

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

RAFAEL BARTY DEXTRO

**Biossíntese de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias isoladas do
Pantanal brasileiro**

Piracicaba

2023

RAFAEL BARTY DEXTRO

**Biossíntese de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias isoladas do
Pantanal brasileiro**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Dextro, Rafael Barty

Biossíntese de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias isoladas do Pantanal brasileiro / Rafael Barty Dextro; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

109 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bioinformática 2. Bioquímica microbiana 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Cyanophyta 5. Ecologia microbiana 6. Enzimologia 7. Genética microbiana 8. Metabólitos secundários 9. Radiação ultravioleta I. Título

CDU (577.121 + 579.22) : (575.113 + 577.344)

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Agradecimentos

Minha jornada de amadurecimento e crescimento acadêmico foi enriquecida pelo conhecimento compartilhado com diversos colegas do grupo CYANOS. Agradeço à Renata, Ana e Simone por me guiarem em vários pontos essenciais da pesquisa, seja na melhor maneira de conduzir os experimentos ou como expressar meus achados eficientemente; ao Bruno e ao Andrews por toda a ajuda com as análises de bioinformática; ao Maurício por sua parceria em discussões metodológicas e filosóficas; ao Gabriel, Gladys, Anderson, Taiane, Thierry e Juliana por estarem presentes em momentos de descontração que também são importantes e a Carolinne, por me auxiliar de diversas formas no dia-a-dia, sendo uma delas no controle da ansiedade. Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha orientadora, Professora Doutora Marli de Fátima Fiore, por estar disponível tantas vezes para me atender, guiando minha jornada de doutorado para experiências incríveis. Obrigado por me ensinar os meandros necessários para o sucesso acadêmico e por muitas vezes embarcar em minhas ideias e ações que ultrapassavam as nossas obrigações como doutorando e orientadora de um projeto de pesquisa.

Agradeço imensamente à Universidade de São Paulo (USP), em especial ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (o CENA) por possibilitar o desenvolvimento de minha pesquisa e minha participação em tantas experiências incríveis durante o doutorado. Soma-se a isso as bolsas de doutorado advindas das agências de fomento federais CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que permitiram minha sobrevivência e conforto durante todo o doutorado.

Além de meu grupo de pesquisa, gostaria de agradecer ao Professor Ernani e a todos os colegas do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do CENA e de Ecotoxicologia da Faculdade de Farmácia da USP/Capital. Vanessa, Fernanda, Paloma, Rhuana, Jéssica, Larissa, Alex e os técnicos Admilson, Dagmar, Lilian, Ralf e Sandra, obrigado por me auxiliarem nas inúmeras visitas para diversas análises. Agradeço também ao grupo do Professor Antônio Figueira, em especial ao Bruno, Angélica, Felipe e Ricardo.

Em estudos que envolvem seres vivos, creio que também é importante ressaltar a importância do modelo biológico, cuja manipulação deve ser pautada nos princípios da Bioética. As múltiplas gerações de cianobactérias que foram cultivadas ao longo de meu doutorado permitiram minhas observações e contribuições para gerar conhecimento humano e por isso sou grato também a elas. Que possamos cada vez mais entender os organismos que coabitam a biosfera conosco para um futuro de maior equilíbrio.

Sou grato a toda a equipe da secretária de pós do CENA, composta pelo Marcos, Magali, Gilson e, em especial, a Cleide, por todo o apoio e aprendizado. Um agradecimento especial para a secretária Soninha e todo o apoio dos diretores do CENA (Professores Bendassolli e Ernani) aos eventos discentes que propus ao longo do doutorado. Aproveito para deixar meu muito obrigado a Silvana, Lia, Marília e demais funcionários do CENA que ao longo desses anos desenvolveram comigo relações de amizade e trabalho. Agradeço aos professores do CENA e ESALQ com os quais tive o privilégio de conviver, seja durante aulas, reuniões de comissões ou eventos. Agradeço aos demais colegas pós-graduandos que durante minha vivência no CENA construíram comigo diversos eventos através da APG, como o Webinar e o Simpósio Científicos do CENA e os projetos de extensão CENA na Praça, Feira USP de Profissões e CENA na Escola.

Na reta final de meu doutorado tive a oportunidade de passar um semestre na King's College em Londres, onde fui supervisionado pelo Prof. Paul F. Long. I would like to thanks Prof. Paul for all of his assistance and guidance, navigating my professional development and improving my academic writing skills. I am very grateful for this amazing experience abroad and to all the colleagues I met in London. Esta oportunidade única não teria sido possível sem o financiamento advindo da CAPES através de seu Programa Institucional de Internacionalização (PrInt), a quem eu sou extremamente grato.

Agradeço ainda à minha família e diversos amigos, em especial meus pais Vera e Osvaldo e minha prima Varinha, que me apoiam e me motivam através de seu amor. Na pós-graduação, por vezes esquecemos da importância de nutrir nossas relações pessoais fora do ambiente acadêmico. Contudo, isso é essencial para que nossa pesquisa seja desenvolvida da melhor maneira possível, com cuidado e atenção, aliada à uma vida feliz e com significado! Sou grato a Kamila, Bruno, Marielle, Jaqueline, Carol, Lisandra, Marcelle, aos meus sogros Rosine e Márcio, Carla, Carolina, Victor, Amanda e a todos os demais amigos que em algum momento destes quatro anos interagiram comigo e estiveram presentes, mesmo que fisicamente distantes.

Por fim, se por um lado o apoio técnico-científico é essencial para a conclusão de um projeto de doutorado, por outro, o apoio emocional para manutenção da saúde mental engloba tanto aspectos profissionais quanto pessoais, permitindo que tudo o que façamos, inclusive um projeto de doutorado, seja feito com dedicação e orgulho. E, por isso, meu maior agradecimento vai para meu marido Rafael Dantas Barbosa, que é meu parceiro de vida, sempre pronto a me ouvir diante das dificuldades cotidianas, me aconselhar e me amar, independente de meus tropeços e acertos.

“Eu não me envergonho de corrigir os meus erros e mudar de opinião,
porque não me envergonho de raciocinar e aprender”

Alexandre Herculano

RESUMO

DEXTRO, R. B. **Biossíntese de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias isoladas do Pantanal Brasileiro**. 2023. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

O filo Cyanobacteria integra um importante grupo de organismos fotossintéticos oxigênicos e fixadores de nitrogênio atmosférico dos ecossistemas aquáticos e terrestres. A captação de energia solar para fotossíntese pode expor as cianobactérias a doses letais de radiação ultravioleta (RUV) em seus habitats naturais. Esses organismos neutralizam o efeito prejudicial da RUV sintetizando metabólitos secundários, tais como os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) e o alcaloide indólico heterocíclico escitonemina. Essas substâncias são altamente foto-estáveis e atuam como potentes fotoprotetores e antioxidantes, portanto, podem ser explorados biotecnologicamente pela indústria cosmética, além de apresentarem atividades anti-inflamatórias e anticoagulantes. A dominância das cianobactérias em muitas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro é frequente, onde estão expostas a altos índices de RUV e, teoricamente, devem sintetizar potentes substâncias fotoprotetoras. Desta forma, este estudo teve como objetivo realizar análises de agrupamentos gênicos e da produção de substâncias fotoprotetoras de cianobactérias isoladas das lagoas salino-alcálicas da região do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Genes com a mesma função daqueles responsáveis pela síntese de MAAs e escitonemina foram encontrados nos genomas cianobacterianos das lagoas salino-alcálicas e de linhagens adicionais e as produções constitutiva e estimulada por 72h de UVA+B destas cianobactérias mantidas em cultivo foi estimada. Os resultados demonstram que as linhagens do Pantanal não utilizam a síntese dos MAAs avaliados como estratégia central de proteção UV em contraste às linhagens de outros habitats. A principal contribuição deste projeto foi para a avaliação ecológica das cianobactérias isoladas do Pantanal e o conhecimento de substâncias fotoprotetoras produzidas por algumas cianobactérias brasileiras que possuem potencial para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Ambientes extremos. Anotação gênica. Escitonemina. Micosporina. Radiação ultravioleta.

ABSTRACT

DEXTRO, R. B. **Biosynthesis of photoprotective metabolites in cyanobacteria isolated in the Brazilian Pantanal**. 2023. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

The Cyanobacteria Phylum includes an important group of photosynthetic and atmospheric nitrogen-fixing organisms from aquatic and terrestrial ecosystems. The absorption of solar energy for photosynthesis potentially exposes cyanobacteria to lethal doses of UV radiation in their natural habitats. These organisms neutralize the negative effects of UV radiation by synthesizing secondary metabolites, such as mycosporine-like amino acids (MAAs) and the heterocyclic indole alkaloid scytonemin. These substances are very photo-stable and act as potent photo-protectors and antioxidants, which allows them to be biotechnologically explored by the cosmetics industry, also presenting anti-inflammatory and anticoagulant activity. The dominance of cyanobacteria in many alkaline soda lakes of the Brazilian wetlands (Pantanal) is frequent, in which they are exposed to high levels of UV and must synthesize photo-protector substances to survive. In this context, this project aimed to find gene groups and estimate photo-protector molecule production from cyanobacteria isolated from the alkaline soda lakes of the wetlands in Nhecolândia (MS) and from additional strains. The genes responsible for MAAs and scytonemin production were located at the cyanobacterial genomes. Constitutive and UV-induced production of all these lineages kept under cultivation were estimated. Both constitutive and UV-induced productions showed that Pantanal strains do not use the evaluated MAAs as their main UV-protection strategy, in contrast to strains from other habitats. The main contribution of this work was the ecological evaluation of cyanobacteria isolated from Pantanal, also adding knowledge concerning photo-protector substances produced by some Brazilian cyanobacteria with potential for biotechnological applications.

Keywords: Extreme environment. Gene annotation. Micosporine. Scitonemin. Ultraviolet radiation.

SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão de Literatura.....	13
1.1. Objetivo	26
1.2. Objetivos específicos	26
1.3. Estrutura da Tese	27
2. Anotação gênica relacionada a escitonemina e MAAs	28
Resumo	28
2.1. Introdução específica	28
2.2. Materiais e Métodos.....	30
<i>Análise de agrupamentos gênicos envolvidos na produção de escitonemina em genomas de cianobactérias do Pantanal</i>	30
<i>Análise de agrupamentos gênicos envolvidos na produção de MAAs em cianobactérias dos biomas brasileiros</i>	31
<i>Anotação automática dos genomas</i>	33
<i>Curadoria e anotação manual dos genes de interesse</i>	33
<i>Relações filogenéticas</i>	34
2.3. Resultados	34
2.4. Discussão	39
3. Produção constitutiva de MAAs em cianobactérias brasileiras.....	45
Resumo	45
3.1. Introdução específica	45
3.2. Materiais e Métodos.....	47
3.3. Resultados	51
3.4. Discussão	53
4. Produção de MAAs estimulada por radiação UV	60
Resumo	60
4.1. Introdução específica	60
4.2. Materiais e Métodos.....	62
<i>Indução de substâncias fotoprotetoras com UV</i>	62
<i>Determinação da concentração de clorofila a e carotenoides com exposição UV</i>	65
<i>Rastreamento de outras micosporinas no espectro UV</i>	65
<i>Avaliação de motilidade estimulada por luz (fototropismo)</i>	66
4.3. Resultados	66
4.4. Discussão	70

5. Investigação da estrutura e função do gene <i>mysD</i> da via biossintética de MAAs em cianobactérias	76
Resumo	76
5.1. Introdução específica.....	76
5.2. Materiais e Métodos	78
<i>Filogenia do gene mysD</i>	78
<i>Estrutura terciária da enzima proveniente do gene mysD</i>	79
<i>Análise comparativa das enzimas provenientes dos genes mysD, murF e ddl</i>	79
5.3. Resultados	79
5.4. Discussão.....	85
Referências Gerais.....	90

1. Introdução e Revisão de Literatura

Genômica e a taxonomia de cianobactérias

As cianobactérias, microrganismos foto autotróficos, habitam o planeta Terra desde a era Paleoproterozóica há mais de $3,6 \pm 0,2$ bilhões de anos, contribuindo para a oxigenação da atmosfera (Garcia-Pichel et al., 2019). Graças ao seu metabolismo, as cianobactérias foram diretamente responsáveis pela formação da camada de ozônio, o que permitiu o florescimento das formas vida em um amplo espectro de complexidade. Além de seu interesse evolutivo, as cianobactérias atraem a atenção da comunidade científica devido à sua diversidade morfofisiológica, a qual as permite sobreviver e ocupar praticamente qualquer ecossistema terrestre e aquático, desde as tundras até os trópicos (Whitton; Potts, 2000).

