	100	97	100	91	-	
7. <i>C. raciborskii</i> CENA302	69	99	99	96	99	90	99	-

Tabela 7 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene *cyrN* em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN

Linhagem	aa	1	2	3	4	5
1. <i>C. raciborskii</i> AWT205	219	-				
2. <i>C. raciborskii</i> CS-505	199	100	-			
3. <i>R. curvata</i> CHAB1150	145	99	99	-		
4. <i>C. raciborskii</i> CYP-011K	135	97	97	96	-	
5. <i>C. raciborskii</i> CENA302	135	99	99	99	99	-

Tabela 8 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene *cyrH* em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN

Linhagem	aa	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>C. raciborskii</i> AWT205	476	-						
2. <i>C. raciborskii</i> CS-505	476	100	-					
3. <i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6	476	97	97	-				
4. <i>R. curvata</i> CHAB1150	476	99	99	97	-			
5. <i>Oscillatoria</i> sp. PCC_6506	473	92	92	91	91	-		
6. <i>C. raciborskii</i> CYP-011K	278	100	100	97	100	94	-	
7. <i>C. raciborskii</i> CENA303	278	99	99	97	99	93	99	-

Tabela 9 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelo gene *cyrO* em diferentes linhagens produtoras e não produtoras de CYN

Linhagem	aa	1	2	3	4	5	6
1. <i>C. raciborskii</i> AWT205	515	-					
2. <i>C. raciborskii</i> CS-505	515	99	-				
3. <i>R. curvata</i> CHAB1150	329	93	94	-			
4. <i>C. raciborskii</i> CYP-011K	172	95	95	99	-		
5. <i>C. raciborskii</i> CENA302	172	94	94	92	94	-	
6. <i>C. raciborskii</i> CENA303	173	92	92	92	94	96	-

Os fragmentos referentes aos genes *cyrD*, *cyrE* e *cyrF* não foram amplificados nos dois isolados brasileiros de *C. raciborskii* estudados. Eles são descritos como PKS, possuindo desta forma domínios conservados, que deveriam ser amplificados em linhagens que apresentam o agrupamento gênico de CYN funcional. No entanto, os iniciadores desenhados para os genes *cyrD*, *cyrE* e *cyrF* mostraram especificidade uma vez que os mesmos foram

amplificados na linhagem produtora de CYN *C. raciborskii* CYP-011K e os sequenciamentos dos produtos da PCR mostraram alta identidade com genes homólogos de outras linhagens produtoras de CYN. Portanto, isso é um indicativo que os dois isolados brasileiros não possuem estes genes. Estudo que comparou agrupamentos gênicos de síntese de CYN em linhagens produtoras mostrou que os genes presentes nas linhagens *C. raciborskii* AWT205, *Aphanizomenon* sp. 10E6 e *A. ovalisporum* ILC-164 apresentam alta similaridade, mas com um nível elevado de rearranjos na ordem dos mesmos (STUKEN; JACOBSEN, 2010). No entanto, mesmo que a ordem desses genes seja singular para cada gênero ou até mesmo espécie ou linhagem, a sua amplificação não seria impedida caso eles estivessem presentes.

Os genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC*, previamente amplificados e sequenciados nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 (HOFF-RISSETI, 2012) foram os primeiros a serem caracterizados como essenciais na via de síntese de CYN, e são utilizados em estudos que avaliam o potencial de produção desta toxina por cianobactérias de diferentes gêneros (BALLOT et al., 2001; YILMAZ et al., 2011). No entanto, a presença de segmentos dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* em linhagens não produtoras de CYN tem sido descrita, como nas linhagens *A. bergii* ANA360H e *A. issatschenkoi* CAWBG02 (WOOD et al., 2007; RASMUSSEN et al., 2008), o mesmo que ocorreu com as linhagens utilizadas no estudo de Hoff-Risseti (2012). A não detecção da síntese de CYN em diferentes condições nutricionais além da não amplificação de diversos genes relacionados com a síntese de CYN sugere que o agrupamento gênico de CYN nos dois isolados brasileiros estudados está sofrendo um processo evolutivo de perda desses genes.

5.3 Sequenciamento dos genomas

5.3.1 Fragmentação do DNA

Dentre as condições de fragmentação testadas (Figura 18, A-K), o melhor resultado foi obtido utilizando sonicação por 7 minutos a 95% acrescidos de 5 minutos a 100%, gerando o padrão de fragmentação mostrado na Figura 18-K. Na comparação com o marcador de tamanho molecular, é possível observar que grande parte do DNA fragmentado apresenta aproximadamente 400 pb, ideal para o preparo da biblioteca genômica. Isto mostra que o procedimento utilizado foi adequado para o objetivo pretendido.

Figura 18 - Padrão de fragmentação do DNA genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA302 (A-K) e *C. raciborskii* CENA303 (K) em sonificador utilizando diferentes tempos de exposição e intensidades. As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K indicam as diferentes condições usados conforme especificadas na Tabela 2

O resultado obtido da purificação dos DNAs fragmentados está apresentado na Figura 19 e mostra que essa etapa foi realizada com sucesso, uma vez que se conseguiu recuperar uma grande quantidade de DNA.

Figura 19 - Amostras de DNA purificadas após o processo de fragmentação

5.3.2 Validação da biblioteca

Os resultados das validações das bibliotecas construídas mostraram que os procedimentos de preparo das bibliotecas foram realizados com sucesso. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 450 pb (Figura 20) e um rendimento suficiente para o sequenciamento em larga escala, sendo de 53 ng.µL⁻¹ para o isolado *C. raciborskii* CENA302 e de 52 ng.µL⁻¹ para o isolado *C. raciborskii* CENA303.

Figura 20 – Visualização do DNA fragmentado ligado aos adaptadores e indexadores das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 prontas para o sequenciamento genômico

5.3.3 Dados gerados pelo sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 realizado com a plataforma HiScan SQ da Illumina apresentou altos valores de qualidade em praticamente todas as bases (Figuras 22 e 22), ou seja, a maioria dos valores estão situados na região considerada de muito boa qualidade (verde). A confiabilidade da identificação de cada base sequenciada é dada pelo valor ou score de qualidade da base. A métrica mais utilizada é o valor de qualidade Phred (Q) que é dado pela fórmula $Q = -10 \log_{10} P$, onde P é a probabilidade da base ter sido erroneamente identificada (EWING et al., 1998). Os valores médios de Phred para as duas linhagens sequenciadas permaneceram acima de 30, tornando desnecessária a filtragem dos dados. Esse valor de qualidade 30 significa que a probabilidade é de 1 erro a cada 1000 bases incorporadas, ou seja, 99,9% de precisão (RAMOS et al., 2011).

O sequenciamento *paired-end* gerou leituras de 100 pb de cada extremidade dos fragmentos, chamadas de R1 (*forward*) e R2 (*reverse*), respectivamente. O número total de

bases sequenciadas foi de 5.346.498.600 pb para a linhagem *C. raciborskii* CENA302, com um percentual de conteúdo GC para as leituras R1 de 50 % e para as leituras R2 de 51 %. Para a linhagem *C. raciborskii* CENA303 o número total de bases foi de 7.143.897.000 pb, com um percentual de conteúdo GC de 44 % em ambos os sentidos de leitura. Os dados gerados foram suficientes para uma cobertura genômica esperada de aproximadamente $1.377 \times (5.346.498.600 / 3.880.000)$ na linhagem *C. raciborskii* CENA302 e $1.841 \times (7.143.897.000 / 3.880.000)$ na linhagem *C. raciborskii* CENA303 (Equação 1), considerando como referência para o cálculo o número de bases sequenciadas no genoma da linhagem *C. raciborskii* CS-505 de 3,88 Mb (STUCKEN et al., 2010). Porém, esse valor de cobertura pode estar superestimado, uma vez que não nem todas as outras bactérias presentes nas culturas cianobacterianas foram completamente eliminadas durante o procedimento de lavagem das células.

Figura 21 - Qualidade média das leituras geradas no sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA302

Figura 22 - Qualidade média das leituras geradas no sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA303

5.3.4 Montagem *ab initio*

Os quatro programas (Velvet, Edena, Celera e CLC *Genomics Workbench* v.5.5.1.) e as suas combinações utilizados na montagem dos genomas das duas cianobactérias propiciaram a redução no número de *contigs* (Tabela 10). A abordagem utilizando-se o montador Celera apresentou os melhores resultados, seguido pelo montador Edena. Ambos os montadores utilizam a mesma estratégia, porém o Celera é indicado para leituras mais longas

(NARZISI; MISHRA, 2011). A remontagem dos *contigs* obtidos pelos programas Celera e Edena no programa CLC *Genomics Workbench* v.5.5.1. gerou o menor número de *contigs*.

Tabela 10 - Número de *contigs* gerados e pares de bases do maior *contig* com as diferentes abordagens utilizadas na montagem *ab initio*

Montador	nº de <i>contigs</i> gerados/ pb maior <i>contig</i>	
	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303
Velvet	149.752 / *	231.812 / *
Edena	88.398 / *	55.871 / *
Celera	50.975 / *	69.534 / *
CLC Genomics Workbench	247.413 / 341.426	216.048 / 523.943
Velvet + Edena	22.436 / 207.289	16.974 / 455.009
Velvet + Edena + CLC	51.741 / 322.031	**
Velvet + Edena + Celera	23.096 / 325.174	22.025 / 216.168
Velvet + Edena + Celera + CLC	52.054 / 327.574	**
Edena + Celera	17.175 / 203.291	16.544 / 465.721

* O número de pares de bases do maior *contig* gerado não é disponibilizado pelo programa.

** Não foi possível realizar a montagem devido à limitação do programa utilizado, uma vez que o mesmo não admite para montagem *ab initio contigs* maiores que 500.000 pb.

As limitações das abordagens de montagem *ab initio* se associam diretamente às limitações tecnológicas relacionadas às características dos dados gerados pelos sequenciadores de nova geração, como o tamanho das leituras e o volume de dados gerados, o que aumenta exponencialmente o tempo de processamento (CARNEIRO et al., 2011). O número elevado de *contigs* gerados para as duas linhagens mesmo após várias tentativas de montagem, pode ser devido à presença de leituras relacionadas as sequências dos genomas das bactérias contaminantes, que por estarem presentes, mas com menor representação, impossibilitam a montagem de *contigs* maiores, bem como é possível a existência de regiões não representadas do genoma das próprias cianobactérias, o que dificulta a sua montagem. Essas dificuldades poderão ser ultrapassadas com a busca de *contigs* maiores e com alta cobertura que possam ser utilizadas para novos mapeamentos com o objetivo de estendê-los, eliminando leituras que não fazem parte do genoma das linhagens de *C. raciborskii*, bem como o uso de programas de montagem que analisem dados metagenômicos com o objetivo de montar genomas completos, como o Meta-Velvet (NAMIKI et al., 2012).

5.3.5 Busca por genes relacionados com a síntese de CYN

Inicialmente, as leituras geradas no sequenciamento das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foram mapeadas utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* com agrupamentos gênicos completos de CYN descritos nas linhagens *C. raciborskii* AWT205 (MIHALI et al., 2008), *C. raciborskii* CS-505 (STUCKEN et al., 2010), *R. curvata* CHAB1150 (JIANG et al., 2012), *Oscillatoria* sp. PCC 6506 (MAZMOUZ et al., 2010) e *Aphanizomenon* sp. 10E6 (STÜKEN; JAKOBSEN, 2010), gerando o chamado mapeamento por referência. A Tabela 11 apresenta o número de leituras mapeadas e o tamanho em pares de bases da sequência consenso obtida para cada um dos mapeamentos.

Tabela 11 - Número de leituras do sequenciamento das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e *C. raciborskii* CENA303 que mapearam com as referências de agrupamentos gênicos de CYN utilizados e o respectivo tamanho em pares de base (pb) da sequência consenso gerada

Linhagem utilizada como referência	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303
	nºde leituras mapeadas	Seq. consenso gerada (pb)
	nºde leituras mapeadas	Seq. consenso gerada (pb)
<i>C. raciborskii</i> AWT205 (EU140798.1)	36318	3750
<i>C. raciborskii</i> CS-505 (ACYA01000027.1)	16540	2956
<i>R. curvata</i> CHAB1150 (JN873921.1)	12780	1797
<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6 (GQ385961.1)	59	886
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC6506 (FJ418586.4)	0	0

Para ambas as linhagens, o melhor resultado de mapeamento quanto ao número de leituras utilizadas e sequência consenso gerada foi obtida utilizando o agrupamento gênico *cyr* da linhagem *C. raciborskii* AWT205 como referência (Figura 23), gerando uma sequência consenso de 3.750 pb na linhagem *C. raciborskii* CENA302 e de 3.745 pb para a linhagem *C. raciborskii* CENA303, representando em ambos os casos aproximadamente 10% do agrupamento gênico *cyr* completo. É possível observar que o número de leituras mapeadas exibe certa redução à medida que a distância filogenética entre os isolados aumenta, sendo que quando se utilizou o agrupamento gênico da linhagem *Oscillatoria* sp. PCC-6506 nenhuma leitura foi mapeada. Esta linhagem, apesar de sintetizar a CYN, apresenta uma sequência de nucleotídeos dos genes *cyr* filogeneticamente menos relacionada àqueles de cianobactérias pertencentes a outros gêneros também produtoras desta toxina. Além disso, as

linhagens *Aphanizomenon* sp. 10E6 e *Oscillatoria* sp. PCC6506 não apresentam os genes *cyrN* e *cyrO* que foram amplificados por PCR e sequenciados nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303. Ambos os fatores poderiam justificar o número reduzido ou a ausência de mapeamentos quando se utilizou estas linhagens como referência. Sendo assim, apesar de apenas uma pequena porção do agrupamento *cyr* estar representada nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 pelo mapeamento por referência, mesmo que esta estratégia de montagem não seja a ideal, esses resultados indicam a presença de resquícios dos genes relacionados à síntese de CYN no genoma das linhagens brasileiras de *C. raciborskii*. Em contrapartida, esta análise também confirma que grande parte dos genes essenciais para a síntese não ribossomal desta toxina estão ausentes, o que era de certa forma esperado devido à dificuldade encontrada na amplificação por PCR de regiões dos mesmos genes utilizando iniciadores específicos. Esses resultados também explicam a ausência de produção de CYN pelos isolados brasileiros estudados.

Com o intuito de confirmar a identidade de cada um dos fragmentos da sequência consenso gerada na montagem utilizando a referência *C. raciborskii* AWT205, utilizou-se a ferramenta BLASTn. Todos os fragmentos das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foram reconhecidos como sendo relacionadas à síntese de CYN (Tabela 12), indicando que estas porções gênicas possivelmente são resquícios da presença destes genes nos isolados brasileiros e, aparentemente, não possuem relação com a síntese de outros metabólitos. Na linhagem *C. raciborskii* CENA302 a sequência consenso de 3750 pb está fragmentada em 15 sequências menores com identidade com os genes *cyrD*, *cyrE*, *cyrA*, *cyrB*, *cyrC* e *cyrO*, e com as transposases *cyrL* e *cyrM*. A sequência consenso da linhagem *C. raciborskii* CENA303 de 3745 pb está fragmentada em 20 sequências menores com identidade com os genes *cyrD*, *cyrA*, *cyrB*, *cyrC* e *cyrO*, as transposases *cyrL* e *cyrM* e também com o espaço intergênico existente entre genes de CYN.

Figura 23 - Mapeamento das leituras geradas no sequenciamento das linhagens (A) *C. raciborskii* CENA 302 e (B) *C. raciborskii* CENA 303 contra o agrupamento gênico de CYN da linhagem *C. raciborskii* AWT205. A figura mostra as regiões que foram mapeadas e as respectivas coberturas relativas obtidas

Tabela 12 - Resultados do BLASTn obtidos utilizando a sequência consenso gerada do mapeamento utilizando como referência o agrupamento gênico de CYN da linhagem *C. raciborskii* AWT205

<i>C. raciborskii</i> CENA302			<i>C. raciborskii</i> CENA303		
Sequência / pb	Gene	% Cobertura/ Identidade	Sequência / pb	Gene	% Cobertura/ Identidade
1 / 77	<i>cyrD</i>	100 / 88	1 / 70	<i>cyrD</i>	100 / 89
2 / 268	<i>cyrE</i>	100 / 87	2 / 70	<i>cyrD</i>	100 / 89
3 / 315	<i>cyrL</i>	99 / 92	3 / 429	<i>cyrL, cyrM</i>	99 / 91
4 / 139	<i>cyrL</i>	100 / 91	4 / 139	<i>cyrL</i>	100 / 91
5 / 100	<i>cyrA</i>	100 / 100	5 / 200	E.I.	100 / 88
6 / 100	<i>cyrA</i>	100 / 100	6 / 65	<i>cyrA</i>	100 / 98
7 / 100	<i>cyrA</i>	100 / 99	7 / 135	<i>cyrA</i>	100 / 100
8 / 100	<i>cyrA</i>	100 / 98	8 / 177	<i>cyrA</i>	100 / 100
9 / 100	<i>cyrB</i>	100 / 99	9 / 102	<i>cyrA</i>	100 / 100
10 / 100	<i>cyrB</i>	100 / 100	10 / 100	<i>cyrA</i>	100 / 99
11 / 120	<i>cyrC</i>	100 / 100	11 / 100	<i>cyrB</i>	100 / 99
12 / 100	<i>cyrC</i>	100 / 100	12 / 100	<i>cyrB</i>	100 / 100
13 / 409	<i>cyrM</i>	100 / 86	13 / 133	E.I.	100 / 89
14 / 177	<i>cyrO</i>	99 / 100	14 / 107	<i>cyrC</i>	100 / 99
15 / 1.519	<i>cyrO</i>	100 / 88	15 / 100	<i>cyrC</i>	100 / 100
--	--	--	16 / 153	E.I.	100 / 91
--	--	--	17 / 203	<i>cyrM</i>	100 / 87
--	--	--	18 / 226	<i>cyrO</i>	87 / 93
--	--	--	19 / 172	<i>cyrO</i>	100 / 95
--	--	--	20 / 1.103	<i>cyrO</i>	100 / 88

* E.I.: espaço intergênico presente no agrupamento *cyr* da linhagem *C. raciborskii* AWT205.

No entanto, o uso de agrupamentos gênicos completos de CYN pode ter criado um viés na montagem devido à possibilidade de um posicionamento dos genes diferente nas linhagens estudadas do que o encontrado nas referências, impedindo que leituras fossem mapeadas e montadas nas regiões entre um gene e outro. Sendo assim, foi realizado um mapeamento utilizando como referência os genes de CYN isolados (Tabelas 13 e 14). Os genes representados foram *cyrA* (48,55%), *cyrB* (2,29 %), *cyrC* (8,75 %), *cyrD* (1,36 %), *cyrN* (29,16 %) e *cyrO* (98,25 %) na linhagem *C. raciborskii* CENA302, e os genes *cyrA* (50,08%), *cyrB* (2,90 %), *cyrC* (6,27 %), *cyrD* (1,36 %), *cyrJ* (12,8 %), *cyrN* (26 %) e *cyrO* (96,05 %) na linhagem *C. raciborskii* CENA303. Ainda assim, observa-se que os genes de CYN nos isolados brasileiros apresentaram uma redução altamente significativa. Estudos visando a amplificação do gene *cyrJ* nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foram realizados previamente, no entanto, nenhum fragmento deste gene foi amplificado (HOFF-RISSETI et al., 2012). De acordo com vários autores, a ausência do gene *cyrJ* no agrupamento gênico *cyr* pode estar relacionado com a não produção de toxina (MIHALI et al., 2008; MAZMOUZ et al., 2010; BALLOT et al., 2011). Este gene codifica para uma

enzima responsável pela sulfatação da molécula de CYN mediada pela atividade de CyrN, no entanto, o sulfato presente na estrutura parece não estar relacionado com a toxicidade de CYN (MIHALI et al., 2008). A presença de uma pequena porção do gene *cyrJ* no genoma da linhagem *C. raciborskii* CENA303 indica o potencial de produção desta toxina pela linhagem em algum momento da sua história evolutiva. Este gene, assim como outros genes do agrupamento gênico da CYN, pode estar sofrendo um processo de redução ao longo do tempo. Diferentemente da linhagem *C. raciborskii* CENA303, os dados da montagem demonstram que a linhagem *C. raciborskii* CENA302 não possui resquícios da presença do gene *cyrJ*, possivelmente por ter sido completamente eliminado nesta linhagem.

Tabela 13 - Número de pares de base (pb) da sequência consenso gerada pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento da linhagem *C. raciborskii* CENA302 utilizando como referência os genes de cilindrospormopsina de diferentes agrupamentos gênicos descritos utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* e a respectiva porcentagem do gene que é representada pela sequência consenso gerada

	<i>C. raciborskii</i> AWT205		<i>C. raciborskii</i> CS-505		<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6		<i>R. curvata</i> CHAB1150		<i>Oscillatoria</i> sp. PCC6506	
	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada
<i>cyrA</i>	200	17,00	410	34,86	399	33,92	571	48,55	0	0
<i>cyrB</i>	200	2,28	200	2,28	201	2,29	200	2,28	0	0
<i>cyrC</i>	438	8,75	202	4,03	197	3,93	302	6,03	0	0
<i>cyrD</i>	77	1,36	77	1,36	0	0	77	1,36	0	0
<i>cyrE</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrF</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrG</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrH</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrI</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrJ</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrK</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrN</i>	175	29,16	176	26,66	--	--	--	--	--	--
<i>cyrO</i>	1521	98,25	1487	96,05	--	--	--	--	--	--

Tabela 14 - Número de pares de base (pb) da sequência consenso gerada pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento da linhagem *C. raciborskii* CENA303 utilizando como referência os genes de cilindrospermopsina de diferentes agrupamentos gênicos descritos utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* e a respectiva porcentagem do gene que é representada pela sequência consenso gerada

	<i>C. raciborskii</i> AWT205		<i>C. raciborskii</i> CS-505		<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6		<i>R. curvata</i> CHAB1150		<i>Oscillatoria</i> sp. PCC6506	
	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada	Seq. consenso (pb)	% do gene representada
<i>cyrA</i>	335	28,48	589	50,08	300	25,51	300	25,51	0	0
<i>cyrB</i>	202	2,30	254	2,90	200	2,28	200	2,28	0	0
<i>cyrC</i>	314	6,27	237	4,73	202	4,03	214	2,18	0	0
<i>cyrD</i>	77	1,36	66	1,17	0	0	50	0,88	0	0
<i>cyrE</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrF</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrG</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrH</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrI</i>	0	0	0	0	0	0	--	--	0	0
<i>cyrJ</i>	100	12,8	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrK</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cyrN</i>	156	26,00	141	21,36	--	--	--	--	--	--
<i>cyrO</i>	1.455	93,99	1487	96,05	--	--	--	--	--	--

O mapeamento utilizando como referência os fragmentos gênicos obtidos pelo método de Sanger (item 5.2.2; HOFF-RISSETI, 2012) também foi realizado. As Tabelas 15 e 16 indicam o tamanho das sequências consenso geradas, número de leituras utilizadas e cobertura média. É possível observar que os fragmentos gênicos utilizados como referência não foram completamente mapeados. Uma explicação para esse fato pode ser a não cobertura destas regiões pelo sequenciamento genômico. Para ambas as linhagens, *C. raciborskii* CENA302 e CENA303, os genes *cyrC* e *cyrO* são os melhores representados no sequenciamento com a plataforma HiScan SQ. Já os fragmentos gênicos *cyrH*, *cyrG* e *cyrI* obtidos por sequenciamento Sanger não foram mapeados com os dados gerados pelo sequenciamento genômico.

Tabela 15 - Resultados obtidos pelo mapeamento das leituras do sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA302 utilizando como referência os fragmentos gênicos sequenciados pelo método de Sanger

Gene	pb consenso	Número de leituras	Cobertura média	Tamanho da referência	% da referência mapeada
<i>cyrA</i> (JX175239.1)	518	17	1,54	1106	46,83
<i>cyrB</i> (JX175241.1)	196	29	6,16	470	41,70
<i>cyrC</i> (JX175241.1)	461	366	71,00	515	89,51
<i>cyrG</i>	0	0	0	209	0
<i>cyrI</i>	0	0	0	193	0
<i>cyrN</i>	205	914	220,63	386	53,10
<i>cyrO</i>	517	23283	3.981,14	517	100,00

Tabela 16 - Resultados obtidos pelo mapeamento das leituras do sequenciamento genômico da linhagem *C. raciborskii* CENA303 utilizando como referência os fragmentos gênicos sequenciados pelo método de Sanger

Gene	pb consenso	Número de leituras	Cobertura média	Tamanho da referência	% da referência mapeada
<i>cyrA</i> (JX175238.1)	655	17	1,76	1107	59,16
<i>cyrB</i> (JX175240.1)	254	69	14	470	54,04
<i>cyrC</i> (JX175242.1)	359	244	47,46	515	69,70
<i>cyrH</i>	0	0	0	876	0
<i>cyrI</i>	0	0	0	193	0
<i>cyrO</i>	517	14065	2566,08	517	100,00

Com o intuito de verificar a distribuição dos fragmentos de genes de CYN nos genomas das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foi utilizada a montagem *ab*

initio, que tem como objetivo a montagem do genoma sem a utilização de qualquer outra informação que não as leituras geradas pelo processo de sequenciamento. Dessa forma, iniciou-se uma busca pelos genes reconhecidos como flanqueadores do agrupamento de CYN em linhagens produtoras (STUCKEN et al., 2010), os quais estão envolvidos na biossíntese da enzima hidrogenase (agrupamento *hypABCDE**F*). Os dois *contigs* das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 que apresentaram estes genes foram identificados. A Figura 24 ilustra a organização destes genes flanqueadores, mostrando a sintenia do ordenamento e sentido de leitura destes genes, com exceção do gene *hypF*, nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 em comparação com a linhagem *C. raciborskii* CS-505, produtora de CYN. A análise comparativa dos flanqueadores mostrou a ocorrência da inversão do sentido de transcrição do gene *hypF*. A inversão deste gene pode ser considerada um indício de que durante este processo possivelmente o agrupamento de CYN tenha sido também removido, levando à perda do mesmo nestas linhagens.

A análise da região entre os genes *hypF* e *hypC*, onde haveria o agrupamento da CYN, mostra a presença de duas regiões codantes na linhagem *C. raciborskii* CENA302 e uma na linhagem *C. raciborskii* CENA303 que não apresentam identidade com nenhuma sequência proteica depositada no banco de dados do NCBI, mas que se alinham entre si em grande parte da sequência (Figura 25). Isso pode indicar que a linhagem *C. raciborskii* CENA303 encontra-se em um processo mais avançado de perda desta região gênica. Também ocorre uma região de 65 pb com que apresenta 88 % de similaridade com a sequência de *cyrO* proveniente da linhagem *C. raciborskii* AWT205 (Figura 24). Esta evidência sinaliza que possivelmente esta porção é remanescente de um gene que foi altamente reduzido.