Os fatores principais que movem a pesquisa científica e o interesse econômico ao redor das cianobactérias estão envolvidos com seu papel ecológico nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, seu valor agregado devido a síntese de produtos naturais ou a formação de florações em ambientes aquáticos. Contudo, seja qual for o motivo, o estudo de cianobactérias se beneficia de um agrupamento e classificação ordenados do grande volume de dados produzidos sobre estes microrganismos. Inicialmente, sua taxonomia era meramente baseada em morfologia utilizando regras pré-estabelecidas (Geitler, 1932; Desikachary, 1959; Bourrelly, 1970), mas com a observação de sua enorme diversidade morfológica e genética, ficou claro que seria necessário agregar mais informações aos sistemas de classificação para melhor organizar sua diversidade. Também é relevante citar que um grande número de linhagens permanece não cultivável nos atuais métodos de cultivo laboratorial devido tanto à procedimentos de isolamento ineficientes ou requerimentos biológicos específicos. Isto cria uma barreira para a descrição da diversidade e papéis funcionais das cianobactérias que talvez só possa ser superada com o uso das “ômicas” (metagenômica, proteômica e transcriptômica, que são as análises de genomas, proteínas e RNA de uma amostra em escala de comunidade) e o contínuo desenvolvimento de novos métodos de cultivo, como live-FISH, iChip e incubadores microbianos em microescala (Kilbane, 2002; Teeling; Glöckner, 2012; Lewis et al., 2021). Deste modo, os sequenciamentos gênicos unidos aos bancos de dados de acesso público podem auxiliar a organizar os diferentes gêneros e famílias cianobacterianos, otimizando sua classificação e contribuindo para os esforços de descrever sua biologia, diversidade, genética e evolução.

As cianobactérias, apesar de serem amplamente estudadas, representam uma pequena fração dos genomas bacterianos depositados no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), inferior a 1,5% do total (Dextro et al., 2021). Desde sua fundação em 1988, o NCBI abriga dezenas de milhares de genomas e sequências gênicas de organismos com acesso público e gratuito, contribuindo para o desenvolvimento da taxonomia baseada em parâmetros genéticos, que foi o fator decisivo para a reformulação da maneira como a árvore filogenética da vida é organizada e como os alvos biotecnológicos são procurados nos organismos (Komárek; Kastovsky, 2003; Moustafa et al., 2009; Wang et al., 2011; Mueller et al., 2013; Zhu et al., 2019). A contínua produção de informações também permite a busca por novas formas de organização taxonômica e de formação de bancos de dados, difundindo cada vez mais estudos que se utilizam de metadados.

A taxonomia de cianobactérias clássica, feita somente através da descrição morfológica das células de cada linhagem, se mostrou insuficiente para propriamente caracterizar os diferentes gêneros (Castenholz, 2015; Dvorak et al., 2015). A introdução da filogenética molecular feita por Woese et al. (1975) com o início das análises do RNA ribossomal 16S explorou a natureza conservativa deste marcador gênico através dos grupos cianobacterianos. Seu uso recente tem levado a uma reconstrução do filo Cyanobacteria, causando mudanças consideráveis nos níveis taxonômicos de família e ordem e revelando uma grande abundância de espécies crípticas (Komárek et al., 2014). Apesar das análises filogenéticas baseadas em RNA terem elucidado parte do agrupamento taxonômico destes microrganismos, elas ainda foram insuficientes para descrever as diferenças entre espécies cianobacterianas (Dvorak et al., 2015). Com o advento do sequenciamento de alto rendimento, a popularização das ferramentas de bioinformática e o uso de múltiplas proteínas de cópia simples, foi possível construir árvores filogenômicas que melhoraram a resolução taxonômica das cianobactérias quando comparado às abordagens que utilizavam somente o RNA ribossomal (Komárek et al., 2014).

Mais recentemente, com a melhoria das técnicas moleculares, a nova tendência tem sido o sequenciamento de *reads* longos visando a descrição completa dos genomas, contribuindo ainda mais com a classificação taxonômica (Paul et al., 2019). Ao invés de eliminar ou substituir as descrições morfológicas, ecológicas e fisiológicas, as informações moleculares constituem um dado complementar que fortalecem abordagens taxonômicas polifásicas (Komárek, 2016). Seu uso tem sido cada vez mais aceito na comunidade científica, permitindo a combinação dos dados de sequenciamento com critérios ecológicos e citomorfológicos. Deste modo, o sequenciamento do rRNA 16S se tornou a informação molecular mínima para a descrição de um táxon, sendo o passo inicial para a correta identificação taxonômica de uma espécie.

O uso universal de uma taxonomia baseada em dados genômicos permitiria que bancos de dados públicos como o NCBI evitassem problemas em nomenclatura e disseminassem suas informações de modo padronizado para aprimorar ainda mais os sistemas de classificação. Apesar de alguma resistência contrária ao uso de genomas e parâmetros genéticos para identificar gêneros e espécies de cianobactérias, deve-se destacar que os esforços mais recentes de classificação que utilizam este tipo de dado (como o GTDB, *Genome Taxonomy Database*) se baseiam no agrupamento das sequências através de similaridade com o genoma das espécies tipo, que são as espécies originalmente descritas pela primeira vez para cada gênero utilizando o método polifásico. Deste modo, ainda que os dados genéticos e moleculares se tornem relevantes e mais usuais, eles ainda estarão sendo usados juntamente aos dados de descrição ecológica e morfológica. Estas propostas de classificação que utilizam dados genômicos são apenas um exemplo de como o material genético dos organismos pode ser utilizado como uma ferramenta que favorece a organização taxonômica da diversidade microbiana.

Identificando agrupamentos gênicos e descrevendo moléculas provenientes de culturas cianobacterianas

Aliado à identificação da produção de substâncias de grande interesse biotecnológico, a maior disponibilidade de genomas tem facilitado a identificação e caracterização de agrupamentos gênicos de produtos naturais (Leikoski et al., 2010; Li et al., 2010; Donia; Schmidt, 2011; Kersten et al., 2011; Ziemert et al., 2012; Wang et al., 2015). Uma infinidade de agrupamentos gênicos codificadores de presumíveis substâncias biologicamente ativas tem se tornado disponível. As sequências genômicas de microrganismos têm permitido identificar genes precursores de produtos naturais conhecidos e também de novas substâncias. Estes estudos utilizam bancos de dados com sequências de genes envolvidos nas vias biossintéticas de moléculas já descritas, resultando em análogos de substâncias conhecidas, e algoritmos que detectam conjuntos de genes possivelmente codificantes de novas vias metabólicas secundárias, com produtos finais ainda desconhecidos. Essa abordagem genômica fornece informações do possível tipo de composto resultante de vias codificadoras em um agrupamento gênico biossintético e, em alguns casos, das predições estruturais dos produtos naturais gerados (Corre; Challis, 2009; Müller; Wink, 2014; Nett, 2014; Micallef et al., 2015).

A análise do extrato orgânico da *Anabaena variabilis* PCC 7937, por exemplo, mostrou a produção da substância shinorina. A bioinformática revelou que essa linhagem possuía um agrupamento gênico homólogo de uma 3-dehidroquinase sintase (DHQS) e uma O-metiltransferase (OMT), propostos de estar envolvidos na biossíntese de MAAs. Análises

desta mesma cianobactéria encontraram outro DHQS supostamente relacionado com a biossíntese de chiquimato, mas não na montagem de MAAs (Singh et al., 2010). A mineração de mais genomas para homólogos de DHQS e OMT revelou que, quando presentes, eles estavam frequentemente no mesmo locus e que muitas cianobactérias tem o potencial genético para a biossíntese de MAAs.

Em cianobactérias, policetídeo sintases, peptídeo sintetases não ribossômicas, ou moléculas híbridas destes dois tipos são mais comumente encontradas e são geralmente passíveis de deduções com base em métodos de bioinformática (Micallef et al., 2015). Na abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massa, as deduções podem ser feitas sobre o número de substâncias e classes de substâncias presentes no extrato de um produto natural. Além disso, combinando a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), juntamente com o padrão isotópico molecular e análises de fragmentação baseada em MS-MS, é possível obter informações estruturais de substâncias desconhecidas. Por conseguinte, combinando genômica e metabolômica torna-se possível correlacionar substâncias específicas com agrupamentos gênicos, descobrindo e isolando novos produtos naturais (Kersten et al., 2011; Medema et al., 2014).

Metodologias que conjugam as estruturas de metabólitos secundários (quimiotipo) e o agrupamento gênico codificante (genótipo) têm levado ao desenvolvimento de minerações genômicas guiadas por espectrometria de massas (MS) (Kersten et al., 2011). A detecção de toxinas e outros metabólitos secundários de cianobactérias é um amplo campo de estudo que obteve grande desenvolvimento graças à aplicação de MS (Msagati et al., 2006; Lawton; Edwards, 2008; Dörr et al., 2011; Kaushik; Balasubramanian, 2013; Rambla-Alegre et al., 2017). Apesar da existência de alguns compostos voláteis, como geosmina e terpenos, diversos metabólitos secundários de cianobactérias são não voláteis, relativamente hidrofílicos e ionizáveis, o que confere sucesso a métodos de análise como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A LC-MS combina as funcionalidades da separação física da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com a capacidade de analisar massas da espectrometria de massas (MS). Esta ferramenta física caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga (m/z) de espécies ionizadas. Uma vez que a espectrometria de massas mede a relação entre massa/carga, um espectrômetro de massas consiste em uma fonte de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual separa os íons formados, um detector desses íons e um sistema de aquisição dos dados gerados (Rambla-Alegre et al., 2017).

Enquanto a cromatografia líquida separa misturas com componentes múltiplos, a espectrometria de massas fornece a identidade estrutural dos componentes individuais, com alta especificidade molecular e sensibilidade de detecção. Esta técnica permite analisar substâncias bioquímicas de origens complexas (e.g. metabólitos de cianobactérias) (Stobiecki et al., 2006; Dass, 2007). Vários espectrômetros de massas com diversas combinações de fontes e analisadores são comercializados atualmente, entretanto as fontes de ionização FAB (*fast atom bombardment*), MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) e ESI (*electrospray ionization*) têm sido as mais comumente aplicadas às análises de toxinas e outras moléculas cianobacterianas (Rambla-Alegre et al., 2017).

A metabolômica baseada em espectrometria de massas (MS) tem se tornado a técnica preferida para detecção rápida e desreplcação de metabólitos secundários em culturas microbianas. Estas podem ser analisadas diretamente sem a necessidade de purificação/isolamento e grandes conjuntos de dados podem ser processados de uma só vez. A MS em tandem molecular (MS/MS) evoluiu nos últimos 5 anos para ajudar com êxito a prospecção de coleções químicas de produtos naturais, identificação de substâncias e priorização de linhagens microbianas para isolamento de metabólitos e sequenciamento de genoma (Wang et al., 2016). Resumidamente, a rede molecular baseada em MS é uma abordagem que organiza dados MS/MS com base na similaridade espectral. Como um determinado espectro é característico de uma determinada estrutura química, é possível organizar substâncias conhecidas e desconhecidas baseando-se na sua similaridade estrutural. Portanto, redes moleculares baseadas em MS são uma ferramenta poderosa para a desreplcação de amostras químicas complexas, como produtos naturais (Yang et al., 2013). Além disso, esta técnica é compatível com o *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), um banco de dados de acesso aberto para organização e compartilhamento de dados espectrais MS/MS brutos, processados ou identificados (Wang et al., 2018). Desta forma, a combinação de redes moleculares e do GNPS pode reforçar a identificação de classes e compostos químicos específicos e auxiliar a priorização de amostras para investigações adicionais (Larson et al., 2017).

Efeitos da radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (RUV) é provavelmente o fator abiótico que mais influenciou a evolução e a ecologia da biosfera (Banaszak; Lesser, 2009). Sob as condições anteriores à ocorrência de vida na Terra, a exposição direta a radiação solar (em todas as suas frações, UVA, UVB e UVC) teria rapidamente causado danos ao DNA e a consequente morte dos organismos

expostos. O enriquecimento gradual de O₂ da atmosfera pelas cianobactérias, o provável primeiro grupo de organismos a realizar a fotossíntese oxigênica, propiciou o desenvolvimento de novas formas de vida, autotróficas e heterotróficas, mas foi somente depois da foto-oxidação atmosférica de O₂ em ozônio, fato que criou um eficiente escudo antirradiação, que a vida terrestre foi possível. Atualmente, a camada fotoprotetora de ozônio tem se exaurido devido a poluentes, deixando “buracos” acima das grandes zonas tropicais, as quais estão sob risco progressivo de superexposição a ondas curtas prejudiciais de radiação UVB (Lubin; Jensen, 1995).

A radiação solar consiste principalmente em radiação ultravioleta-B (parcialmente absorvida pelo ozônio) altamente energética (UVB; 280-315 nm), que pode ser letal para a maioria dos organismos expostos continuamente ao sol, desde procariotos até eucariotos (Sinha et al., 2007; Häder; Gao, 2015). Seus efeitos, como queimaduras nas áreas expostas, estão associados a absorção direta de radiação por biomoléculas, sendo que indiretamente o UVB causa a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A radiação UVA (315-400 nm), que chega à Terra em quase sua totalidade (99%), possui efeitos indiretos via transferência de energia e está mais associada ao envelhecimento precoce. Já a radiação UVC (100-280 nm) é totalmente absorvida pelo oxigênio e o ozônio da atmosfera.

Os organismos dependentes da luz não podem evitar a exposição à RUV; assim, as cianobactérias sempre enfrentaram altos índices de radiação em seu delicado equilíbrio entre excesso e falta de exposição à luz suficiente para a fotossíntese. Pode-se dizer que este fator abiótico agiu como pressão evolutiva levando à seleção de mecanismos de proteção contra esta radiação (Sinha; Häder, 2008). Para neutralizar o efeito prejudicial da RUV, as cianobactérias sintetizam metabólitos secundários, como os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) e a escitonemina, que servem como fotoprotetores naturais (Richa et al., 2011). A escitonemina tem sido encontrada somente em cianobactérias, mas os MAAs são produzidos também por microalgas e macroalgas, leveduras, fungos, corais e outras formas de vida marinha (Llewellyn; Airs, 2010).

Produção de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias

Os membros pertencentes ao filo Cyanobacteria são as únicas bactérias conhecidas por realizar a fotossíntese oxigênica e, mesmo expostos a doses letais de RUV, elas desenvolveram vários mecanismos de defesa para atenuar, proteger ou reparar os efeitos prejudiciais da radiação (Figura 1). Especificamente os metabólitos secundários fotoprotetores têm sido explorados biotecnológica e comercialmente de várias maneiras. Considerando a ampla

distribuição das cianobactérias nos ambientes tropicais e subtropicais do Brasil, inclusive nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal onde alguns gêneros formam florações quase que intermitentes (Andreote et al., 2018), e a falta de estudos sobre a genética e produção dessas substâncias fotoprotetoras por cianobactérias brasileiras, torna-se importante a identificação e classificação dessas substâncias visando uma futura aplicação biotecnológica na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia.

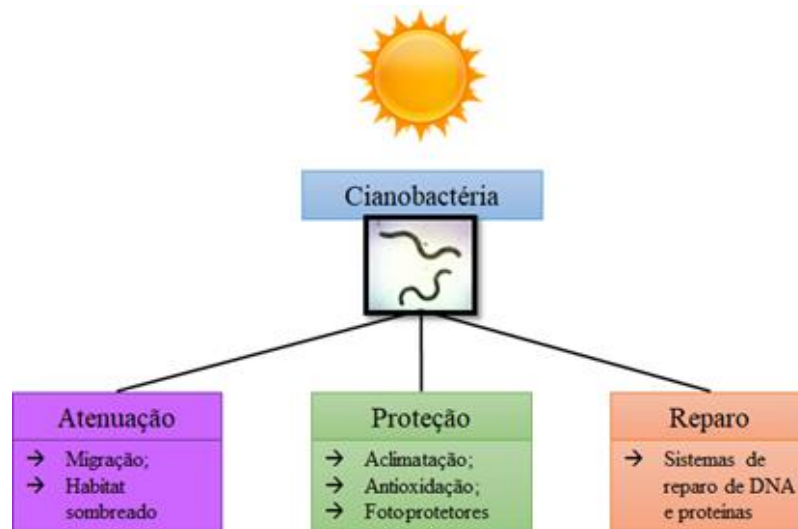


Figura 1. Estratégias utilizadas pelas cianobactérias para lidar com os efeitos prejudiciais da radiação UV solar (adaptado de Derikvand et al., 2016).

Aminoácidos do tipo micospolina (MAAs) em cianobactérias

Os MAAs são um grupo de mais de 20 metabólitos hidrossolúveis, absorventes de UV, que fornecem proteção contra fótons altamente energéticos nos comprimentos de onda de radiações UVA nocivas e UVB de ondas curtas (Schmid et al., 2003). A forte proteção é devida aos seus coeficientes de extinção molar extremamente altos (ϵ) ($\epsilon = 28100\text{--}50000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Wada et al., 2013). Os MAAs são encontrados no citoplasma e bainha externa de cianobactérias, onde atuam como filtros para prevenir danos induzidos por UV (Llewellyn; Airs, 2010; Carreto; Carignan, 2011; Wada et al., 2015), também sendo moléculas incolores de baixo peso molecular (<400 Da) com absorção máxima que varia entre 310–362 nm e que contêm um anel ciclohexanona central ou ciclohexenimina que é responsável pela absorção do UV (Nakamura et al., 1982).

A biossíntese de shinorina, um dos MAAs mais explorados, foi elucidada em cianobactérias em 2010 (Balskus; Walsh, 2010; Singh et al., 2010). Em *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (sinônimo de PCC 7937), o agrupamento gênico da biossíntese de shinorina consiste de quatro genes: *ava_3855* a *ava_3858* (Figura 2A). Nessa via do ácido chiquímico, o primeiro passo na biossíntese de shinorina é a conversão do 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP) a 3-dihidroquinato (DHQ) por uma DHQ sintase (DHQS, gene *Ava_3858*) (Figura 2B). Em seguida, o DHQ é convertido em 4-desoxigadusol (4DG) por uma *O*-metiltransferase (*O*-MT) (gene *Ava_3857*). A glicosilação de 4DG é catalisada por uma ligase ATP-grasp (gene *Ava_3856*), resultando na produção de micoporina-glicina. A anexação de serina a micoporina-glicina por um peptídeo não ribossômico sintetase (NRPS) (gene *Ava_3855*) resulta no produto final shinorina.

Uma rota alternativa de produção de 4DG foi descoberta na cianobactéria *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (sinônimo de PCC73102) e envolve a via da pentose fosfato (Balskus; Walsh, 2010). A biossíntese é semelhante ao do precursor DAHP da via do ácido chiquímico e envolve genes homólogos (*NpR5598* a *NpR5600*, Figura 2A). Nessa via o precursor é o sedoheptulose-7-fosfato (SH7P) que é convertido a 2-*epi*-5-*epi*-valiolone (EVS) por uma EVS sintase (EEVS, *NpR5600*) (Figura 2B). Em seguida, o EVS é convertido a 4-desoxigadusol (4DG) por uma *O*-metiltransferase (*O*-MT) (gene *NpR5599*). A glicosilação de 4DG é catalisada por uma ATP-grasp (gene *NpR5598*), resultando na produção de micoporina-glicina. A anexação de serina a micoporina-glicina e consequente produção da shinorina nesta via é feita pela ligase D-Ala-D-Ala (gene *NpR5597*) e não por uma NRPS.

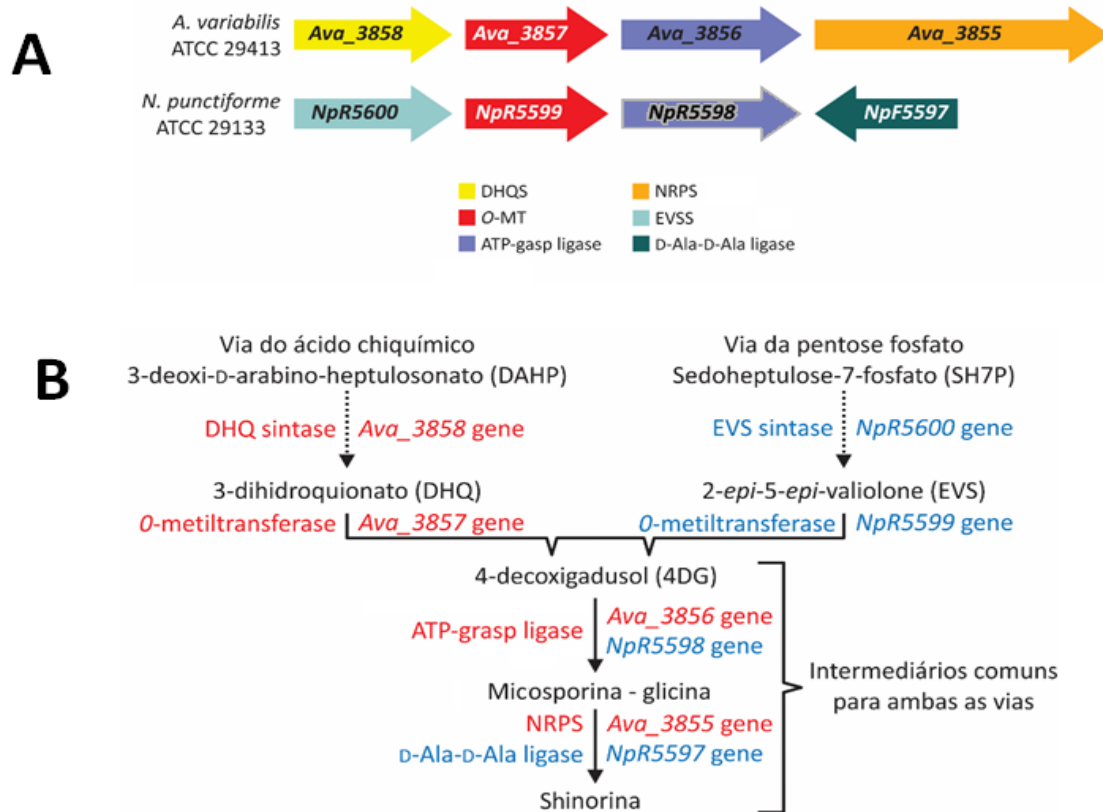


Figura 2. Diagrama esquemático da via biossintética de shinorina em cianobactérias. (A) Agrupamentos gênicos biossintéticos da shinorina nos genomas da *Anabaena variabilis* ATCC 29413 e *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. (B) Síntese dos intermediários da via do ácido chiquímico (*A. variabilis* ATCC 29413) e da pentose fosfato (*N. punctiforme* ATCC 29133). Enzimas e genes (em itálico) envolvidos no processo são mencionados nas laterais das setas para ambas as vias.