Christiansen et al., (2008) demonstraram que os genes flanqueadores do agrupamento que codifica para a cianotoxina microcistina (MCY) em linhagens não produtoras são altamente conservados, sendo detectada a presença de pequenos elementos contendo sequências repetidas e invertidas entre os flanqueadores. Estes autores concluíram que a perda dos genes de MCY em linhagens não produtoras é o resultado de um processo que ocorre em duas etapas, em um primeiro momento ocorre a inativação dos genes *mcy* pela inserção de duas sequências repetidas e invertidas, e, em seguida, ocorre a exclusão desta porção do genoma levando juntamente o agrupamento gênico MCY. No entanto, neste estudo foi realizada a busca por sequências de inserção na região compreendida entre os flanqueadores do agrupamento gênico de CYN nos isolados brasileiros, utilizando o programa IS Finder, porém não foi possível encontrar sinais de sequências de inserção.

Figura 24 - Organização dos genes flaqueadores do agrupamento gênico de CYN nas linhagens *C. raciborskii* CENA302, CENA303 (não produtoras de CYN) e CS-505 (produtora de CYN), mostrando a inversão do gene *hypF* nas linhagens não produtoras

Figura 25 - Alinhamento das sequências entre os genes *hypF* e *hypC* das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303

Neste estudo, uma busca pelo gene *cyrO* foi realizada nos *contigs* gerados pela montagem *ab initio*. O gene *cyrO* foi o melhor representado nos mapeamentos por referência utilizando as sequências obtidas no sequenciamento Sanger (Tabelas 15 e 16). O *contig* que continha similaridade com este gene também foi submetido à anotação detecção de ORFs e anotação manual, mostrando que os genomas das linhagens sequenciadas possuem uma ORF que apresenta alta similaridade com o gene *cyrO*, porém esta ORF encontra-se em uma posição no genoma diferente da qual se esperaria, ou seja, entre o agrupamento da hidrogenase (Figura 26). Essa ORF, nessa posição, pode estar envolvida em outro processo celular. Ela encontra-se flanqueada por diferentes genes, como o transportador de elétrons rubreretina, genes que codificam para a formação do pelo sexual, um gene que codifica a enzima N-acetiltransferase, que está envolvida em diversos processos celulares, e o gene *hepN* que está relacionado à transferência de grupos fosfato. Avaliando o alinhamento entre a proteína CyrO das linhagens *C. raciborskii* CS-505 e AWT205 e a proteína hipotética codificada por esta ORF (Figura 27), é possível observar o alto grau de similaridade entre elas. O sítio de anelamento do par de iniciador desenhado (*cyrO-F/ cyrO-R*) é conservado no gene *cyrO* bem como nessa ORF presente nos isolados brasileiros, sendo que o fragmento amplificado codifica para uma sequência de aminoácidos que difere apenas em 12 posições entre CyrO e a proteína hipotética, sendo que para 9 destes aminoácidos ocorre a separação entre produtoras e não produtoras de CYN (Figura 27).

Figura 26 - Organização dos genes que flanqueiam a proteína hipotética das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 que apresenta similaridade com o gene *cyrO*

Figura 27 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *cyrO* e sequências de proteínas hipotéticas codificadas por linhagens não produtoras de CYN. Os quadros em rosa mostram o sítio de anelamento do par de iniciadores *cyrO-F* e *R*. Os quadros em preto mostram os aminoácidos que diferem entre as sequências e permitem a separação de produtoras e não produtoras de CYN

As buscas referentes aos outros genes que apresentaram leituras mapeadas pela montagem por referência (Tabelas 13 e 14) também foram realizadas nos *contigs* gerados pela montagem *ab initio* para ambas as linhagens sequenciadas. No entanto, estas sequências apresentaram-se distribuídas em *contigs* pequenos, que não englobam sequências relacionadas a outros genes, não sendo possível inferir sua possível localização nos genomas. Apenas após a obtenção do *scaffold* do genoma completo, bem como uma montagem mais apurada dos dados, poderá ser desvendada a localização destes fragmentos gênicos.

De acordo com Rasmussen et al. (2008) e Kellmann et al.(2006) em linhagens tóxicas, as sequências dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* estão sempre presentes, ao passo que em linhagens não tóxicas a distribuição destas sequências é irregular. Possivelmente, por estes genes não apresentarem nenhuma função relevante nas linhagens estudadas, não é necessária a sua manutenção na forma de agrupamento gênico. Esta distribuição já foi relatada em genes relacionados à síntese de microcistina (MCY) nos gêneros *Microcystis* e *Planktotrix* (KURMAYER et al., 2004). De acordo com os autores, a capacidade desses gêneros em produzir mais de um tipo de peptídeo não ribossomal pode explicar a inativação da capacidade de síntese de MCY, uma vez que talvez outra molécula pode substituir funcionalmente este peptídeo. Os autores ainda relatam que os genes relacionados à síntese de MCY não ocorrem exclusivamente em linhagens produtoras e que por serem genes ancestrais, as linhagens atuais no processo evolutivo sofreram perdas sucessivas de genes relacionados à síntese de microcistina. Desta forma, genes presentes tanto em linhagens produtoras quanto em não produtoras são inadequados para avaliação do potencial toxigênico e se usados podem superestimar a proporção de linhagens produtoras (MBEDI et al., 2005).

As evidências obtidas neste estudo indicam que os genes *cyr* foram ou estão sendo eliminados dos genomas das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303. Como essas duas linhagens apresentam o agrupamento gênico da toxina saxitoxina (STX), descrito por Hoff-Rissetti (2012) existe a possibilidade de que a função celular desconhecida anteriormente desempenhada pela CYN foi substituída pela STX. A STX, assim como a CYN, é um alcaloide, no entanto atua como uma neurotoxina em células animais, bloqueando os canais de sódio, potássio e cálcio, afetando a propagação dos impulsos nervosos e resultando em paralisia neuromuscular (WANG et al., 2003; SU et al., 2004). Apesar de o efeito em células animais das cianotoxinas ser relativamente bem esclarecido, para as células produtoras ainda não se conhece a função destas toxinas. Neste sentido, sabe-se que metabólitos extracelulares de cianobactérias podem desempenhar papéis importantes, tais como de comunicação entre as células da mesma espécie ou podem afetar outros organismos (alelopatia). Experimentos conduzidos com linhagens de *Aphanizomenon ovalisporum* produtoras de CYN revelaram a possível função biológica desta toxina (BAR-YOSEF et al., 2010). De acordo com os autores, a CYN é útil em interações alelopáticas, promovendo a secreção da enzima alcalino fosfatase (APase) por outros organismos. Esta enzima é responsável pela remoção de fosfato a partir de várias moléculas, e em termos de alocação de moléculas de nitrogênio, a produção de CYN é menos custosa para a célula do que a secreção de APase. Quando o fósforo (P) torna-se limitante, as cianobactérias ativam a produção de CYN e a enzima PstS (*Phosphate binding*

protein – proteína de ligação ao fosfato), podendo então competir pelo P disponibilizado pela ação da APase de outros organismos, o que explica sua abundância mesmo em ambientes com privação de P. Acredita-se que este mesmo efeito ocorra em outros gêneros produtores de CYN, como *Cylindrospermopsis* (BAR-YOSEF et al., 2010).

Esta mesma função foi também atribuída para a toxina STX em linhagens do gênero *Alexandrium* (dinoflagelado) produtoras desta toxina (FRANGÓPULOS et al., 2004). Os autores verificaram que as espécies com menor habilidade de competir em condições limitantes de P são mais tóxicas, suportando a hipótese de que a produção de STX poderia ser uma adaptação que evoluiu para compensar a desvantagem ecológica de ter uma baixa afinidade por nutrientes. Desta forma, a capacidade de uma linhagem ancestral de *C. raciborskii* em sintetizar a STX pode ter eliminado a necessidade da produção de CYN e consequentemente a necessidade de manutenção destes genes no cromossomo. É ainda provável que pressões seletivas diferentes nos diversos ambientes onde é encontrada esta espécie dirigiram a evolução de “toxitipos” de *C. raciborskii* (SINHÁ et al., 2012).

Estudos conduzidos por Moustafa et al. (2009) indicam que os agrupamentos gênicos da STX em linhagens de *Aphanizomenon* podem ser provenientes de eventos de transferência lateral de genes, que ocorrem frequentemente em procariotos. Desta forma, poderia ser levantada a hipótese de que a partir de uma linhagem inicial que originalmente continha o agrupamento *cyr* tenha recebido horizontalmente o agrupamento gênico STX e seus descendentes foram perdendo os genes relacionados à síntese de CYN, por este não conferir uma vantagem competitiva tão eficaz quanto à capacidade de produção de SXT no meio em que estavam inseridos, ou por possuírem funções semelhantes para a célula. Para confirmar a possibilidade de que os genes de STX foram recebidos pelas linhagens de *C. raciborskii* estudadas no presente trabalho por eventos de transferência lateral, o *contig* contendo o agrupamento STX da linhagem *C. raciborskii* CENA302 (~80 Kb) foi submetido aos programas Artemis, para análise do conteúdo GC, e IsFinder (SIGUIER et al., 2006), para detecção de sequências de inserção, no entanto nenhum sinal de transferência lateral de genes foi detectado. Isto indica outra possibilidade, a de que os dois agrupamentos (CYN e STX) coexistiram no ancestral comum destas linhagens, com ambos tendo sido adquiridos verticalmente. No entanto, a análise de uma sequência mais extensa, contendo mais informações, poderia auxiliar a levantar mais evidências a respeito da história evolutiva desses agrupamentos gênicos.

Um cenário relacionado à hipótese levantada sobre a coexistência dos agrupamentos STX e CYN no ancestral comum das linhagens de *C. raciborskii* ocorre com linhagens

pertencentes ao gênero *Anabaena* quanto à produção de MCY e anatoxina-a(s). Harada et al., (1991) identificaram a produção simultânea da hepatotoxina MCY e da neurotoxina anatoxina-a(s) na linhagem *A. flos-aquae* NRC 525-17. Estudos posteriores com linhagens do mesmo gênero isoladas no continente europeu mostraram que as linhagens *Anabaena* sp. 186, *A. flos-aquae* CYA 83/1, *Anabaena* sp. 202 A1 e 202 A2 produzem apenas variantes da toxina MCY (NAMIKOSHI et al., 1992, 1998; SIVONEN et al., 1992). Por outro lado, florações contendo a espécie *A. lemmermannii*, e também a linhagem *A. lemmermannii* PH-160 B, ambos provenientes da Dinamarca, foram caracterizadas como produtoras de anatoxina-a(s) (ONODERA et al., 1997; DÖÖR et al., 2010). No Brasil, uma floração contendo a espécie *A. crassa* também foi caracterizada por apresentar anatoxina-a(s) (BECKER et al., 2010). A detecção de apenas uma das toxinas sendo produzida pela grande maioria das linhagens e florações estudadas, aliada à evidência de que as duas toxinas são produzidas simultaneamente na linhagem *A. flos-aquae* NRC 525-17 indica que possivelmente o ancestral comum destas linhagens poderia conter em seu genoma os agrupamentos gênicos que codificavam para ambas as toxinas. Esta característica pode ter sido perdida ao longo do tempo, sendo que alguns representantes mantiveram o potencial pra síntese de MCY e outros para síntese de anatoxina-a(s).

A comparação de genomas de bactérias pertencentes à mesma espécie mostra que elas compartilham genes estruturais e a diferença no tamanho de seus genomas reside no fato de as mesmas possuírem “ilhas genômicas” específicas para cada linhagem, que representam fragmentos de DNA importados ou manutenção de fragmentos que foram perdidos pela outra linhagem (PERNA et al., 2001). Nos organismos de vida livre que apresentam a capacidade de adaptação às mais diversas condições ambientais, essas “ilhas” normalmente conferem uma vantagem adaptativa em ambientes com condições específicas, e a perda ou ganho destas “ilhas” pode rapidamente fixar uma determinada população associada a esta vantagem seletiva (PÉREZ-BOCAL et al., 2006). Provavelmente a presença do agrupamento STX pode ter auxiliado na fixação de uma população de *C. raciborskii* única para as condições ambientais bióticas e abióticas encontradas na América do Sul após a perda de genes referentes à capacidade de produção de CYN.

Estudos têm sugerido a ocorrência de elevadas taxas de redução em genomas de bactérias de vida livre como forma de compensar o “ataque” de DNA de fagos ou outros tipos de DNA exógenos (LAWRENCE, 2001). Os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* são considerados até o momento como os menores genomas de cianobactérias filamentosas de vida livre (STUKEN et al., 2010). A redução genômica é uma estratégia bem estabelecida

para eliminação de funções supérfluas, ocorrendo na maioria dos agentes patogênicos obrigatórios, já que seus processos metabólicos são fortemente dependentes do hospedeiro. No entanto, as cianobactérias de vida livre também apresentam redução do genoma por razões que ainda não estão bem estabelecidas, mas que provavelmente estão relacionadas à eficiência genômica e à relativa ambiguidade de certos aspectos do metabolismo (LARSSON; NYLANDER; BERGMANN, 2011).

A avaliação das relações evolutivas entre as linhagens de *C. raciborskii* produtoras e não produtoras de CYN pela construção de uma árvore filogenética pelo método *Neighbor-joining* (NJ) utilizando sequências do gene que codifica para a subunidade 16S do ribossomo procariótico mostra que estes dois genótipos formam um clado monofilético composto por dois grupos. (Figura 29). O grupo I consiste exclusivamente de linhagens não produtoras de CYN, enquanto que o grupo II corresponde às linhagens produtoras. Resultados semelhantes foram obtidos por Beltran e Neilan (2000), que obtiveram uma árvore filogenética composta por dois clados distintos: um consistindo predominantemente por linhagens de *Anabaena* produtoras de STX e outro por não produtoras, sem correlação com o local de isolamento das mesmas. Os autores sugerem que a toxicidade é um traço ancestral que se perdeu ao longo do tempo em algumas linhagens. Como não é observada monofilia nas linhagens americanas, a seleção dos genes de STX em detrimento aos de CYN nestas cianobactérias provavelmente é decorrente de convergência evolutiva, resultado de diversos eventos ocorridos independentemente em diferentes momentos induzidos pelas condições ambientais distintas deste continente.

Um estudo semelhante foi realizado por Moustafa e colaboradores (2009), que indicou filogeneticamente que linhagens produtoras e não produtoras de STX das espécies *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *C. raciborskii* formam clados monofiléticos. De acordo com os autores, isto sugere que a toxicidade pode ser tanto uma característica que foi adquirida pelas linhagens tóxicas por eventos de transferência horizontal de genes, ou alternativamente, é um traço ancestral destas cianobactérias que foi perdido nas linhagens não tóxicas. Este segundo cenário também foi proposto para explicar a distribuição de linhagens tóxicas e não tóxicas do gênero *Planktothrix* quanto à produção da cianotoxina MCY (CHRISTIANSEN et al., 2008). A separação de linhagens produtoras e não produtoras de MCY em dois clados pela análise da sequência referente ao 16S rDNA em *Microcystis* também foi verificada por Otsuka et al (1999). De acordo com os autores, uma vez que outros gêneros de cianobactérias produzem a microcistina, acredita-se que a capacidade para produção desta toxina tenha sido originada de um ancestral comum destes gêneros e a

distribuição de linhagens tóxicas e não tóxicas pode ser resultado de eventos de deleção que ocorreram numerosas vezes ao longo da evolução dessas cianobactérias.

Figura 28 - Análise filogenética de sequências do gene que codifica para a subunidade 16S do rRNA (~1410 pb) usando o método *Neighbor Joining* – NJ. As linhagens brasileiras utilizadas neste trabalho estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó. Linhagens não produtoras de CYN estão destacadas no quadro designado “Grupo I”, linhagens produtoras de CYN destacadas no quadro designado “Grupo II”. A linhagem *Raphidiopsis curvata* HB1 foi utilizada como grupo externo

Estudos sobre a perda de genes sugerem um desvio mutacional para supressões, que leva à erosão das porções genéticas inativas, neutralizando a aquisição contínua de material genético pela transferência horizontal de genes (RANTALA et al., 2004; OSTERMAIER; KURMAYER, 2009). Este processo pode ocorrer através de grandes deleções que podem remover um ou mais genes em um único evento, ou um gene pode primeiro perder a função através de mutações pontuais ou por mudanças no quadro de leitura, gerando um pseudogene que acaba sendo eliminado por pequenas deleções subsequentes (MIRA, OCHMAN, MORAN, 2001). Os resultados obtidos pela análise dos dados genômicos das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 mostram o ocorrência de resquícios de genes relacionados à síntese de CYN nestas linhagens, evidenciando que modificações estruturais nos genomas podem ter estimulado a perda de grandes partes destes genes, fixando uma população que superou esta perda por apresentar capacidade de produção

de um metabólito secundário (STX) que proporciona vantagens competitivas para esta espécie.

5.3.6 Busca por agrupamentos gênicos relacionados à síntese de compostos de interesse produzidos por cianobactérias

A partir do sequenciamento genômico das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 foi possível avaliar o potencial genético de produção de alguns outros metabólitos secundários conhecidos por serem sintetizados por cianobactérias, além da CYN e STX. Assim, foi realizada uma busca utilizando o mapeamento por referência com o programa CLC *Genomics Workbench* das seguintes substâncias: aeruginosina (ISHIDA et al., 2009; inibidor de proteases), cianopectolina (TOOMING et al., 2007; inibidor de proteases), microciclâmida (ZIEMERT et al., 2008; inibidor enzimático com atividade antibacteriana e antimalárica), microviridina (PHILMUS et al., 2008; inibidor de tirosinase usado no tratamento de efisema pulmonar), microcistina (TILLET et al., 2000; hepatotoxicidade, inibidor das enzimas fosfatases 1A e 2A), anabaenopeptolina (CHRISTIANSEN et al., 2011; ROUHIAINEN et al., 2010; ação não determinada), anatoxina-a (MEJEAN et al., 2009; RANTALA-YLINEN et al., 2011; neurotoxicidade, inibidor irreversível da acetilcolinesterase), barbamida (CHANG et al., 2002; JONES et al., 2011; dermatotoxina), criptoficina (MAGARVEY et al., 2006; agente anticancerígeno, ação no citoesqueleto de células cancerígenas), curacina (CHANG et al., 2004; JONES et al., 2011; anticancerígeno), hectoclorina (RAMASWAMY et al., 2007; citotoxicidade, controle do crescimento de *Candida albicans*), jamaicamida (EDWARDS et al., 2004; neurotoxina), lyngbyatoxina (EDWARDS et al., 2004; dermatotoxina) e nostociclopeptideo (LUESCH et al., 2003; antibiótico), nostopeptolida (HOFFMANN et al., 2003; ação não determinada). O número de leituras que mapearam com a sequência codificante, pares de base da sequência consenso gerada e porcentagem do agrupamento gênico representada para cada molécula ativa encontram-se descritos na Tabela 17.

Os resultados obtidos pelo mapeamento por referência demonstraram que as linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 não apresentam potencial genético para a síntese dos compostos buscados, o que pode ser concluído devido ao baixo número de leituras mapeadas e percentual do agrupamento que é representado por estas leituras. Isto era de certa forma esperado, pois embora sejam moléculas produzidas por vários gêneros de cianobactérias, a produção dessas substâncias ainda não foi descrita para o gênero *Cylindrospermopsis*. No entanto, as análises de genomas completos de cianobactérias nas últimas décadas têm mostrado que muitos genomas contêm mais agrupamentos gênicos que

codificam para produtos naturais do que o número de produtos naturais que já foram isolados ou descritos para as mesmas espécies (CORRE; CHALLIS, 2009; WINTER et al., 2011). Uma possível razão para esta observação é o fato de que frequentemente estes produtos naturais são produzidos apenas em condições específicas de crescimento, e os genes responsáveis pela sua síntese podem estar silenciados em condições laboratoriais, sendo que um dos maiores desafios na descoberta de produtos naturais é ativar tais genes em laboratório (SASSO et al., 2011). A busca realizada neste trabalho baseia-se apenas em substâncias que já foram descritas na literatura, ou seja, existe a possibilidade de estas linhagens produzirem outras substâncias de interesse que ainda permanecem desconhecidas até o momento. A busca em alguns genomas de cianobactérias já descritos revela que grande parte destes genomas codifica genes com função hipotética. Por exemplo, as cianobactérias *C. raciborskii* CS-505 e *R. brookii* D9 apresentam aproximadamente 38 e 33 % de genes hipotéticos, respectivamente (STUCKEN et al., 2010); as linhagens *A. variabilis* ATCC 29413 e *Nostoc sp.* PCC 7120 (KANEKO et al., 2001), que também são filamentosas, apresentam aproximadamente 33 e 42 % de genes hipotéticos, respectivamente, enquanto que a linhagem unicelular *M. aeruginosa* NIES-843 (KANEKO et al., 2007) apresenta 39 % de genes hipotéticos. Este elevado número de genes hipotéticos indica que possivelmente muitos dos agrupamentos gênicos que codificam para novos produtos de interesse ainda são considerados hipotéticos na maioria das linhagens cianobacterianas.

Tabela 17 - Dados gerados pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e *C. raciborskii* CENA303 utilizando como referência agrupamentos gênicos de substâncias ativas descritas em cianobactérias

Composto ativo	<i>C. raciborskii</i> CENA302			<i>C. raciborskii</i> CENA303			pb referência	Espécie	n° acesso
	n° leituras mapeadas	Seq. consenso gerada (pb)	% agrup. repres.	n° leituras mapeadas	Seq. consenso gerada (pb)	% agrup. repres.			
Aeruginosina	0	0	0	0	0	0	25.401	<i>M. aeruginosa</i>	FJ609416.1
Cianopeptolina	5	0	0	3.269	674	2,10	31.880	<i>Microcystis sp.</i>	DQ075244.1
Microciclâmica	463	130	0,93	1	100	0,72	13.853	<i>M. aeruginosa</i>	AM774406.1
	4	197	1,56	0	0	0	12.600	<i>M. aeruginosa</i>	AM931579.1
Microviridina	463	130	1,30	699	225	2,25	9.997	<i>M. aeruginosa</i>	AM943877.1
	4	197	2,94	2	197	2,90	6.678	<i>M. aeruginosa</i>	AM943878.1
	0	0	0	0	0	0	6.812	<i>P. agardhii</i>	EU438895.1
Microcistina	390	165	0,25	779	453	0,71	63.623	<i>M. aeruginosa</i>	AF183408.1
Anabaenopeptina	0	0	0	0	0	0	23.949	<i>P. agardhii</i>	EF672686.1
	924	689	1,90	1.024	687	1,89	36.200	<i>Anabaena sp.</i>	GU174493.1
Anatoxina-a	0	0	0	0	0	0	28.910	<i>Oscillatoria sp.</i>	FJ477836.1
	0	0	0	0	0	0	29.504	<i>Anabaena SP.</i>	JF803645.1
Barbamida	1	53	0,13	0	0	0	40.156	<i>L. majuscula</i>	AF516145.1
	1	62	0,23	0	0	0	26.147	<i>L. majuscula</i>	HQ696501.1
Criptoficina	300	79	0,13	586	82	0,14	57.306	<i>Nostoc sp.</i>	EF159954.1
Curacina	94	340	0,38	55	246	0,28	87.427	<i>L. majuscula</i>	AY652953.1
	0	0	0	0	0	0	65.189	<i>L. majuscula</i>	HQ696500.1
Hectoclorina	0	0	0	0	0	0	41.964	<i>L. majuscula</i>	AY974560.1
Jamaicamida	0	0	0	0	0	0	69.900	<i>L. majuscula</i>	AY522504.1
Lingbiatoxina	0	0	0	0	0	0	17.000	<i>L. majuscula</i>	AY588942.1
Nostociclopeptídeo	1	80	0,23	396	243	0,70	34.328	<i>Nostoc sp.</i>	AY167420.1
Nostopeptolida	9	52	0,12	0	0	0	40.989	<i>Nostoc sp.</i>	AF204805.2

5.3.7 Busca por genes relacionados com a fixação biológica do N₂ e diferenciação dos heterócitos

O agrupamento contendo os genes que codificam para o complexo enzimático da nitrogenase na linhagem *C. raciborskii* CENA302 encontra-se presente em um único *contig* proveniente da montagem *ab initio*, que contempla, além do agrupamento completo, os genes flanqueadores. O agrupamento codifica para uma nitrogenase dependente do cofator MoFe e outros genes relacionados à fixação biológica do N₂, formando um agrupamento de 15 Kb. É possível observar a ocorrência de sintenia entre os flanqueadores das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e *C. raciborskii* CS-505, bem como entre os genes presentes no agrupamento da nitrogenase e o sentido de leitura dos mesmos. No isolado brasileiro ocorre uma ORF de 120 pb (*orf4*) entre os genes *nifX* e *nifE* que não possui similaridade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Na linhagem *C. raciborskii* CENA303 verificou-se que o agrupamento dos genes relacionados à fixação do N₂ estava distribuído em quatro *contigs*: o primeiro contendo os genes *nifB*, *fdxN*, *nifS*, *nifU* e *nifD*; o segundo contendo os genes *nifK*, a *orf5* que não possui similaridade com sequências depositadas no banco de dados, *nifE*, *nifN*, *nifX*, e os genes sem função conhecida *duf269* e *duf683*; o terceiro contendo o gene *nifW*, e o último os genes *hesA*, *hesB*, *fdxH* e *feoA*. O posicionamento destes *contigs* na linhagem *C. raciborskii* CENA303 (Figura 29), é apenas uma hipótese, formulada com base nos agrupamentos *nif* encontrados nas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CS505. A identidade das proteínas codificadas em cada um dos genes em comparação com os genes da linhagem *C. raciborskii* CS-505 encontra-se na Tabela 18. É possível verificar uma alta identidade entre todas as sequências proteicas. A comparação destes genes entre as linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 mostra que as proteínas relacionadas à fixação do N₂ codificadas pelas mesmas apresentam 100% de similaridade. Este resultado indica que apesar da linhagem *C. raciborskii* CENA303 não apresentar o fenótipo de fixação do N₂, a mesma apresenta potencial genético para que esta função ocorra normalmente. Possivelmente ocorreram mecanismos de regulação a nível transcricional que impediram a expressão deste fenótipo. A atividade da nitrogenase em vários micro-organismos diazotróficos é inibida pela adição de NH₄⁺ de forma rápida e reversível (ZUMFT, 1985), e a regulação da expressão nitrogenase se faz necessária em virtude do alto custo energético da redução de N₂. Todavia, este processo, assim como observado em cianobactérias classificadas no gênero *Raphidiopsis*, pode ser resultante da tendência de redução genômica observada nestes gêneros (LARSSON et al., 2011).