Esses metabólitos secundários têm sido explorados de várias maneiras. Os MAAs com alta propriedade de absorção de radiação podem ser usados como protetores UV e ativadores de proliferação celular em cosméticos e produtos de higiene (Conde et al., 2000; Whitehead; Hedges, 2005; Torres et al., 2006). Alguns deles têm potencial para proteger as células de fibroblastos da morte celular e o envelhecimento da pele humana quando estes processos são induzidos pela radiação UV (Schmid et al., 2004; Oyamada et al., 2008). Estudos mostraram que os MAAs têm atividade antioxidante e mantêm este sistema de defesa da pele ativo, bem como a expressão de proteínas de estresse tipo Hsp70 (De la Coba et al., 2007a; 2007b; 2009). Análogos de MAAs, como os produtos de tetraidopiridina, têm uso comercial como agentes de proteção solar (Chalmers et al., 1990; Bird et al., 1991; De la Coba et al., 2007b). Além disso, dois produtos comerciais de filtros solares (Helioguard 365® e Helionori®) contendo extrato de MAAs (shinorina e porphyra-334) da alga vermelha *Porphyra umbilicalis* já estão no mercado (Lawrence, 2017). Os MAA também podem ser utilizados como aditivos foto estabilizantes em plásticos, tintas e vernizes (Bandaranayake, 1998).

Escitonemina em cianobactérias

Outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas cianobactérias é a síntese e o acúmulo da substância escitonemina, a qual tem uma absorção máxima a 380 nm e é encontrada na bainha de polissacarídeo extracelular de cianobactérias, servindo como proteção contra a RUV solar de curto comprimento de onda. Esse pigmento lipossolúvel é uma pequena molécula dimérica (544 Da) exclusiva entre os produtos naturais, sendo composto por subunidades indólicas e fenólicas ligadas por um átomo de carbono olefínico (Figura 3). Devido ao seu grande coeficiente de extinção ($\epsilon = 250 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 384 nm), a escitonemina é considerada uma substância fotoprotetora altamente eficiente (Wada et al., 2013). Existem duas formas de escitonemina com base nas condições redox e ácido-base durante o processo de extração: uma forma oxidada (Figura 3A) chamada fuscochlorina e uma forma reduzida (Figura 3B), conhecida como fuscorodina.

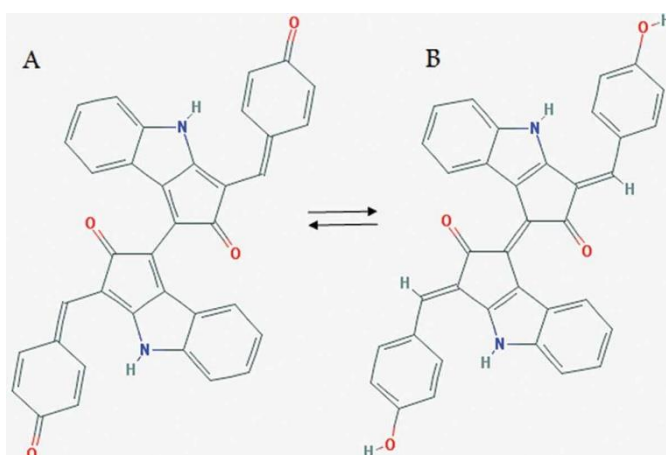


Figura 3. Estrutura química da escitonemina. (A) forma oxidada e (B) forma reduzida (adaptado de Derikvand et al., 2016).

A escitonemina é sintetizada a partir de metabólitos da biossíntese de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) (Figura 4A). Os mecanismos específicos da indução de escitonemina não são claros, mas múltiplos sinais ambientais atuam para determinar o nível desse pigmento em várias espécies cianobacterianas (Rastogi et al., 2015). O tratamento de células cianobacterianas com UVA induz eficientemente a síntese de escitonemina, enquanto a luz azul, verde ou vermelha não tem efeito significativo (Garcia-Pichel; Castenholz, 1991). Outros fatores de estresse também podem afetar a síntese desse alcalóide em cianobactérias. Em *Chroococcidiopsis* sp., o aumento da temperatura e das condições foto-oxidativas em conjunto com a exposição a UVA provocam um aumento sinérgico na taxa de produção de escitonemina, enquanto o aumento da concentração de sal inibi sua síntese (Dillon et al., 2002).

Em contraste, outro estudo mostrou que a salinidade induziu a produção de escitonemina em *Lyngbya aestuarii* (Rath et al., 2012). O estudo dos efeitos da fonte de nitrogênio (N_2 , NO_3^- ou NH_4^+) na síntese de escitonemina em *Nostoc punctiforme*, mostrou que esta espécie de cianobactéria sintetizou de três a sete vezes mais escitonemina enquanto fixava N_2 atmosférico através de seus heterócitos do que quando utilizava nitrato ou amônio (Fleming; Castenholz, 2008).

O agrupamento gênico biossintético putativo de escitonemina contendo 18 quadros abertos de leitura (ORFs: NpR1259 – NpR1276) foi primeiramente descrito na *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Figura 4B, Soule et al., 2007). Genes ortólogos associados a escitonemina da linhagem ATCC 29133 foram encontrados nos genomas sequenciados de *Anabaena* PCC 7120, *Lyngbya* PCC 8106, *Nodularia spumigena* CCY 9414 e nas linhagens de *Cyanothece* sp. PCC 7822 e PCC 7424 (Sorrels et al., 2009; Soule et al., 2009a). Os níveis de transcrição de todos os 18 genes foram aumentados após 48 horas de exposição a UVA e todos foram transcritos em conjunto como parte de uma única unidade de transcrição (Soule et al., 2009b). Uma vez que a escitonemina tenha alcançado quantidades suficientes na camada da bainha extracelular para bloquear a entrada de UVA, a expressão gênica retorna aos níveis mínimos e a síntese é interrompida (Sorrels et al., 2009; Soule et al., 2009b). Um estudo de expressão heteróloga da escitonemina produziu a fração monomérica desta molécula a partir de triptofano e tirosina em *Escherichia coli* e mostrou que apenas três enzimas foram necessárias para sua produção *in vivo* (Malla; Sommer, 2014). O mecanismo preciso da biossíntese de escitonemina ainda é ambíguo, mas sua biossíntese em cianobactérias parece ser um processo altamente conservado (Rastogi et al., 2015). Uma via biossintética proposta pressupõe que as enzimas *scyA*, *B* e *C* catalisam a síntese de monômeros de escitonemina, enquanto *scyC*, *D* e *F* catalisam a dimerização das subunidades (Figura 4B, Wada et al., 2013).

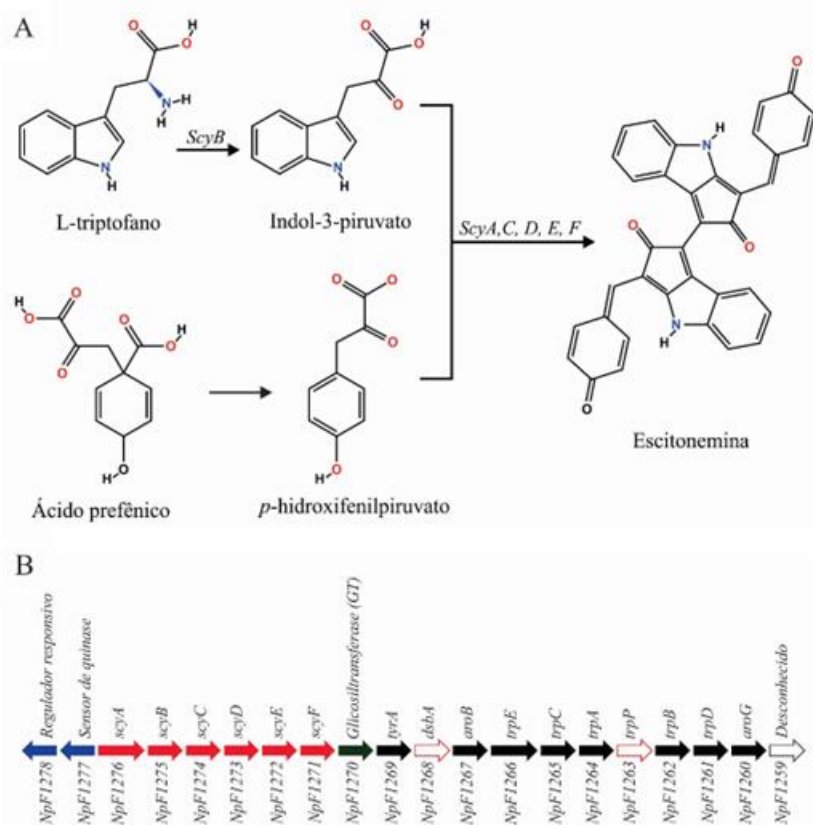


Figura 4. Diagrama esquemático da via biossintética de escitonemina em cianobactérias. (A) Proposta da via biossintética de escitonemina (Wada et al., 2013). (B) Agrupamento gênico biossintético putativo de escitonemina no genoma da *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (adaptado de Soule et al., 2009). As setas representam genes e sua orientação transcripcional. Genes reguladores (setas preenchidas azuis); genes biossintéticos estruturais do núcleo (setas preenchidas vermelhas); genes biossintéticos centrais antecipados para o passo de dimerização final (setas abertas vermelhas); glicosiltransferase (seta preenchida verde); genes biossintéticos de aminoácidos aromáticos (setas preenchidas pretas); função desconhecida (seta aberta preta).

A escitonemina, como um produto natural, poderia ser estabilizada e isolada para uso em filtros solares e cosméticos, visto que ela foi refinada por centenas de milhões de anos em processos biológicos de adaptação e seleção que a tornam eficiente na absorção da radiação ultravioleta (Gao; Garcia-Pichel, 2011a). O papel biológico da escitonemina como um protetor solar tem gerado grande interesse entre os dermatologistas para seu uso na proteção da pele (Karlsson, 2011; Siezen, 2011). Soma-se a isso relatos do potencial da escitonemina como uma droga anti-inflamatória e anti-proliferativa, inibindo seletivamente quinases, a proliferação de fibroblastos e de células endoteliais (Stevenson et al., 2002a; 2002b) e tumorais (McInnes et al., 2005; Zhang et al., 2007; Duan et al., 2010). A escitonemina também tem potencial anticancerígeno indutor de apoptose (Eble et al., 2004), inibindo a quinase 1 do tipo Polo (“*polo-like kinase 1*”, PLK1), agindo de maneira dependente da concentração (Stevenson et al.,

2002b; Zhang et al., 2013). Por fim, a escitonemina também mostrou ter atividade antioxidante (Takamatsu et al., 2003; Ninomiya et al., 2011; Matsui et al., 2012) e ser um forte antagonista de cálcio (Helms et al., 1988).