Figura 29 - Organização estrutural dos genes relacionados à fixação do N₂ nas linhagens de *C. raciborskii* A) CENA302, B) CS-505 e C) CENA303

Tabela 18 - Valores de similaridade entre as sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela fixação biológica do N₂ nas linhagens de *C. raciborskii* CENA302, CENA303 e CS-505

	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303	<i>C. raciborskii</i> CENA302
	X	X	X
	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CENA303
NifB	99	99	100
FdxN	94	94	100
NifS	99	99	100
NifU	97	97	100
NifH	99	99	100
NifD	99	99	100
NifK	99	99	100
NifE	99	99	100
NifN	99	99	100
NifX	97	97	100
Duf269	98	98	100
Duf683	100	100	100
NifW	96	96	100
HesA	99	99	100
HesB	96	96	100
FdxH	99	99	100
FeoA	97	97	100

Em cianobactérias da ordem Nostocales, a fixação do N₂ ocorre em células especializadas chamadas de heterócito. O processo de diferenciação desta célula foi descrito detalhadamente apenas nos gêneros *Anabaena* e *Nostoc*, os quais desenvolvem heterócitos intercalares (ZHANG et al., 2006). Stucken et al. (2010) descreveram por genômica comparativa os genes responsáveis pela diferenciação destas células em gêneros que desenvolvem heterócitos terminais, como é o caso de *Cylindrospermopsis* e

Cylindrospermum. A Tabela 19 mostra os resultados obtidos pelo mapeamento por referência utilizando como referência os genes descritos para a linhagem CS-505. Essa abordagem foi escolhida pelo fato de tais genes não estarem organizados no genoma na forma de agrupamento. Pelo tamanho da sequência consenso gerada é possível inferir que tais genes estão presentes no genoma de ambas as cianobactérias. No entanto, para a linhagem *C. raciborskii* CENA303 o gene *hetP* apresenta um tamanho menor que o esperado, sendo uma possível justificativa para a ausência da diferenciação dos heterócitos nesta linhagem. O alinhamento das sequências de aminoácidos desta proteína presente na linhagem *C. raciborskii* CS-505 e CENA303 mostra que a perda destes nucleotídeos leva à formação de um códon de parada, o que possivelmente promove a perda de função desta proteína no isolado brasileiro *C. raciborskii* CENA303 (Figura 31), que está relacionada à regulação da diferenciação dos heterócitos (HIGA; CALLAHAN, 2010).

Tabela 19 - Genes relacionados à diferenciação dos heterócitos na espécie *C. raciborskii*. Dados obtidos pelo mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento genômico utilizando como referência os genes descritos na linhagem *C. raciborskii* CS-505

	pb gene referência	pb consenso <i>C. raciborskii</i> CENA302	pb consenso <i>C. raciborskii</i> CENA303	Função
<i>abp3</i>	591	540	541	Diferenciação
<i>hetF</i>	2364	2364	2364	Diferenciação
<i>hetP</i>	258	258	205	Indução
<i>hetR</i>	900	900	900	Indução
<i>hetZ</i>	1197	1197	1197	Diferenciação
<i>hglT</i>	1257	1257	1256	Diferenciação
<i>nrrA</i>	780	780	780	Regulação
<i>ntcA</i>	663	663	663	Regulação
<i>patA</i>	927	920	920	Diferenciação
<i>patN</i>	642	642	638	Diferenciação
<i>patU3</i>	777	777	777	Diferenciação

Figura 30 – Alinhamento das sequências de aminoácidos codificados pelo gene *hetP* das linhagens *C. raciborskii* CS-505 e CENA303, mostrando a perda de uma parte deste gene na linhagem brasileira

O processo de diferenciação dos heterócitos apresenta essencialmente quatro estágios: indução da diferenciação (*hetR*, *hetP*), padrão de diferenciação (*patN*, *patA*), diferenciação (*abp3*, *hetF*, *hetZ*, *hglT*) e maturação. A indução de diferenciação é provocada por uma carência de nitrogênio combinado, o que resulta na acumulação de 2-oxoglutarato

nas células do filamento (LAURENT et al., 2005). Esse sinal de privação de nitrogênio é percebido pela enzima NtcA, o regulador global do metabolismo do nitrogênio (HERRERO et al., 2001). A ligação de 2-oxoglutarato a NtcA aumenta a sua atividade e, entre outras coisas, promove a transcrição de *nrrA* (VALLADARES et al., 2008). NrrA, por sua vez, regula positivamente a transcrição de *hetR* (EHIRA; OHMORI, 2006), que codifica para o que é considerado o regulador mestre de diferenciação de heterócitos.

O desenvolvimento do heterócito envolve a síntese e deposição de uma camada interna de glicolípídeo e, em seguida, cobertura da célula com um envelope polissacarídico (ZHANG et al., 2006), os quais isolam a célula diferenciada do oxigênio externo protegendo a nitrogenase. A camada interna de glicolípídeo é sintetizada por um agrupamento gênico que foi descrito para a linhagem *C. raciborskii* CS-505, sendo composta pelos genes *hglEGDCA* e *hetM* (STUCKEN et al., 2010). A busca por esse agrupamento nos *contigs* gerados pela montagem *ab initio* da linhagem *C. raciborskii* CENA302 mostrou que tais genes estão organizados da mesma forma que na linhagem australiana e as sequências de aminoácidos apresentam alta identidade entre si (Figura 31, Tabela 20). Para a linhagem *C. raciborskii* CENA303 não foi possível localizar tais genes em um único *contig*, optando-se então pelo mapeamento por referência, utilizando para tal o agrupamento gênico encontrado na linhagem CENA302 (Figura 31). A anotação manual dos genes desta linhagem mostrou também alta identidade da sequência de aminoácidos com os codificados pelos genes do isolado australiano *C. raciborskii* CS-505, além disso, as sequências de aminoácidos codificadas por estes genes nos isolados brasileiros apresentaram 100% de identidade entre si (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela formação da camada glicolipídica dos heterócitos em linhagens de *C. raciborskii*

	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303	<i>C. raciborskii</i> CENA302
	X	X	X
	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CENA303
HglE	96	96	100
HglG	97	97	100
HglD	98	98	100
HglC	97	97	100
HglA	97	97	100
HetM	96	96	100

Figura 31 - Organização dos genes referentes à formação da camada glicolipídica do heterócito em linhagens de *C. raciborskii*

Os genes responsáveis pela síntese do envelope polissacarídico (HUANG et al., 2005) também foram buscados nos dois isolados brasileiros. Neste caso, como no anterior, esses genes foram encontrados em um único *contig* na montagem *ab initio* da linhagem *C. raciborskii* CENA302. Na linhagem *C. raciborskii* CENA303 foi necessário realizar o mapeamento por referência utilizando a própria sequência da CENA302 como molde. A organização dos genes *devA*, *devB* e *devC* é igual nos isolados brasileiros e no australiano, apresentando um valor de identidade elevado (Figura 32, Tabela 21). Os dois isolados brasileiros apresentam 100% de identidade entre as sequências de aminoácidos destes genes (Tabela 21).

Tabela 21 - Valores de similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes responsáveis pela formação da camada polissacarídica dos heterócitos em linhagens de *C. raciborskii*

	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> CENA303	<i>C. raciborskii</i> CENA302
	X	X	X
	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CENA303
DevA	97	97	100
DevB	98	98	100
DevC	98	98	100

Figura 32 - Organização dos genes referentes à formação da camada polissacarídica do heterócito em linhagens de *C. raciborskii*

O experimento realizado utilizando diferentes meios de cultivo com ou sem a presença de uma fonte de nitrogênio prontamente assimilável (item 5.1) mostrou que a linhagem *C. raciborskii* CENA303 não é capaz de se desenvolver na ausência de nitrogênio e também não apresentou formação dos heterócitos em nenhuma das condições utilizadas, contrariando a conhecida capacidade de fixação biológica do N_2 e formação de heterócitos por este gênero. A análise da expressão destes genes utilizando a ferramenta de sequenciamento do RNA correspondente nesta linhagem pode confirmar a expressão de genes relacionados à fixação biológica do N_2 e à formação dos heterócitos, permitindo a predição de que passos destas rotas não se encontram funcionais neste organismo. Possivelmente a ausência do gene completo *hetP* pode ser um dos principais fatores que impediram a formação do heterócito na linhagem *C. raciborskii* CENA303, sem o qual não é possível realizar a fixação biológica do N_2 .

6 CONCLUSÕES

Os dados gerados neste estudo fortalecem a hipótese de que as linhagens brasileiras da espécie *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 apresentaram em algum momento de sua história evolutiva o agrupamento gênico que codifica as enzimas relacionadas à síntese de CYN, no entanto, atualmente, este agrupamento encontra-se em processo avançado de redução. Questões relacionadas ao rearranjo genômico bem como interações alopátricas podem justificar a presença de diferentes fenótipos tóxicos de *C. raciborskii* que se estabeleceram em regiões geográficas distantes.

Além disso, este trabalho evidencia que algumas linhagens de *C. raciborskii* podem ser erroneamente classificadas como pertencentes a outro gênero por não expressarem os fenótipos relacionados à fixação biológica do N₂ e diferenciação dos heterócitos. No entanto, a análise genômica permitiu estabelecer o potencial destas linhagens para realização destes processos.

As perspectivas futuras incluem a finalização dos genomas sequenciados e a localização exata dos fragmentos de genes de CYN amplificados e/ou mapeados. Isso inclui o uso de programas que possibilitem a separação das leituras obtidas para cada um dos gêneros presentes na amostra, incluindo a cianobactéria e as bactérias contaminantes, e esforços para o fechamento de *gaps* e posicionamento dos *contigs* obtidos, além da anotação dos genes presentes em ambos os genomas sequenciados e estudos por genômica comparativa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.; STAL, L.J.; HASNAIN, S. Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. **Plant Soil and Environment**, Tesnov, v. 336, n. 1/2, p. 363-375, 2010.
- ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates, **Journal of Phycology**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1968.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, M.W.; SCHRIJVER, I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. **Gene**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 38-69, 2010.
- ANSORGE, W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.
- ANTAL, O.; KARISZTL-GÁCSI, M.; FARKAS, A.; KOVÁCS, A.; ÁCS, A.; TÖRO, N.; KISS, G.; SAKER., GYORI, J.; BÁNFALVI., G.; VEHOVSZKY, Á. Screening the toxic potential of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Lake Balaton, Hungary. **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 831-840, 2011.
- APELDOORN, M.E. van; EGMOND, H.P. van; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 51, n. 1, p.7-60, 2007.
- APPEL, R.D.; BAIROCH, A.; HOCHSTRASSER, D.F. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. **Trends in Biochemical Science**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 258-260, 1994.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystin during renal dialysis treatment in Caruaru. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181/182, p. 441-446, 2002.
- BAIROCH, A.; APPEL, R.D.; PEITSCH, M.C. The ExPASy WWW Server – a tool for proteome research. **Nucleic Acids Research**, London, v. 81, p.5-7, 1997.
- BALDWIN, J.E.; THOMAS, R.C.; KRUSE, L.I.; SILBERMAN, L. Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 42, n. 24, p. 3846-3852, 1977.
- BALLOT, A.; RAMM, J.; RUNDBERGET, T.; KAPLAN-LEVY, R.N.; HADAS, O.; SUKENIK, A.; WIEDNER, C. Occurrence of non-cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena bergii* in Lake Kinneret (Israel). **Journal of Plankton Research**, New York, v. 33, n. 11, p. 1736-1746, 2011.

- BANKER, R.; TELTSCH, B.; SUKENIK, A.; CARMELI, S. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 3, p. 387–389, 2000.
- BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, New York, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997.
- BARRIOS-LLERENA, M.E.; BURJA, A.M.; WRIGHT, P.C. Genetic analysis of polyketide syntase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 34, n. 6, p. 443-456, 2007.
- BAR-YOSEF, Y.; SUKENIK, A.; HADAS, O.; VINER-MOZZINI, Y.; KAPLAN, A. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 17, p. 1557-1561, 2010.
- BECKER, V.; ILHARA, P.; YUNES, J.S.; HUSZAR, V.L.M. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 235-241, 2010.
- BELTRAN, E.A.; NEILAN, B.A. Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4468-4474, 2000.
- BERGER, C.; BA, N.; GUGGER, M.; BOUVY, M.; RUSCONI, F.; COUTÉ, A.; TROUSSELLIER, M.; BERNARD, C. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake Guiers (Senegal, West Africa). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 355–366, 2006.
- BERGMAN, B.; RAI, A.N.; RASMUSSEN, U. Cyanobacterial associations. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Springer: Dordrecht, 2007. chap. 12, p. 257–301.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.; KÜPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, P.F. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, v. 294, n. 5546, p. 1534-1537, 2011.
- BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRE, R.; KRYSS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.
- BERRY, J.P.; GIBBS, P.D.; SCHMALE, M.C.; SAKER, M.L. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Toxicon**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 289-299, 2009.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1518, 1979.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; KUJBIDA, P.; MOURA, A.N. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. **Journal of Water Resource and Protection**, Herndon, v. 3, n. 6, p. 349-355, 2011.

BLÁHOVÁ, L.; ORAVEC, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; SIMEK, Z.; BLÁHA, L. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. **Toxicon**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 519-524, 2009.

BLANKENSHIP, R.E.; HARTMAN, H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 23, n. 3, p. 94-97, 1998.

BÖHME, H. Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 9, p. 346-351, 1998.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 23, p. 13-27, 2000.

BOUVY, M.; MOLICA, R.; OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 20, p. 285-297, 1999.

BOUVY, M.; NASCIMENTO, S.M.; MOLICA, R.J.R.; FERREIRA, A.; HUSZAR, V.; AZEVEDO, S.M.F.O. Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 493, n. 1/3, p. 115-130, 2003.

BRANCO, C.W.C.; SENNA, P.A.C. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Bulletin Du Jardin botanique national de Belgique**, Belgium, v. 61, n. 1/2, p. 85-91, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, 12/12/2011**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 20 jan. 2012.

BRIAND, J.F.; LEBOULANGER, C.; HUMBERT, J.F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, New York, v. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.

BRIAND, J.F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERAS, C.; HUMBERT, J.F.; COUTÉ, A., BERNARD C. 2. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, New York, v. 36, n. 13, p. 3183-3192, 2002.

- BRIENT, L.; LENGRONNE, M.; BORMANS, M.; FASTNER. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. **Environmental Toxicology**, New York, v. 24, n. 4, p. 415-420, 2009.
- BROCKS, J.J.; LOGAN, G.A.; BUICK, R.; SUMMONS, R.E. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. **Science**, Washington, v. 285, n. 5430, p. 1033-1336, 1999.
- BURGOYNE, D.L.; HEMSCHIEDT, T.K.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Biosynthesis of cylindrospermopsin. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 65, n. 1, p. 152-156, 2000.
- CANFIELD, D.E. The early history of atmospheric oxygen. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, Palo Alto, v. 33, p. 1-36, 2005.
- CANNON, F.C.; BEYNON, J.; BUCHANAN-WOLLASLON, V.; BURGHOFF, R.; CANNON, M. Progress in understanding organization and expression of *nif* genes in *Klebsiella*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Holland-Nijhof, 1985. p. 453-460.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.
- CARNEIRO, A.R.; CARDEIRA, L.T.; OLIVEIRA, R.S.de; RAMOS, R.T.J. Montagem, geração de *scaffolds* e finalização de genomas procariotos *in silico*. In: AZEVEDO, V.A. de C.; SCHINEIDER, M.P.; SILVA, A.L.da C.; MIYOSHI, A.; BORÉM, A. (Ed.). **Manual prático-teórico: sequenciamento, montagem e anotação de genomas bacterianos**. Visconde de Rio Branco: Suprema, 2011. p. 59-74.
- CARNEIRO, T.G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 32, p. 36-41, 2007.
- CARVALHO, M.C.C.G.C.; SILVA, D.C.G. da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.
- CASTENHOLZ, R.W. Phylum BX. Cyanobacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 473-487.
- CASTRESANA, J.; SARASTE, M. Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 20, n. 11, p. 443-448, 1995.
- CASTRESANA, J.; LÜBBEN, M.S.; HIGGINS, D.G. Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. **EMBO Journal**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 2516-2525, 1994.

CHANG, Z.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V.A.; WILLS, C.L.; SHERMAN, D.H. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. **Gene**, Amsterdam, v. 269, n. 1/2, p. 235-247, 2002.

CHANG, Z.; SITACHITTA, N.; ROSSI, J.V.; ROBERTS, M.A.; FLATT, P.M.; JIA, J.; SHERMAN, D.H.; GERWICK, W.H. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 67, n. 8, p. 1356-1367, 2004.

CHELLAPA, N.T.; COSTA, M.A.M. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologia**, Paris, v. 24, n. 1, p. S3-S10, 2003.

CHELLAPPA, N.T.; BORBA, J.M.; ROCHA, O. Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 477-494, 2008.

CHISWELL, R.K.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.; SMITH, M.J.; NORRIA, R.L.; SEAWRIGTH, A.A.; MOORE, M.R. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 155-161, 1999.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, F.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 345-355, 2004.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health Consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon; WHO, 1999. 416 p.

CHRISTIANSEN, G.; MOLITOR, C.; PHILMUS, B.; KURMAYER, R. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 8, p. 1695-1704, 2008.

CHRISTIANSEN, G.; PHILMUS, B.; HEMSCHIEDT, T.; KURMAYER, R. Genetic variation of adenylation domains of the anabaenopeptin synthesis operon and evolution of substrate promiscuity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 15, p. 3822-3831, 2011.

COSTA, I.A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; SENAA, P.A.C.; BERNARDO, R.R.; COSTA, S.M.; CHELLAPPA, N.T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 66, n. 1b, p. 211-219, 2006.

COUTÉ, A.; BOUVY, M. A new species of the genus *Cylindrospermopsis*, *C. acuminato-crispa* spec. nova (Cyanophyceae, Nostocales) from Ingazeira reservoir, Northeast Brazil. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 113, p. 57-72, 2004.

COUTÉ, A.; LEITAO, M.; SARMENTO, H. *Cylindrospermopsis sinuosa* spec. nova (Cyanophyceae, Nostocales), a new species from south-west of France. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 150, p. 1-15, 2004.

CRONBERG, G.; KOMÁREK, J. Some Nostocalean Cyanoprokaryotes from lentic habitats of Eastern and Southern Africa. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 78, n. 1/2, p. 71-106, 2003.

CROSSETTI L.O.; BICUDO, C.E.D. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 614, n. 1, p. 91-105, 2008.

DANTAS, E.W.; MOURA, A.N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; TOLEDO ARRUDA NETO, J.D.; CAVALCANTI, A.D.C. Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 970-982, 2008.

DELCHER, A.L.; HARMON, D.; KASIF, S.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 23, p. 4636-4641, 1999.

DÖRR, F.A.; RODRIGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 92-99, 2010.

DUCAT, D.C.; WAY, J.C.; SILVER, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. **Trends in Biotechnology**, London, v. 29, n. 2, p. 95-103, 2011.

DYBLE, J.; TESTER, P.A.; LITAKER, R.W. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. **African Journal of Marine Science**, Grahamstown, v. 28, n. 2, p. 309-312, 2006.

EDWARDS, D.J.; MARQUEZ, B.L.; NOGLE, L.M.; MCPHAIL, K.; GOEGER, D.E.; ROBERTS, M.A.; GERWICK, W.H. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chemistry and Biology**, London, v. 11, n. 6, p. 817-833, 2004.

EHIRA, S.; OHMORI, M. NrrA directly regulates expression of *hetR* during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 24, p. 8520-8525, 2006.

ELENKIN, A. Neskolko slov povodu roda *Anabaenopsis* (Wolos.) Miller iz sizelenykh vodoroslei. **Botaniceskie Materialy, Instituti Sporovykh Rastenij Botaniceskogo U.S.S.R.**, Moscow, v. 2, p. 73-78. 1923.

EVERSON, S.; FABBRO, L.; KINNEAR, S.; WRIGTH, P. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosznska) Seenaya and Subba Raju. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 254-264, 2011.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, n. 4, p. 299-304, 2006.

FALCONER, I.R.; BARTRAM, J.; CHORUS, I.; KUIPER-GOODMAN, T.; UTKILEN, H.; BURCH, M.; CODD, G.A. Safe levels and safe practices. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water**. London: E & FN Spon, 1999. p. 155-178.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; HUMPAGE, A.R.; MISCHKE, U.; EAGLESHAM, G.K.; CHORUS, I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 313-321, 2003.

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.S.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 2, p. 479-489, 2009.

_____. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution**, New York, v. 158, n. 6, p. 2084-2093, 2010.

FIGUEREDO, C.C.; GIANI, A. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Carlos, v. 39, n. 4, p. 264-272, 2009.

FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 453-488, 2004.

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

FONSECA, B.M.; BICUDO, C.E.D. Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brazil). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 600, n. 1, p. 267-282, 2008.

FRANGÓPULOS, M.; GUISANDE, C.; deBLAS, E.; MANEIRO, E. Toxin production and competitive abilities under phosphate limitation of *Alexandrium* species. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 131-139, 2004.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; BURCHAM, P.C.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 18, n. 4, p. 243-251, 2003.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G.; FALCONER, I.R. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 191-198, 2008.

GALLO, P.; FABRROCINO, S.; CERULO, M.G.; FERRANTI, P.; BRUNO, M.; SERPE, L. Determination of cylindrospermopsin in freshwater and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Malden, v. 23, n. 20, p. 3279-3284, 2009.

GEMELGO, M.C.P.; MUCCI, J.L.N.; NAVAS-PEREIRA, D. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in Brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, Sao Paulo). **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 1001-1013, 2009.

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

GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J. R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen der Internationalen Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte. **Limnologie**, Tolouse, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRIFFITHS, D.J.; SAKER, M.L. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 2, p. 78-93, 2003.

HALL, T. **Bioedit**: version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, 2001.

HARADA, K.; OGAWA, K.; KIMURA, Y.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; THORN, P.M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 4, n. 5, p. 535-540, 1991.

HARADA, K.I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; TERAOKA, K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 73-84, 1994.

HAWKINS, P.R.; PUTT, E.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, n. 6, p. 460-467, 2001.

HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HAWKINS, P.R.; CHANDRASENA, N.R.; JONES, G.J.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 341-346, 1997.

HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHRENZEL, J. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Research**, New York, v. 18, n. 5, p. 802-809, 2008.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 2, p. 411-425, 2001.

HIGA, K.C.; CALLAHAN, S.M. Ectopic expression of *hetP* can partially bypass the need for *hetR* in heterocyst differentiation by *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 562-574, 2010.

HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; MOORE, R.E.; MOORE, B.S. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. gsv224. **Gene**, Amsterdam, v. 311, p. 171-180, 2003.

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

HOFF-RISSETI, C. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HOFF-RISSETI, C.; DÖRR, F.A.; SCHAKER, P.D.C.; PINTO, E.; WERNER, V.R.; FIORE, M.F. Simultaneous detection of cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in Brazilian isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOTOTROPHIC PROKARYOTES, 14., 2012, Porto. **Proceedings...** Porto: IBMC, 2012. p. 155.

HUANG, G.; FAN, Q.; LECHNO-YOSSEF, S.; WOJCIUCH, E.; WOLK, C.P.; KANEKO, T.; TABATA, S.; Clustered genes required for the synthesis of heterocyst envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 3, p. 1114-1123, 2005.

HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 2, p. 94-103, 2003.

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 472, n. 1-2, p. 155-161, 2000.

HUMPAGE, A.R.; FONTAINE, F.; FROSCIO, S.; BURCHAM, P.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v. 68, n. 9, p.739-753, 2005.

HUSZAR, V.L.M.; SILVA, L.H.S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; SANT'ANNA, C.L. Cyanoprokariote assemblage in eight productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, London, v. 424, p. 67-77, 2000.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, L.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J.P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, M.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J.C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R.H.; WILSON, R.K.; HILLIER, L.W.; MCPHERSON, J.D.; MARRA, M.A.; MARDIS, E.R.; FULTON, L.A.; CHINWALLA, A.T.; PEPIN, K.H.; GISH, W.R.; CHISSOE, S.L.; WENDL, M.C.; DELEHAUNTY, K.D.; MINER, T.L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J.B.; COOK, L.L.; FULTON, R.S.; JOHNSON, D.L.; MINX, P.J.; CLIFTON, S.W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGETT, N.; CHENG, J.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R.A.; MUZNY, D.M.; SCHERER, S.E.; BOUCK, J.B.; SODERGREN, E.J.; WORLEY, K.C.; RIVES, C.M.; GORRELL, J.H.; METZKER, M.L.; NAYLOR, S.L.; KUCHERLAPATI, R.S.; NELSON, D.L.; WEINSTOCK, G.M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, Y.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; SMITH, D.R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H.M.; DUBOIS, J.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R.W.; FEDERSPIEL, N.A.; ABOLA, P.; PROCTOR, M.J.; ROE, B.A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W.R.; BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J.A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D.G.; BURGE, C.B.; CERUTTI, L.; CHEN, H.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R.R.; DOERKS, T.; EDDY, S.R.; EICHLER, E.E.; FUREY, T.S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J.G.R.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L.S.; JONES, T.A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W.J.; KITTS, P.; KOONIN, E.V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T.M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J.V.; MULDER, N.; POLLARA, V.J.; PONTING, C.P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A.F.A.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y.I.; WOLFE, K.H.; YANG, S.; YEH, R.; COLLINS, F.; GUYER, M.S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K.A.; MYERS, R.M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D.R.; OLSON, M.V.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G.A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; MORGAN, M.J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

ISHIDA, K.; NAKAGAWA, H.; MURAKAMI, M. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 63, n. 9, p. 1315 – 1317, 2000.

ISHIDA, K.; WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; CODEL-SIX, S.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E.; HERTWECK, C.; MARSAC, N.T. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2017-2026, 2009.

JIANG, Y.; XIAO, P.; YU, G.; SANO, T.; PAN, Q.; LI, R. Molecular basis and phylogenetic implications of deoxycylindrospermopsin biosynthesis in the cyanobacterium *Raphidiopsis curvata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 2256-2263, 2012.

JONES, A.C.; MONROE, E.A.; PODELL, S.; HESS, W.R.; KLAGES, S.; ESQUENAZI, E.; NIESSEN, S.; HOOVER, H.; ROTHMANN, M.; LASKEN, R.S.; YATES, J.R.; REINHARDT, R.; KUBE, M.; BURKART, M.D.; ALLEN, E.E.; DORRESTEIN, P.C.; GERWICK, W.H.; GERWICK, L. Genomic insights into the physiology and ecology of the marine filamentous cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Proceedings of the National of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 21, p. 8815-8820, 2011.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKO, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, n. 5, p. 205-213, 2001.

KANEKO, T.; NAKAJIMA, N.; OKAMOTO, S.; SUZUKI, I.; TANABE, Y.; TAMAOKI, M.; NAKAMURA, Y.; KASAI, F.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y.; ONO, A.; SHIMIZU, Y.; TAKAHASHI, C.; MINAMI, C.; FUJISHIRO, T.; KOHARA, M.; KATOH, M.; NAKAZAKI, N.; NAKAYAMA, S.; YAMADA, M.; TABATA, S.; WATANABE, M.M. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, Tokyo, v. 14, n. 6, p. 247-256, 2007.

KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H.; TANAKA, A.; ASAMIZU, E.; NAKAMURA, Y.; MIYAJIMA, N.; HIROSAWA, M.; SUGIURA, M.; SASAMOTO, S.; KIMURA, T.; HOSOUCHI, T.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; NARUO, K.; OKUMURA, S.; SHIMPO, S.; TAKEUCHI, C.; WADA, T.; WATANABE, A.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, Tokyo, v. 3, n. 3, p. 109–136, 1996.