Potencial biotecnológico nas lagoas salinas do Pantanal

Com relação aos microrganismos de interesse deste estudo, destaca-se que as primeiras publicações sobre as cianobactérias na região do Pantanal foram em levantamentos florísticos realizados no século passado por pesquisadores estrangeiros (Borge, 1925; Drouet, 1938). Passados mais de 50 anos, vários trabalhos sobre a distribuição espacial e/ou temporal do fitoplâncton no Pantanal foram publicados contendo alguns táxons de cianobactérias (DeLamonica-Freire; Heckman, 1996; Oliveira; Calheiros, 2000; Domitrovic, 2002, Malone et al., 2007). Entretanto, somente anos mais tarde houve trabalhos publicados com as descrições mais detalhadas ou ilustrações focadas nos táxons cianobacterianos encontrados no Pantanal (Santos; Sant'Anna, 2010; Malone et al., 2012).

A abordagem molecular para classificação utilizando o gene de 16S rRNA amplificados por PCR a partir de DNA extraído de cianobactérias isoladas do Pantanal foi aplicada pela primeira vez em 2014 (Andreote et al., 2014), sendo também usada em outros trabalhos posteriores (Vaz et al., 2015; Genuário et al., 2017; Santos et al., 2018). Um estudo usando o sequenciamento massivo do 16S rRNA de amostras de água coletadas nas lagoas do Pantanal foi publicado em 2016 (Costa et al., 2016), seguido de outro de metagenômica das lagoas salino-alcálicas do Pantanal da Nhecolândia (Andreote et al., 2018).

A predominância de florações dos gêneros de *Anabaenopsis* e *Arthrospira* nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal tem sido relatada tanto nos estudos de levantamentos florísticos (Santos; Sant'Anna, 2010; Malone et al., 2012) como nos estudos moleculares independentes de cultivo (Costa et al., 2016; Andreote et al., 2018). Em muitas dessas lagoas, devido às condições ambientais extremas, não existem plantas em seu interior ou periferia (Costa; Telmer, 2006). Assim, a importância relativa de outros organismos fotoautotróficos, como as cianobactérias, é ampliada, principalmente com relação aos processos de sequestro de carbono e sustentação da cadeia alimentar microbiana. Um estudo realizado com uma linhagem de *Anabaenopsis elenkinii* isolada de uma lagoa salino-alcálica do Pantanal comprovou que as maiores taxas de crescimento ocorrem em pH 10,5, e que em valores menores de pH (9,5 e 7,0) esta espécie apresenta crescimento limitado tanto em termos de densidade como em biomassa (Santos et al., 2011). O isolado de *Arthrospira*, no entanto, mostrou as maiores taxas de crescimento em pH 9,5, mas com maior disponibilidade de nitrogênio (Santos, 2013).

A caracterização morfológica e filogenética de alguns isolados de *Anabaenopsis elenkinii* das lagoas do pantanal foi recentemente relatada contribuindo para a melhor descrição deste gênero (Santos et al., 2018; Delbaje et al., 2021).

Este projeto de pesquisa está inserido dentro do projeto temático “Mudanças Climáticas e Impactos Ambientais em áreas alagadas (Wetlands) do Pantanal (Brasil): quantificação, fatores de controle e previsão em longo prazo” (FAPESP 2016/14227-5) como uma vertente de análise de potencial biotecnológico das cianobactérias das lagoas salinas do Pantanal. Por ocorrerem em um ambiente exposto a elevados índices de radiação UV, teoriza-se que as linhagens do Pantanal apresentarão os genes envolvidos na síntese de MAAs e que provavelmente sintetizem estes metabolitos como parte de suas estratégias de proteção contra danos relacionados a radiação solar.

1.1. Objetivo

Este estudo visa avaliar a capacidade de produção de substâncias fotoprotetoras por cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálicas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Além da produção constitutiva e aquela estimulada por UV, serão identificados os genes funcionais envolvidos na biossíntese desses metabólitos secundários.

1.2. Objetivos específicos

- I.** Acessar, por meio de ferramentas de bioinformática, a presença de genes envolvidos na produção de MAAs e escitoneminas nos genomas cianobacterianos do Pantanal;
- II.** Identificar e quantificar a produção constitutiva de MAAs selecionados nos cultivos cianobacterianos por cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massas;
- III.** Promover a indução da produção de MAAs utilizando radiação ultravioleta (UV);
- IV.** Avaliar o gene *mysD* e sua enzima em relação a síntese de MAAs provenientes de espécies cianobacterianas que possuem o agrupamento gênico *mys* organizado em seus genomas.

1.3. Estrutura da Tese

Esta tese de doutorado foi organizada com a introdução e revisão bibliográfica geral, que contempla as grandes áreas do tema de trabalho, seguida de quatro capítulos fundamentados nas experimentações que buscaram atender a cada um dos objetivos específicos, facilitando assim sua compreensão e detalhamento.

2. Anotação gênica relacionada a escitonemina e MAAs

Resumo

O uso de ferramentas de bioinformática para a busca de genes biossintéticos de interesse em genomas sequenciados tem se popularizado nas últimas décadas. Moléculas específicas e bem descritas, tais como a escitonemina e os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs), podem ser anotadas diretamente nos genomas utilizando-se bibliotecas de sequências conhecidas. As cianobactérias brasileiras, expostas ao clima tropical e a grande incidência de radiação solar, têm grandes chances de possuir estes genes em seus genomas. A anotação automática de cada genoma foi feita através dos programas *Blast* e *Prokka*, seguida de uma anotação manual no *software Artemis*. Adicionalmente, exploraram-se as relações filogenéticas de um gene central da via da escitonemina (*scyA*) através do programa *Phylogeny.fr* e as semelhanças evolutivas das linhagens estudadas com uma análise filogenômica realizada com o GTDB-tk. A maior parte dos agrupamentos funcionais necessários para a síntese de escitonemina e MAAs foram encontrados e descritos como agrupados de forma contínua (*cluster*) ou não. As relações filogenéticas apontam para uma possível explicação evolutiva dos padrões gênicos encontrados.

2.1. Introdução específica

A produção de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAS) e escitonemina em cianobactérias tem sido cada vez mais vinculada a presença de arranjos gênicos específicos que induzem a produção destes compostos (Gao; Garcia-Pichel, 2011a; Hu et al., 2015; Katoch et al., 2016; Geraldles; Pinto, 2021). A organização destes genes pode ocorrer de diversas formas nos genomas cianobacterianos, mas evidências descritas para outros compostos, como a bacteriocina (Wang et al., 2011) e os próprios MAAs (Geraldles et al., 2020) apontam para a hipótese de que uma maior organização e proximidade dos genes envolvidos na biossíntese de produtos naturais resulta em maiores produções constitutivas e também induzidas por fatores de estresse.

Outra vertente de estudo na literatura aponta para a relação entre a síntese de compostos fotoprotetores e o habitat de origem das linhagens. Isto poderia ser não somente determinante para a história evolutiva dos arranjos gênicos como também induzir uma expressão diferencial dos genes codificadores das enzimas envolvidas, estimulados por fatores ambientais (Huang et al., 2016). Os biomas brasileiros representam uma porção considerável da diversidade global de microrganismos, induzindo metabolismos celulares que podem levar a produção de compostos biologicamente ativos de interesse biotecnológico (Thajuddin; Subramanian, 2005).

Cianobactérias de ecossistemas dominados por cobertura florestal, como a Mata Atlântica e a Amazônia, estão expostas a condições ambientais muito distintas daquelas que habitam corpos d'água altamente expostos a radiação, como as lagoas salino-alcálicas do Pantanal e os reservatórios continentais de água doce presentes em todo o território brasileiro. Se por um lado florestas mantêm a umidade local através de elevadas taxas de evapotranspiração, elas também criam um efeito de sombreamento sobre os riachos e as superfícies em que cianobactérias colonizam abaixo das copas das árvores (Malhi et al., 2002). Em contraste, partes do Pantanal, do Cerrado, da Caatinga, em lagos e reservatórios sem cobertura vegetal, a exposição à radiação solar é direta, acelerando o processo de quebra da matéria orgânica dissolvida e causando a formação de espécies reativas de oxigênio (Häder; Gao, 2015). Devido à localização geográfica, no Pantanal, por exemplo, são registrados índices de radiação ultravioleta (RUV) que variam de elevados no inverno (6 a 8) à extremamente elevados (acima de 11) durante o solstício de verão (Côrrea, 2015).

A busca por genes envolvidos com substâncias de interesse médico e econômico em microrganismos vem se tornando uma prática cada vez mais difundida em virtude das ferramentas de bioinformática que permitem acessar estes dados (Huang et al., 2007). Programas de anotação automática permitem a descrição de informações taxonômicas e funcionais de sequências-alvo a partir de bancos de dados. Contudo, é relevante realizar a curadoria manual das predições, a fim de confirmar a presença de genes em um organismo específico (Winnenburg et al., 2008). Embora consuma tempo, esta etapa pode corrigir erros provenientes dos programas automáticos. Assim, este capítulo explorou por meio de ferramentas de bioinformática a presença de genes envolvidos na produção de escitonemina nos genomas cianobacterianos do Pantanal e de MAAs em linhagens isoladas de diversos locais do Brasil a fim de estabelecer relações entre o arranjo gênico, habitat e suas afinidades taxonômicas. Portanto, a hipótese a ser testada é de que cianobactérias como as do Pantanal, intensamente expostas à radiação solar em seus habitats de origem, possuem o arcabouço gênico relacionado aos MAAs e escitonemina de modo organizado em seus genomas, o que otimizará a síntese destes compostos utilizados em foto proteção.

2.2. Materiais e Métodos

Análise de agrupamentos gênicos envolvidos na produção de escitonemina em genomas de cianobactérias do Pantanal

Para as anotações envolvendo a escitonemina, foram usadas apenas as linhagens de cianobactérias isoladas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal (*Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Pantanalinema rosanae* CENA516, *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Arthrospira platensis* CENA597 e *Arthrospira platensis* CENA650). Seus genomas, sequenciados pelo Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CYANOS) do CENA/USP, foram utilizados na anotação dos genes putativos envolvidos na produção de escitonemina, sendo eles *TyrA*, *TrpA*, *TrpB*, *TrpC*, *TrpD*, *TrpE*, *AroB*, *AroG*, a família *scy* (A, B, C, D, E e F), *DsbA* e genes envolvidos com a codificação de glicosiltransferases, hidrolases, fosfatases e PP-transferases (Soule et al., 2007; Sorrels et al., 2009; Wada et al., 2013).

A fim de explorar a relação dos genes encontrados nas linhagens do Pantanal com outras cianobactérias descritas como produtoras de escitonemina, realizou-se a filogenia do gene *scyA* a partir das sequências de aminoácidos dos genes descritos como codificadores da acetolactase sintase dependente de difosfato de tiamina, enzima responsável pela junção das moléculas índole-3-piruvato (I3P) e *p*-hidroxifenil piruvato (HPP), formando um β -cetoácido precursor do monômero de escitonemina (Gao; Garcia-Pichel, 2011a; Siezen, 2011; Pathak et al., 2017). Este gene foi escolhido por estar envolvido com a formação de um composto essencial desta via biossintética.

Para a filogenia do gene *scyA*, as sequências com maior identidade (>70%) e cobertura (>85%) advindas do *BLAST* 2.8.1+ (Boratyn et al., 2013) da linhagem *Chlorogloeopsis* sp. CGS089 (Soule et al., 2009b) foram agrupadas e organizadas filogeneticamente na plataforma online *Phylogeny.fr* (Dereeper et al., 2008; 2010). O alinhamento foi feito através do *MUSCLE* (Edgar, 2004), a curadoria utilizou o *Gblocks* (Castresana, 2000), a montagem da filogenia foi feita através do *PhyML* (Guindon; Gascuel, 2003; Anisimova; Gascuel, 2006) e a renderização da árvore foi realizada através do *TreeDyn* (Chevenet et al., 2006).