KASTING, J.F. Earth's early atmosphere. **Science**, Washington, v. 259, n. 5097, p. 920-926, 1993.

KEHR, J.-C.; PICCHI, D.G.; DITTMANN, E. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Frankfurt, v. 7, p. 1622-1635, 2011.

KELLMANN, R.; MILLS, T.; NEILAN, B.A. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis Enzymes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 62, n. 3, p. 267–280, 2006.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; JEON, Y.J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 4044–4053, 2008.

KISS, T.; VEHOVSZKY, A.; HIRIPI, L.; KOVACS, A.; VOROS, L. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. **Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 131, n. 2, p. 167–176, 2002.

KOKOCINSKI, M.; DZIGA, D.; SPOOF, L.; STEFANIAK, K.; JURCZAK, T.; MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; MERILUOTO, J. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 669-675, 2009.

KOMÁREK, J.; KLING, H. Variation in six planktic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). **Algological Studies**, Stuttgart, v. 61, p. 24-45, 1991.

KOMÁRKOVÁ, J. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FICOLOGIA, 4., 1998, São Paulo. **Anais...** Caxambu : SFLC, 1998. p. 327-340.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P.A.C. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina. **Brazilian Algological Studies**, São Paulo, v. 94, p. 207-222, 1999.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; TAVERA, R. Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) in the phytoplankton of Lake Catemaco (Veracruz, Mexico). **Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 403-422, 1996.

KOTAI, J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. **Norwegian Institute for Water Research**, Oslo, v. B-11/69, p. 1–5, 1972.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; BÖRNER, T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 831-841, 2004.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1359–1373, 1999.

LARSSON, J.; NYLANDER, J.A.; BERGMANN, B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptative traits. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 187, p. 1-22, 2011.

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

LAURENT, S.; CHEN, H.; BÉDU, S.; ZIARELLI, F.; PENG, L.; ZHANG, C.C. Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 28, p. 9907-9912, 2005.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; LIU, Y.; WATANABE, M.M. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, New York, v. 37, n. 6, p. 1121–1126, 2001a.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITCHAI, W.; KAYA, K.; WATANABE M.M. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 973–980, 2001b.

LIN, S.; WU, Z.; YU, G.; ZHU, M.; YU, B.; LI, R. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) strains from China. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 87-97, 2010.

LUESCH, H.; HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; BECKER, J.E.; GOLAKOTI, T.; MOORE, R.E. Biosynthesis of 4-methylproline in cyanobacteria: cloning of *nosE* and *nosF* genes and biochemical characterization of the encoded dehydrogenase and reductase activities. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 68, n. 1, p. 83-91, 2003.

MACLEAN, D.; JONES, J.D.; STUDHOLME, D. Application of “Next Generation” sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, n. 4, p. 287-296, 2009.

MAGARVEY, N.A.; BECK, Z.Q.; GOLAKOTI, T.; HUBER, U.; HEMSHEIDT, T.K.; ABELSON, D.; MOORE, R.E.; SHERMAN, D.H. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from cyanobionts. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 1, n. 12, p. 766-779, 2006.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2651-2673, 1997.

MASANGO, M.; MYBURGH, J.; BOTHA, C.; LABUSCHAGNE, L.; NAICKER, D. A comparison of in vivo and in vitro assays to assess the toxicity of algal blooms. **Water Research**, Oxford, v. 42, n. 13, p. 3241-3248, 2008.

MATHYS, W., SURHOLT, B. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 207, n. 6, p. 601-605, 2004.

MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; PICHON, V.; MÉJEAN, A.; PLOUX, O. The last step of the biosynthesis of the cyanotoxins cylindrospermopsin and 7-epi-cylindrospermopsin is catalysed by CyrI, a 2-oxoglutarate-dependent iron oxygenase. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 12, n. 6, p. 858 – 862, 2011.

MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; MANN, S.; PICHON, V.; MÉJEAN, A.; PLOUX, O. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 15, p. 4943–4949, 2010.

MAZUR, B.J.; RICE, D.; HASELKORN, R. Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 1, p. 186-190, 1980.

MBEDI, S.; WELKER, M.; FASTNER, J.; WIEDNER, C. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 299-306, 2005.

MCGREGOR, G.B.; SENDALL, B.C.; HUNT, L.T.; EAGLESHAM, G.K. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 402–410, 2011.

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

MEREL, S.; CLÉMENT, M.; MOUROT, A.; FESSARD, V.; THOMAS, O. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3433-3442, 2010.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 16, n. 2, p. 103-112, 2003.

MIHALI, T.K.; KELLMANN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 716–722, 2008.

MILLER, V.V. K Sistematike roda *Anabaena Bory*. To the systematics of the genus *Anabaena bory*. **Russian Archive for Protistology**, Moskow, v. 2, p. 116-126, 1923.

MIRA, A.; OCHMAN, H.; MORAN, N.A. Deletional bias and the evolution of bacterial genomias. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 589-596, 2001.

MISCHKE, U. Cyanobacteria associations in shallow polytrophic lakes: influence of environmental factors. **Acta Oecologica**, Paris, v. 24, p. 11–23, 2003.

MOHAMED, Z.A. First report f toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 749-761, 2007.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Australis**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 229-24, 2009.

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, Odense, v. 41, n. 6, p. 606–611, 2002.

MOSCHINI-CARLOS, V.; BORTOLI, S.; PINTO, E.; NISHIMURA, P.Y.; DE FREITAS, L.G.; POMPEO, M.L.M.; DÖRR, F. Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brazil). **Limnetica**, Barcelona, v. 28, n. 2, p. 273-282, 2009.

MOUSTAFA, A.; LORAM, J.E., HACKETT, J.D.; ANDERSON, D.M.; GERALD, P.; BHATTACHARYA, D. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. **PLOS One**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2009.

MYERS, E.W.; G.G. SUTTON, A.L. DELCHER, I.M. DEW, D.P. FASULO, M.J. FLANIGAN, S.A. KRAVITZ, C.M. MOBARRY, K.H.J. REINERT, K.A. REMINGTON, E.L. ANSON, R.A. BOLANOS, H.-H. CHOU, C.M. JORDAN, A.L. HALPERN, S. LONARDI, E.M. BEASLEY, R.C. BRANDON, L. CHEN, P.J. DUNN, Z. LAI, Y. LIANG, D.R. NUSSKERN, M. ZHAN, Q. ZHANG, X. ZHENG, G.M. RUBIN, M.D. ADAMS & J.C. VENTER. A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. **Science**, Washington, v. 287, n. 5461, p. 2196-2204, 2000.

NAMIKI, T.; HACHIYA, T.; TANAKA, H.; SAKAKIBARA, Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to *de novo* metagenome assembly from short sequence reads. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, n. 20, p. e155, 2012.

NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Two new L-serine variants of microcystins-LR and –RR from *Anabaena* sp. strains 202 A1 and 202 A2. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1457-1464, 1992.

- NAMIKOSHI, M.; YUAN, M.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHARD, K.L.; ROUHIAINEN, L.; SUN, F.; BRITTAIN, S.; OTSUKI, A. Seven new microcystins possessing two L-glutamic acids units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, US, v. 11, n. 2, p. 143-149, 1998.
- NARZISI, G.; MISHRA, B. Comparing De Novo Genome Assembly: the long and short of it. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e19175, 2011.
- NEILAN, B.A.; SAKER, M.L.; FASTNER, J.; TÖRÖKNÉ, A.; BURNS, B.P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 133-140, 2003.
- NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; PIERENS, G.; SHAW, G.R.; SMITH, M.J.; CHISWELL, R.K.; SEAWRIGHT, A.A.; MOORE, M.R. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 163-165, 1999.
- OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 114, n. 20, p. 7942-7944, 1992.
- ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; HENRIKSEN, P.; YASUMOTO, T. Confirmation of anatoxin-a(s) in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1645-1648, 1997.
- ORME-JOHNSON, W.H. Molecular basis of biological nitrogen fixation. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, Palo Alto, v. 14, p. 419-459, 1985.
- OSTERMAIER, V.; KURMAYER, R. Distribution and abundance of nontoxic mutant of cyanobacteria in lakes of the Alps. **Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 58, n. 2, p. 323-333, 2009.
- OTSUKA, S.; SUDA, S.; LI, R.; WATANABE, M.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 15-21, 1999.
- PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives of Hydrobiology**, New York, v. 107, p. 563-593, 1997.
- PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 281-288, 2008.
- PEDROSA, P.; CALASANS, C.V.C.; REZENDE, C.E. Particulate and dissolved phases as indicators of limnological and ecophysiological spatial variation in Cima Lake system, Brazil: a case study. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 411, p. 89-101, 1999.

PENG, Y.; LEUNG, H.C.M.; YIU, S.M.; CHIN, F.Y.L. IDBA: a practical iterative de Bruijn Graph De Novo Assembler. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE ON RESEARCH IN COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY (RECOMB 2010), 14., 2010, Lisboa. **Proceedings...** Lisboa: Springer, 2010. p. 426-440.

PEREIRA, A.A.; SANTANA, M.; TEIXEIRA, M. A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1505, n. 2/3, p. 185-208, 2001.

PÉREZ-BOCAL, V.; GIL, R.; RAMOS, S.; LAMELAS, A.; POSTIGO, M.; MICHENLENA, J.M.; SILVA, F.J.; MOYA, A.; LATORRE, A. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? **Science**, Washington, v. 314, n. 5797, p. 312-313, 2006.

PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J.D.; ROSE, D.J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.T.; LIM, A.; DIMALANTA, E.T.; POTAMOUSIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D.C.; WELCH, R.A.; BLATTNER, F.R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, London, v. 409, n. 6819, p. 529-533, 2001.

PHILMUS, B.; CHRISTIANSEN, G.; YOSHIDA, W.Y.; HEMSHEIDT, T.K. Post-translational modification in microviridin biosynthesis. **ChemBiochem**, Weinheim, v. 9, n. 18, p. 3066-3073, 2008.

POP, M.; SALZBERG, S.L.; SHUMWAY, M. Genome sequence assembly: algorithms and issues. **Computer**, Los Alamitos, v. 35, n. 7, p. 47-54, 2002.

PREUßEL, K.; WESSEL, G.; FASTNER, J.; CHORUS, I. Response of cylindrospermopsin production release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 645-650, 2009.

PREUßEL, K.; STÜKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTNER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 156-162, 2006.

RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R.; SETHUNATHAN, N. The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 40, n. 8, p. 699-821, 2010.

RAMASWAMY, A.V.; SORRELS, C.M.; GERWICK, W.H. Cloning and biochemical characterization of the hecotochlorin biosynthetic gene cluster from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, n. 12, p. 1977-1986, 2007.

RAMOS, R.T.J.; CERNEIRO, A.R.; BAUMBACH, J.; AZEVEDO, V.; SCHNEIDER, M.P.C. AND SILVA, A. Analysis of quality raw data of second generation sequencers with quality assessment software. **BMC Research Notes**, London, v. 4, p. 130, 2011.

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

RANTALA-YLINEN, A.; KÄNÄ, S.; WANG, H.; ROUHIAINEN, L.; WAHLSTEN, M.; RIZZI, E.; BERG, K.; GUGGER, M.; SIVONEN, K. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7271-7278, 2011.

RAPALA, J.; LAHTI, K.; RÄSÄNEN, L.A.; ESALA, A.L.; NIEMELÄ, S.I.; SIVONEN, K. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. **Water Research**, New York, v. 10, n. 10, p. 2627-2635, 2002.

RASMUSSEN, J.P.; CURSARO, M.; FROSCIO, S.M.; SAINT, C.P. An examination of the antibiotic effects of cylindrospermopsin on common gram-positive and gram-negative bacteria and the protozoan *Naegleria lovaniensis*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2008.

RIVASSEAU, C.; HENNION, M.C. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (Liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 399, n. 1/2, p. 75-87, 1999.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; NYREN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 242, n. 1, p. 84-89, 1996.

ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; URMANN, M.; SIVONEN, K. Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). **Chemistry & Biology**, London, v. 17, n. 3, p. 265-273, 2010.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 2, p. 686-692, 2004.

ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIAINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 156-167, 2000.

ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; TOOMING-KLUNDERUND, A.; JAKOBSEN, K.S. Comparison of cyanopeptolin genes in *Planktothrix*, *Microcystis* and *Anabaena* strains: evidence for independent evolution within each genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7322-7230, 2007.

ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; NEDERBRAGT, A.J.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 396, 2009.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 132, p. 365-386, 2000.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, GB, v. 49, n. 2, p. 219-225, 1995.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; GE, J.L.; LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 201, n. 1, p. 235-241, 1994.

RUNNEGAR, M.T.; XIE, C.; SNIDER, B.B.; WALLACE, G.A.; WEINREB, S.M.; KUHLENKAMP, J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicological Sciences**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 81-87, 2002.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M-A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

RUVKUN, G.B.; AUSUBEL, F.M. Interspecies homology of nitrogen fixation genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 1, p. 191-195, 1980.

SAKER, M.L.; GRIFFITHS, D.J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, Oldense, v. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.

SAKER, M.L.; THOMAS, A.D.; NORTON, J.H. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of north Queensland. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 179-182, 1999.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS, V.M.; NEILAN, B.A.; EAGLESHAM, G.K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 55, n. 2, p. 243-250, 2003.