Análise de agrupamentos gênicos envolvidos na produção de MAAs em cianobactérias dos biomas brasileiros

Os genomas de 24 cianobactérias utilizados nas avaliações dos arranjos gênicos envolvidos com aminoácidos do tipo micosporina foram selecionados de modo a representar os biomas nacionais (Figura 5). *Alkalinema* sp. CACIAM70d, *Limnothrix rosea* CACIAM69d, *Nostoc piscinale* CENA21 e *Amazonocrinis nigriterrae* CENA67 são linhagens isoladas de amostras de solo e água da Amazônia. *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650, *Pannus brasiliensis* CCIBt3594 e *Pantanalinema rosanae* CENA516 foram amostradas em diferentes lagoas salino-alcálicas do Pantanal. Coletadas em um lago de água doce e de água salobra de criadouros de camarões, respectivamente, *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303 e *Nodularia spumigena* CENA596 representam o bioma Pampa na região sul do Brasil. O bioma com maior representação foi a Mata Atlântica, com *Brasilonema bromaliae* SPC951, as linhagens de *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 e UFV-OR1, *Brasilonema sennae* CENA114 e *Brasilonema* sp. UFV-L1, isoladas em sua maioria da superfície foliar de diversas plantas. Ainda neste bioma, *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 e *Microcystis aeruginosa* SPC777 foram isoladas de amostras de água da represa Billings (SP) e a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 foi coletada no mangue da ilha do Cardoso. *Fischerella* sp. CENA161 foi isolada em uma amostra de água do Cerrado e a única amostra da Caatinga foi *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, proveniente do reservatório Tapacurá em Pernambuco. Por fim, *Aliterella atlantica* CENA595 foi a única linhagem de uma amostra não continental, coletada no oceano Atlântico na costa do Brasil.

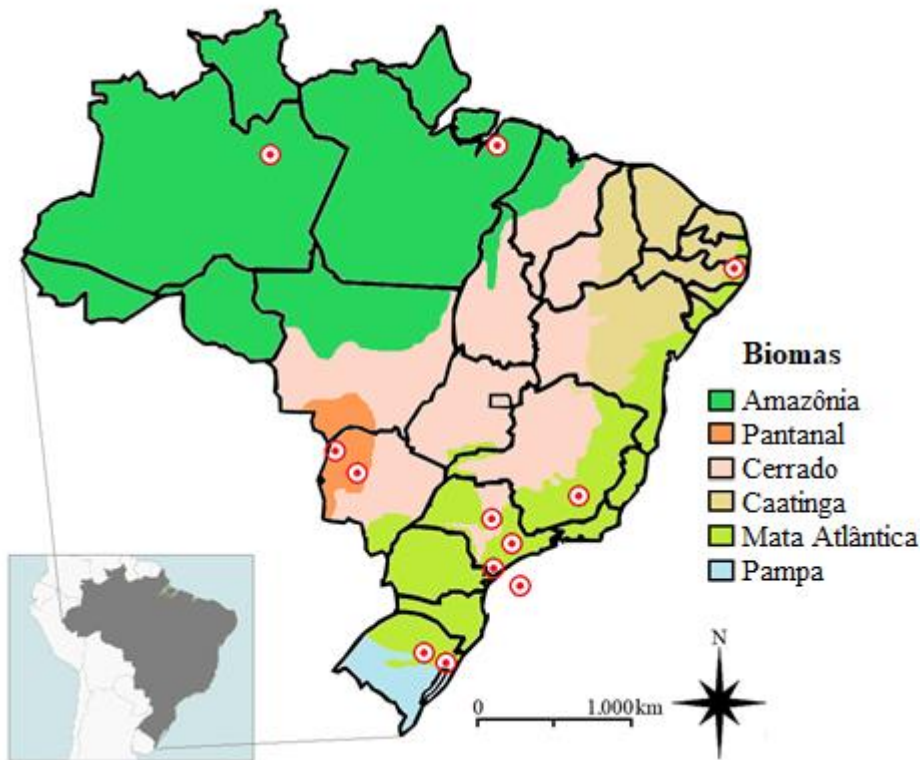


Figura 5. Mapa *pop-out* do Brasil na América do Sul, com cores realçando cada bioma e pontos vermelhos mostrando a localização original de isolamento de cada linhagem cianobacteriana.

Dezesseis dos genomas investigados foram provenientes de bancos de dados públicos, sendo os oito genomas restantes montagens ainda sendo aprimoradas pelo grupo CYANOS, do laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP. Os agrupamentos gênicos envolvidos na produção dos MAAs foram comparados entre biomas. Segundo resultados preliminares, os genes envolvidos na síntese especificamente de MAAs podem ocorrer agrupados de forma sequencial (em sintenia) e colinearmente (na mesma direção) no genoma (em *cluster* num mesmo loci). O arranjo de genes descrito como *mysABCD*, que engloba quatro genes putativos (codificando para as enzimas essenciais da biossíntese de MAAs, descritos na Figura 2B) e sequências gênicas homólogas não agrupadas foram os alvos usados para identificação. Por fim, avaliou-se o tamanho médio (em pares de base) dos genes relacionados aos MAAs encontrados nas linhagens brasileiras, determinando pontos fora da média e os maiores e menores valores através do cálculo da distância interquartil (McGill et al., 1978).

Anotação automática dos genomas

Todos os genomas utilizados neste projeto foram anotados de maneira automática através dos programas *Prokka* (Seemann 2014) e *BLAST* 2.8.1+, que identificam os trechos codificadores do genoma como genes putativos, predizendo seus produtos de transcrição. Esta anotação foi feita utilizando-se um roteiro *bash* específico (Garrels, 2010). Como exemplo, o modelo de roteiro usado na anotação de *Nostoc piscinale* CENA21 é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Roteiro utilizado para a anotação automática dos genomas

Comandos do roteiro	Significado
<code>#!/bin/bash</code>	Shebang = identifica o arquivo como um roteiro bash
<code>#\$ -q all.q</code> <code>#\$ -V</code> <code>#\$ -cwd</code> <code>#\$ -pe smp 4</code>	Solicitações de recursos são identificadas por <code>#\$</code> . <code>-q all.q</code> = reconhece a localização na qual o trabalho será realizado; <code>-V</code> e <code>-cwd</code> = permite que os arquivos criados sejam armazenados no mesmo local do roteiro; <code>-pe smp 4</code> = aloca e reserva, neste caso, 4 núcleos do módulo computacional usado para o roteiro
<code>module load prokka/1.13</code>	Carrega o programa Prokka no servidor
<code>module load blast/2.8.1+</code>	Carrega o programa Blast no servidor
<code>cd /Storage/data1/rafael.dextro/Genomes/</code>	Identificação do caminho no qual o arquivo contendo o genoma está localizado
<code>prokka --outdir prokka_cena21 --locustag NZ --genus Nostoc --species piscinale --strain CENA21 --Kingdom Bacteria --cpus 4 CENA21.fasta</code>	Comandos específicos utilizados pelo <i>Prokka</i> para criar o arquivo de resultados (<code>--outdir</code>), com identificadores detalhados escolhidos pelo usuário, indicando quantos núcleos serão usados para completar o trabalho (<code>--cpus</code>), sendo o mesmo valor indicado no início do roteiro (<code>-pe smp</code>).

Curadoria e anotação manual dos genes de interesse

Uma biblioteca com sequências de nucleotídeos referentes aos genes descritos na literatura como envolvidos na síntese de MAAs e escitonemina (Sorrels et al., 2009; Singh et al., 2010; Balskus; Walsh, 2010; Hu et al., 2015; Katoch et al., 2016) foi criada com sequências extraídas do banco de dados GenBank, filtrando cópias que possuísem identidade superior a 70% com os genes já conhecidos destas vias de síntese. Baseado nos resultados da anotação automática, um novo *BLAST* da biblioteca criada com os genomas permitiu localizar a posição

de cada gene putativo utilizando o programa *Artemis* (Carver et al., 2012). Por fim, os produtos de síntese preditos foram avaliados através do banco de dados de famílias e domínios proteicos PFAM (El-Gebali et al., 2019), sendo comparados aos genes que foram usados na própria biblioteca de busca. Nesta etapa, mesmo os genes com baixa identidade em relação a biblioteca (inferior a 70%) foram considerados a partir de seus motifs funcionais, ou seja, baseados em seu potencial de gerar enzimas da mesma família proteica que aquelas descritas na literatura como envolvidas com a produção de micosporinas.

Relações filogenéticas

Somado à anotação dos genes, uma árvore filogenômica de máxima verossimilhança foi feita utilizando o programa GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2019) e o iTOL para árvores filogenéticas *online* (Letunic; Bork, 2007). Estes programas agrupam os genomas de acordo com domínios proteicos específicos baseados em 120 marcadores bacterianos. Cada genoma é alocado para um domínio de acordo com a maior proporção de identidade com cada marcador, concatenado em alinhamentos de sequências únicas. A classificação taxonômica é feita através de uma combinação entre o posicionamento referência do GTDB, a divergência evolutiva relativa (DER ou RED do inglês) e a identidade média de nucleotídeos (IMN ou ANI do inglês) comparadas a linhagens modelo. Para guiar o posicionamento das linhagens brasileiras em ordens cianobacterianas conhecidas, foram utilizadas dezenas de genomas de espécies de cianobactérias depositados publicamente, incluindo algumas das quais foram utilizadas para a montagem da biblioteca de genes relacionados à síntese de MAAs.

2.3. Resultados

Os genes com motifs relacionados às mesmas funções dos genes de síntese da escitonemina foram localizados nos genomas das cianobactérias do Pantanal (Figura 6). Nenhuma das linhagens apresentou os genes organizados de maneira contínua, nem mesmo os genes principais *scyA*, *scyB*, *scyC* e *scyF*. Os genes *scyD* e *E*, encontrados em 5 das 6 linhagens, foram anotados como um *tandem* fusionado.

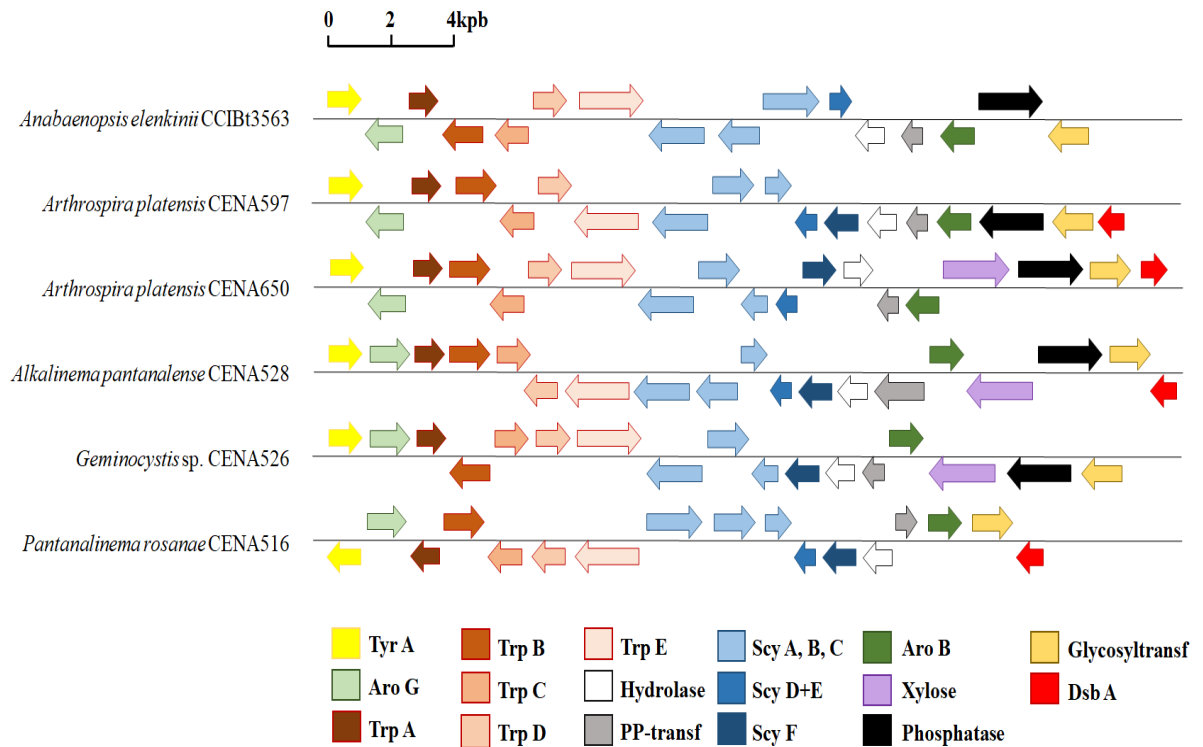


Figura 6. Anotação dos genes relacionados à síntese de escitonemina, com cores relacionando as sequências gênicas e as enzimas hipoteticamente sintetizadas por elas. A escala (em kpb) permite mensurar o tamanho médio de cada gene, que estão dispostos de acordo com sua orientação 5'→3'.