SALZBERG, S.L.; DELCHER, A.L.; KASIF, S.; QHYTE, O. Microbial gene identification using interpolated Markov models. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, n. 2, p. 544-548, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academic Sciences of the USA**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, C.A.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage *phi* X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, n. 5596, p. 687-695, 1977.
- SANGOLKAR, L.N.; MASKE, S.S.; CHAKRABARTI, T. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. **Water Research**, Oxford, v. 40, n. 19, p. 3485-3496, 2006.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 71, p. 359-385, 2000.
- SANT'ANNA, C.L.; XAVIER, M.B.; SORMUS, L. Estudo qualitativo do fitoplâncton da represa de Serraria, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 83-102, 1988.
- SANT'ANNA, C.L.; MELCHER, S.S.; CARVALHO, M.C.; GELMEGO, M.C.P.; AZEVEDO, M.T.P. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoir, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2007.
- SASSO, S.; POHNERT, G.; LOHR, M.; MITTAG, M.; HERTWECK, C. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 761-785, 2011.
- SCHOPF, J.W. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 13-35.
- SCHUSTER, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 1, p. 16-18, 2008.
- SEAWRIGHT, A.A.; NOLAN, C.C.; SHAW, G.R.; CHRISWELL, R.K.; NORRIS, R.L.; MOORE, M.R.; SMITH, M. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 135-142, 1999.
- SEENAYYA, G.; SUBBA RAJU, N. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TAXONOMY AND BIOLOGY OF BLUE-GREEN ALGAE, 1., 1972, Madras. **Papers...** Madras: University of Madras, 1972. p. 52–57.
- SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESHAM, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 73–80, 2007.

SHAFIK, H.M. Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka) Seenaya et Subba Raju in laboratory cultures. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 54, p. 121–136, 2003.

SHALEV-ALON, G.; SUKENIK, A.; LIVNAH, O.; SCHWARZ, R.; KAPLAN, A. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 87–91, 2002.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.

SIGUIER, P.; PEROCHON, J.; LESTRADE, L.; MAHILLON, J.; CHANDLER, M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, p. 32–36, 2005.

SINGH, R.N. Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. **Hydrobiologia**, London, v. 20, n. 1, p. 87–91, 1962.

SINHÁ, R.; PEARSON, L.A.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; ORR, P.T.; NEILAN, B.A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? **Water Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 1408–1419, 2012.

SIVONEN, K.; SKULBERG, O.M.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, K.L. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1465–1471, 1992.

SOARES, M.C.S.; HUSZAR, V.L.M.; ROLAND, F.. Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (southeast Brazil). **River Research and Applications**, Chichester, v. 23, n. 7, p. 698–714, 2007.

SOARES, M.C.S.; ROCHA, M.I.A.; MARINHO, M.M.; AZEVEDO, S.M.F.O.; BRANCO, C.W.C.; HUSZAR, V.L.M. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 57, n. 2, p. 137–149, 2009.

SOUZA, R.C.R., CARVALHO, M.C.; TRUZZI, A.C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings Reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 13, n. 1, p. 73–81, 1998.

SPOOF, L.; BERG, K.A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTÖ, L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, n. 6, p. 552–560, 2006.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Reviews on Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225–274, 1977.

STUCKEN, K.; JOHN, U.; CEMBELLA, A.; MURILLO, A.A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; FRIEDEL, M.; PLOMINSKY, A.M.; VÁSQUEZ, M.; GLÖCKNER, G. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 2, e. 9235, 2010.

STÜKEN, A.; JAKOBSEN, K.S. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. **Microbiology**, Reading, v. 156, n. 8, p. 2438–2451, 2010.

SUMMONS, R.E.; JAHNKE, L.L.; HOPE, J.M.; LOGAN, G.A. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. **Nature**, London, v. 400, p. 554-557, 1999.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E.; WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 833–844, 1994.

THOMPSON, A.S.; RHODES, J.C.; PETTMAN, I. **Culture Collection of Algae and Protozoa**: catalogue of strains. Ambleside: Freshwater Biology Association; Natural Environmental Research Council, 1988. 22 p.

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

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

TOOMING-KLUNDERUD, A.; ROHRLACK, T.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. **Microbiology**, Readings, v. 153, n. pt5, p. 1382-1393, 2007.

TORGAN, L.C.; GARCIA, M. Novas ocorrências (Cyanophyta e Chlorophyta) para a ficoflora planctônica do Rio Grande do Sul. **Hoehnea**, São Paulo, v. 16, p. 57-64, 1989.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 97-112, 2003.

VALLADARES, A.; FLORES, E.; HERRERO, A. Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n.18, p. 6126–6133, 2008.

VARGAS, M.; KASHIFI, K.; BLUNT-HARRIS, E.L.; LOVLEY, D.R. Microbial evidence for Fe(III) reduction on early Earth. **Nature**, London, v. 395, n. 6697, p. 65-67, 1998.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J. SUTTON, G.G.; SMITH, H.L.T. YANDELL, M.; EVANS, C.A.; HOLT, R.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R.M.; HUSON, D.H.; WORTMAN, J.R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C.D.; ZHENG, X.H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P.D.; ZHANG, J.; MIKLOS, G.L.G.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A.G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V.A.; ZINDER, N.; LEVINE, A.J.; ROBERTS, R.J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HELPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; THREIDEH, J.A.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, K.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARM, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; FRANCESCO, V.D.; DUNN, P.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A.E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T.J.; HIGGINS, M.E.; JI, R.; KE, Z.; KETCHUM, K.A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G.V.; MILSHINA, N.; MOORE, H.M.; NAIK, A.K.; NARAYAN, V.A.; NEELMAN, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D.B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.Y.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.Y.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, O.; ZHENG, L.; ZHONG, W.; ZHU, S.C.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, F.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M.L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMSNN, A.; HERT, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTISH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESCHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N.N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZEVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J.F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M.J.; SJOLANDER, K.V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHAMIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANAJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENS, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; SABU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y.; OCYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.D.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; SLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAM, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZM J.; MA, D.;

MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, T.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, Washington, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.

VERMAAS, W.F.J. Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. In: NATURE PUBLISHING GROUP. **Encyclopedia of life sciences**. London: John Wiley, 2001. p. 245-251.

VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Easton, v. 29, n. 7, p. 2675-2706, 1997.

WANG, J.; SALATA, J.J., BENNETT, P.B. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. **Journal of General Physiology**, New York, v. 121, n. 6, p. 583-589, 2003.

WATANABE, M. Studies on planktonic blue-green algae. 5. A new species of *Cylindrospermopsis* (Nostocaceae) from Japan. **Bulletin of the National Science Museum**, Tokyo, v. 21, p. 45-48, 1995.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 530-563, 2006.

WELKER, M.; BICKEL, H.; FASTNER, J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin—opportunities and limits. **Water Research**, Oxford, v. 36, n. 18, p. 4659-4663, 2002.

WIEDNER, C.; RUCKER, J.; BRÜGGEMANN, R.; NIXDORF, B. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. **Oecologia**, Paris, v. 152, n. 3, p. 473- 484, 2007.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, n. 3, p. 201–218, 2005.

WINTER, JM; BEHNKEN, S.; HERTWECK, C. Genomics-inspired discovery of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 22-31, 2011.

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

WOLOSZYNSKA, J. Woloszynska, Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. **Bulletin International de l'Academie des Sciences de Cracovie**, Cracovie, v. 6, p. 649–709, 1912.

WOOD, S.A.; STIRLING, D.J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, Wellington, v. 37, n. 4, p. 821-828, 2003.

WOOD, S.A.; RASMUSSEN, J.P.; HOLLAND, P.T.; CAMPBELL, R.; CROWE, A.L.M. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatshenkoi* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, New York, v. 43, n. 2, p. 356-365, 2007.

YILMAZ, M.; PHILIPS, E.J. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2502-2507, 2011.

YLMAZ, M.; PHILIPS, E.J.; SZABO, N.J.; BADYLAK, S. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 130-139, 2008.

YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. **Comments on Toxicology**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 103-115, 2003.

ZAPOMELOVÁ, E.; JEZBEROVÁ, J.; HROUZEK, P.; HISEM, D.; REHÁKOVÁ, K.; KOMÁRKOVÁ, J. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1363-1373, 2009.

_____. Nomenclatural Note: Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, Oxford, US, v. 45, n. 2, p. 415, 2010.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, Woodbury, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008.

ZHANG, C.C.; LAURENT, S.; SARK, S.; PENG, L.; BÉDU, S. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 367-375, 2006.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; PHILIPPE, Q.; BOUCHIER, C.; HERTWECK, C.; MARSAC, N.T.; DITTMANN, E. Microcyclamide Biosynthesis in Two Strains of *Microcystis aeruginosa*: from Structure to Genes and Vice Versa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 6, p. 1791-1897, 2008.

ZUMFT, W.G. Regulation of nitrogenase activity in the anoxygenic phototrophic bacteria. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 551-557.

ANEXOS

ANEXO A - Composição dos meios de cultivo utilizados

Tabela 1 - Composição do meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)

	Solução estoque (g.L ⁻¹)		mL.L ⁻¹ meio	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	8,500	20,0	0,17
2	MgCl ₂ .6H ₂ O.....	2,050	20,0	4,1.10 ⁻²
	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	2,450		4,9.10 ⁻²
	CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,450		2,9.10 ⁻²
3	K ₂ HPO ₄	4,350	2,0	8,7.10 ⁻³
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	8,700		1,74.10 ⁻²
4	H ₃ BO ₃	12,40	0,1	1,24.10 ⁻³
	MnCl ₂ .4H ₂ O.....	6,950		6,95.10 ⁻⁴
	FeCl ₃ .6H ₂ O.....	5,400		5,4.10 ⁻⁴
	ZnCl ₂	1,675		1,675.10 ⁻⁴
	CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,095		9,5.10 ⁻⁶
	CuCl ₂	0,007		7,0.10 ⁻⁷
5	EDTA.Na ₂	9,300	0,4	9,3.10 ⁻⁴

* Na variação do meio sem nitrogênio não foi utilizada a solução estoque 1.

Tabela 1. Composição do meio Z8 (KOTAI, 1972).

	Solução estoque (g.L ⁻¹)		mL.L ⁻¹ meio	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	46,70	10	0,46
2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	5,9	10	5,9.10 ⁻²
	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	2,5		2,5.10 ⁻²
3	K ₂ HPO ₄	3,1	10	3,1.10 ⁻²
	Na ₂ CO ₃	2,1		2,1.10 ⁻²
4	Solução Fe: 2,80 g FeCl ₃ .6H ₂ O dissolvidos em 100 mL 0.1 N HCl		10	2,8.10 ⁻³
	Solução EDTA: 3,90 g EDTA-Na ₂ dissolvidos em 100 mL 0.1 N NaOH. 10 mL da solução Fe acrescidos de 9,5 mL da solução de EDTA são completados para 1000 mL de H ₂ O.			
	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O.....	0,330		3,3.10 ⁻³
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	0,880		8,8.10 ⁻³
	KBr.....	1,20		1,2.10 ⁻²
	KI.....	0,83		8,3.10 ⁻³
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	2,87	1	2,8.10 ⁻³
	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	1,55		1,5.10 ⁻³
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O.....	1,46		1,4.10 ⁻³
	CuSO ₄ .5H ₂ O.....	1,25		1,2.10 ⁻³
	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O...	1,98		1,9.10 ⁻³
	Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O.....	0,410		4,1.10 ⁻³
	V ₂ O ₅	0,0890		8,9.10 ⁻⁴
	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O.....	4,74		4,7.10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	3,10		3,1.10 ⁻³
	MnSO ₄ .H ₂ O.....	1,60		1,6.10 ⁻³

* Na variação do meio sem nitrogênio não foi utilizada a solução estoque 1 e a solução estoque 2 foi substituída por solução CaCl₂.H₂O para concentração final de 0,012 g.L⁻¹.

Tabela 3 - Composição do meio BG-11 (ALLEN, 1968)

	Solução estoque (g.L ⁻¹)		mL.L ⁻¹ meio	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	150,0	10,0	1,5
2	K ₂ HPO ₄	40,00	1,0	4,0.10 ⁻²
3	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	75,00	1,0	7,5.10 ⁻²
4	CaCl ₂ .2H ₂ O.....	36,00	1,0	3,6.10 ⁻²
5	Ácido cítrico.....	6,000	1,0	6,0.10 ⁻³
6	Citrato de amônio férrico	6,000	1,0	6,0.10 ⁻³
7	EDTA.Na ₂	1,000	1,0	1,0.10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	2,860		2,8.10 ⁻³
	MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1,810		8,1.10 ⁻³
	ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,220		2,2.10 ⁻³
8	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,390	1,0	3,9.10 ⁻³
	CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,079		7,9.10 ⁻⁵
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O.....	0,049		4,9.10 ⁻⁵

* Na variação do meio sem nitrogênio não foi utilizada a solução estoque 1.

Tabela 4 - Composição do meio Jaworski (THOMPSON; RHODES; PETTMAN, 1988)

	Solução estoque (g.L ⁻¹)		mL.L ⁻¹ meio	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	80,0	1,0	8.10 ⁻²
2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	20,0	1,0	2,0.10 ⁻²
3	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	12,4	1,0	1,2.10 ⁻²
4	NaHCO ₃	9,30	1,0	9,3.10 ⁻³
5	EDTA FeNa.....	2,25	1,0	2,25.10 ⁻³
	EDTA Na ₂	2,25		2,25.10 ⁻³
6	H ₃ BO ₃	0,50	1,0	2,5.10 ⁻³
	MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1,40		1,4.10 ⁻³
7	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	1,00	1,0	1,0.10 ⁻³
	Vitamina B ₁₂	0,05		5,0.10 ⁻⁵
	Vitamina B ₁	0,05		5,0.10 ⁻⁵
	Biotina.....	0,05		5,0.10 ⁻⁵
8	KH ₂ PO ₄	12,4	1,0	1,2.10 ⁻²
9	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	36,0	1,0	3,6.10 ⁻²

* Na variação do meio sem nitrogênio não foi utilizada a solução estoque 1 e a solução estoque 2 foi substituída por solução CaCl₂.H₂O para concentração final de 0,012 g.L⁻¹.