A filogenia do gene *scyA* (Figura 7) indica que as cópias deste gene encontradas nas linhagens do Pantanal formam um clado distinto com ancestralidade comum que difere de todas as demais linhagens utilizadas na análise, cuja similaridade máxima foi 70%.

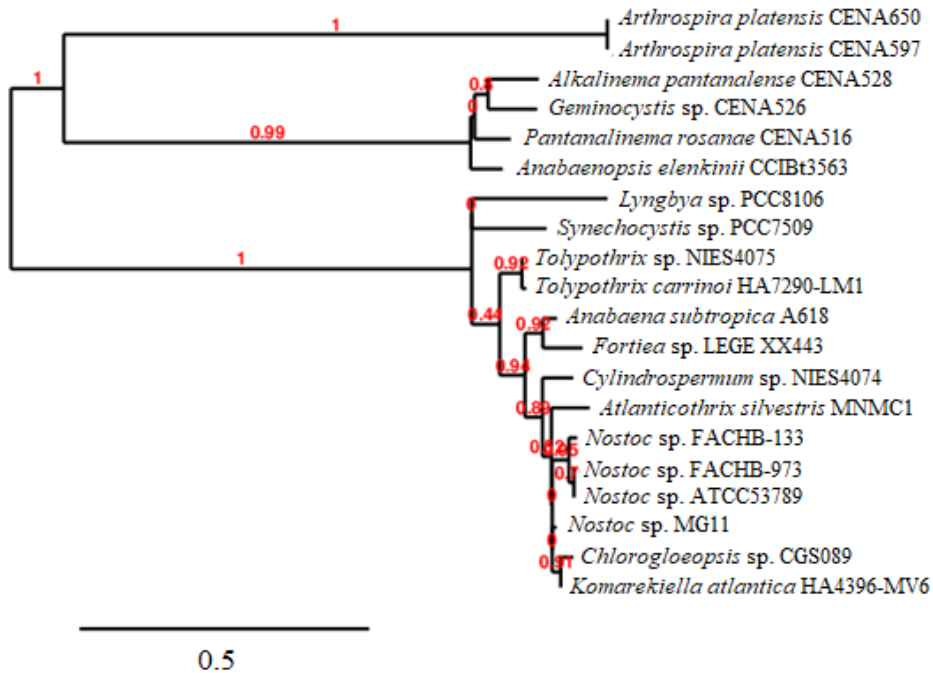


Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene *scyA* mostrando a relação entre as linhagens do Pantanal e as cianobactérias provenientes do NCBI com homólogos deste gene.

Em relação aos aminoácidos do tipo micoporinas (MAAs), os genes alvo descritos como envolvidos em sua produção foram localizados nos genomas e, através da anotação manual, tiveram seus arranjos gênicos descritos (Figura 8). Nota-se que a organização destes genes putativos é muito variada dentre as diferentes linhagens, podendo ser encontrado em agrupamentos (*clusters*) parciais ou integrais ou com cada gene disperso no genoma e distantes (com milhares de pares de base entre si). O elemento NRPS não foi encontrado em todas as linhagens e, em alguns agrupamentos, ele substituiu o gene *mysD* (D-Ala-D-Ala ligase) como quarto componente. Em algumas linhagens foram identificadas duplicações gênicas e em outras a ausência dos genes, que podem demonstrar o efeito de eventos gênicos aleatórios de rearranjo ou refletir fragmentos perdidos no sequenciamento ou montagem dos genomas.

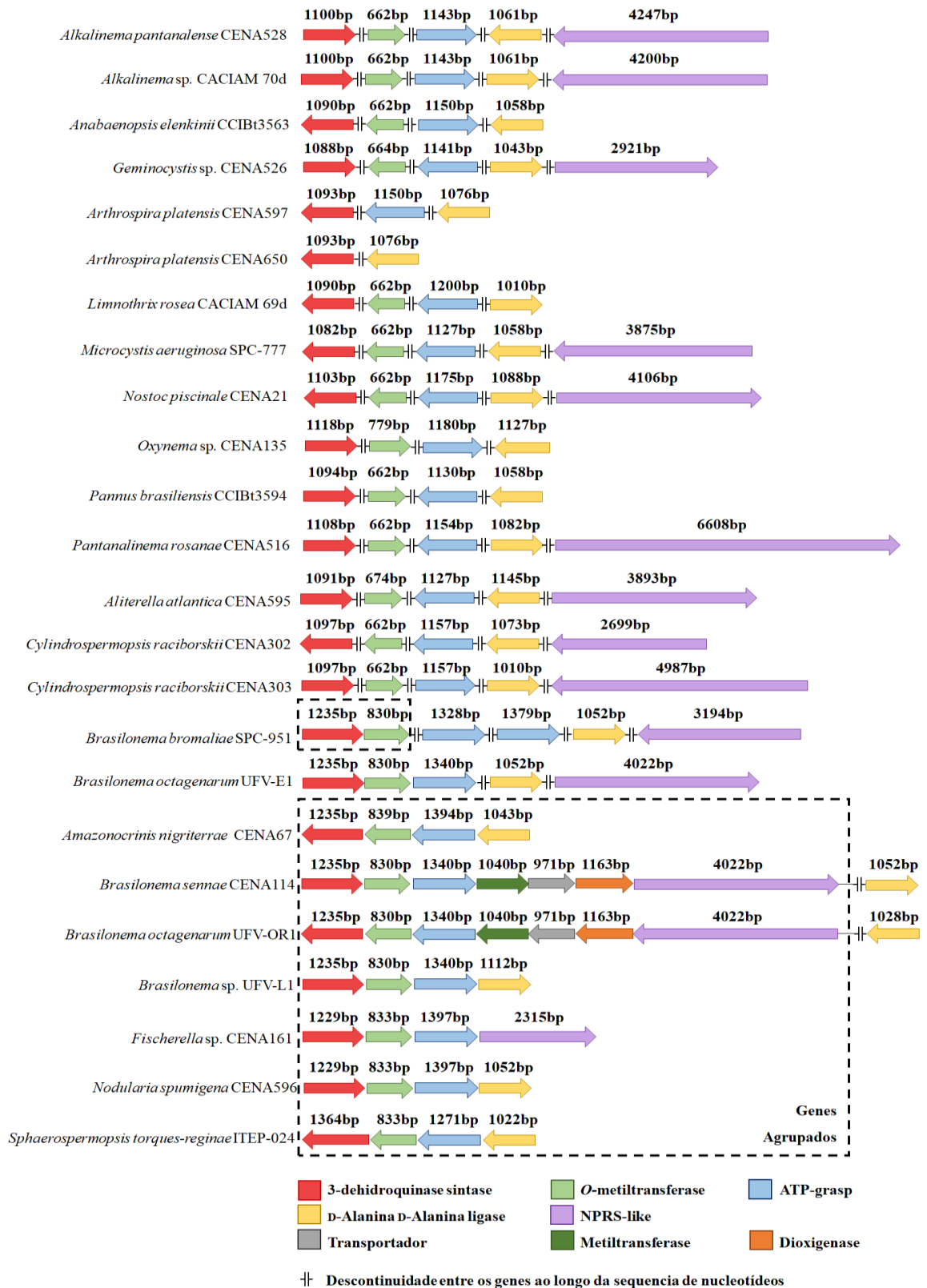


Figura 8. Anotação dos genes relacionados à síntese de aminoácidos do tipo microsporina, com cores relacionando as sequências gênicas e as enzimas hipoteticamente sintetizadas por elas. Quadro pontilhado indica os genes agrupados sequencialmente nos genomas e as linhas verticais pareadas indicam a presença de fragmentos separando os genes. O tamanho de cada gene putativo é indicado acima das setas (em bp), dispostas de acordo com sua orientação 5'→3'.

O tamanho médio de cada gene foi similar dentre as linhagens avaliadas, com exceção do gene codificador do NRPS (Figura 9). O gene *mysB* (*O*-metiltransferase) foi o menor dentre todos, enquanto o NRPS foi o maior, sendo a cópia encontrada em *Pantanalinema rosanae* CENA516, com 6608 pb, muito maior que a média de 4022 pb estimada de acordo com os demais NRPSs. Isto porque, nesta cópia, foi identificada uma duplicação da porção de condensação do gene. A menor variação foi observada no gene que transcreve a D-Alanina ligase, variando apenas cerca de 100 pb entre os valores máximo e mínimo.

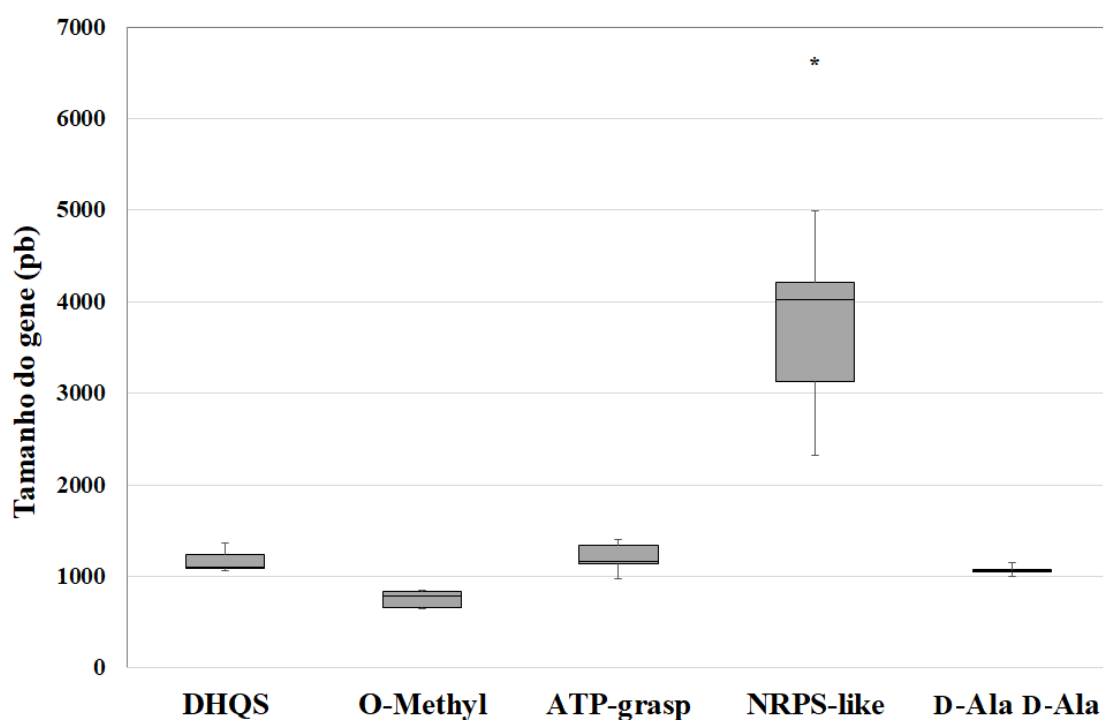


Figura 9. Box plot do tamanho médio de cada gene (em pares de base) das linhagens de cianobactérias avaliadas. O (*) representa valores fora dos quartis (*outliers*).

A árvore filogenômica montada para avaliar as relações evolutivas das linhagens organizou cada cianobactéria de acordo com a similaridade dos marcadores usados (Figura 10). O agrupamento dos genes relacionados a MAAs em *cluster* foi identificado apenas em linhagens pertencentes a ordem Nostocales e Chroococcales. O clado formado por todos os genomas do gênero *Brasilonema* juntamente com a *Fischerella* sp. CENA161 pode estar relacionado a ancestralidade comum da herança do agrupamento destes genes em sequência.

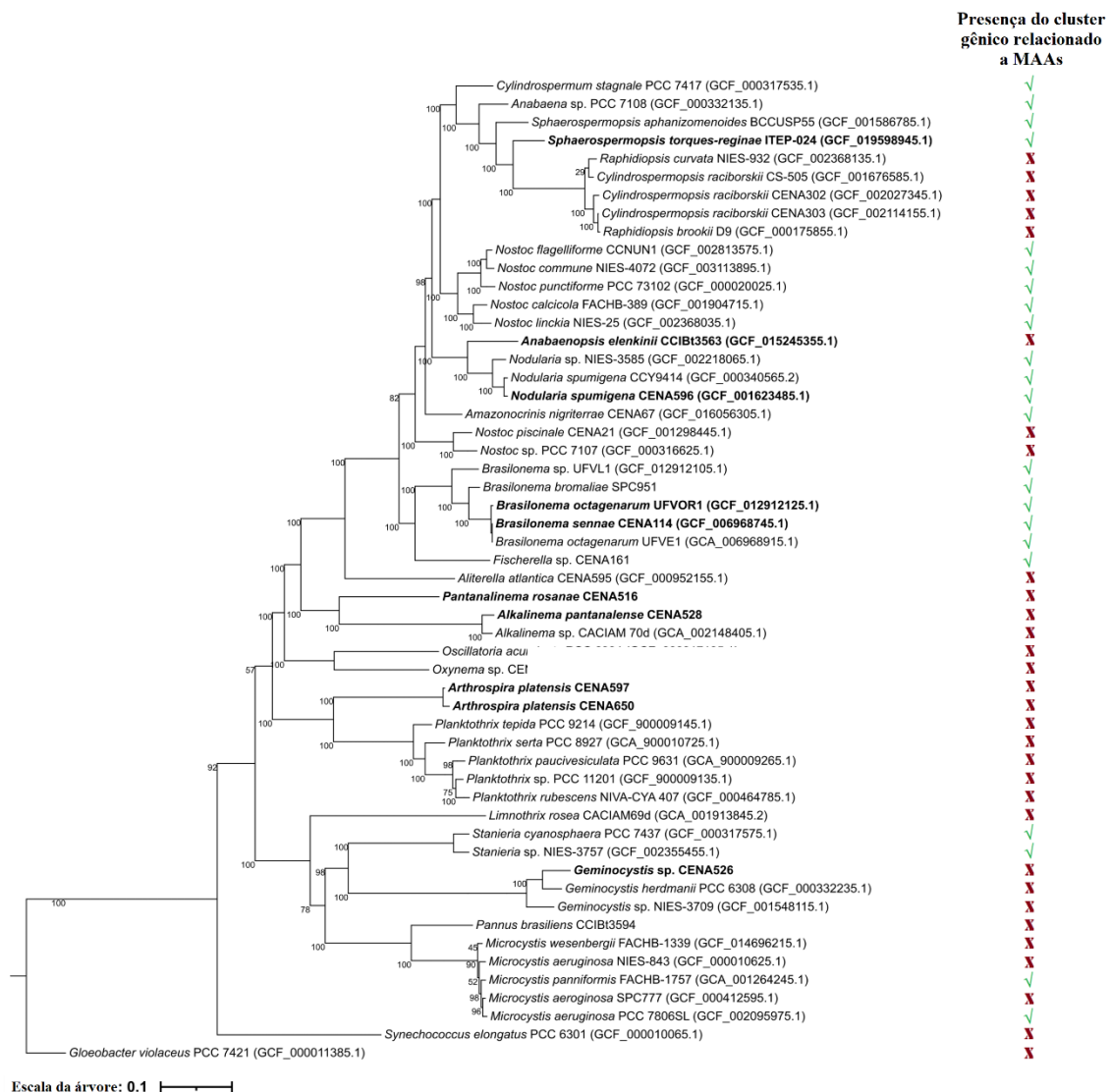


Figura 10. Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em 120 marcadores proteicos bacterianos conservados e de cópia única mostrando a relação evolutiva entre os genomas das linhagens utilizadas (em negrito) com as cianobactérias provenientes do NCBI.

2.4. Discussão

Embora diversos genes relacionados a produção de escitonemina tenham sido encontrados nas linhagens do Pantanal, eles não estavam agrupados em conjunto, como os clusters descritos em *Nodularia spumigena* CCY9414, *Cyanosphaera* sp. PCC7424, *Lyngbya* sp. PCC8106, *Nostoc* sp. PCC7120 (Sorrels et al., 2009) e *Chlorogloeopsis* sp. O89-Cgs (Garcia-Pichel et al., 1992). A escitonemina, enquanto pigmento fotoprotetor, parece ter seus domínios gênicos conservados em diversas famílias de cianobactérias relacionado à evolução das primeiras formas de vida fotossintetizantes (Dillon; Castenholz, 1999). Contudo, sua expressão

ocorre efetivamente nas espécies que possuem o agrupamento gênico organizado e que produzam mucilagem no entorno de suas células vegetativas. Além disso, evidências recentes mostram que algumas espécies terrestres ou que crescem como biofilmes em rochas, solo e superfícies vegetais produzem escitonemina e podem ser induzidas através de radiação UVB (Pandey et al., 2020).

Na rota de biossíntese proposta por Wada et al. (2013), a produção da escitonemina envolve a transcrição de dezenas de genes para edição, montagem e transporte dos diversos precursores desta molécula. Um gene em especial, o *scyA*, está relacionado à codificação da enzima responsável pela última reação de síntese que ocorre no interior do citoplasma, essencial para a formação dos monômeros de escitonemina (Pathak et al., 2020). A fim de avaliar se as cópias homólogas encontradas nos genomas das linhagens do Pantanal possuíam similaridade estrutural e evolutiva com os genes descritos em espécies produtoras de escitonemina, uma árvore filogenética deste gene foi construída (Figura 7). Nela, nota-se que as cianobactérias isoladas do Pantanal, refletindo a anotação gênica, formam um clado separado entre si e possuem baixa identidade com os genes de espécies que possuem o agrupamento gênico da escitonemina organizado de modo a propiciar uma produção detectável deste composto. Este importante resultado demonstra que as cianobactérias das lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro não possuem o arcabouço gênico ideal para produzir escitonemina. Contudo, sem uma medição da produção efetiva não se pode afirmar que este composto não seja um dos mecanismos utilizados por elas para proteção da radiação solar.

Uma estratégia alternativa à proteção da radiação ultravioleta são os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs). Na anotação dos genes relacionados aos MAAs nos genomas das cianobactérias de diversos locais do Brasil, observou-se diversos tipos de arranjos gênicos. O mais comum, encontrado em gêneros de diferentes ordens e isolados de habitats distintos, foi a presença dos quatro ou cinco genes-alvo dispersos pelo genoma, sem proximidade e não formando um arranjo contínuo (linhagens CENA597, CENA650, CCIBt3563, CCIBt3594, CENA135, CACIAM69d, CENA528, CENA526, CENA21, CENA516, CENA595, CENA302, CENA303, CACIAM70d e SPC777). Todas as linhagens pertencentes ao gênero *Brasilonema* possuíam algum tipo de organização dos genes associados aos MAAs, seja parcial (SPC951 e UFV-E1) ou completa, com todos os genes-alvo presentes no *cluster* (UFV-L1), além de genes adicionais encontrados durante a anotação como no caso das linhagens UFV-OR1 e CENA114.

O arranjo gênico clássico, como descrito em *Nostoc punctiforme* por Gao e Garcia-Pichel (2011b) formado pelos genes *mysA*, B, C e D (sendo *mysD* o gene que codifica a D-Alanina ligase) foi encontrado em quatro linhagens: CENA67, CENA596, ITEP-024 e UFV-L1. Estas foram isoladas de locais muito distantes entre si no Brasil e ambientes diversos como amostra de solo, água salobra, água doce e superfície foliar de alfeneiro (*Ligustrum lucidum*), respectivamente. Outro arranjo observado foi o similar ao descrito em *Anabaena variabilis* (Balskus; Walsh, 2010), no qual o quarto elemento do *cluster* é substituído por um NRPS (na linhagem CENA161). Por fim, encontrou-se nas linhagens CENA114 e UFV-OR1 um *cluster* que apresenta a adição de alguns genes (um transportador, uma metiltransferase e uma dioxigenase) e que difere dos demais. Este arranjo em particular foi descrito recentemente em *Nostoc linckia* NIES25 (Chen et al., 2021), na qual os autores nomearam a dioxigenase de *mysH* e o NRPS de *mysE* (como feito anteriormente em *A. variabilis*), associando sua arquitetura com a síntese otimizada de palitina.

A presença dos arranjos parciais, com apenas dois ou três genes do agrupamento próximos entre si, pode ser explicada através de eventos evolutivos aleatórios que removem ou introduzem novas porções de material genético no genoma, algo comumente observado em *clusters* gênicos biossintéticos (BGC, do inglês) de cianotoxinas (Pacheco et al., 2016; Dreher et al., 2021). Como esta organização parcial ocorreu somente em linhagens do gênero *Brasilonema*, cujas demais espécies avaliadas possuíam o arranjo completo, esta hipótese se fortalece. Uma vez que a expressão gênica é regulada por regiões promotoras que flanqueiam os genes, os arranjos parciais e os genes dispersos e desorganizados podem refletir uma síntese baixa ou inexistente de MAAs na maior parte das linhagens avaliadas (Geraldtes et al., 2020).

A variação no tamanho dos genes-alvo relacionados a MAAs observada entre as linhagens representa um desvio esperado para genes ortólogos, que são aqueles que divergem através de especiação e são encontrados nos descendentes com ancestralidade comum em cópias únicas (Shimura et al., 2015; Zhang et al., 2021). As alterações de tamanho ocorrem através de eventos evolutivos que impactam a sequência de nucleotídeos no genoma, como deleções, duplicações e inserções no domínio codificante ou nos fragmentos adjacentes. A ausência dos *clusters* organizados e as variações em tamanho também podem refletir um efeito de relíquia gênica, na qual pode haver a perda de função de porções do genoma que estejam expostas a eventos genéticos randômicos (Soule et al., 2009b). Em alguns casos, estas modificações podem alterar a integridade e funcionalidade do gene, modificando o produto final sintetizado. Mesmo em genes com alta similaridade, podem ocorrer pequenas modificações na sequência de aminoácidos durante a tradução (Vermaas et al., 1987).

O ponto fora da média (*outlier*) observado em *Pantanalinem rosanae* CENA516, referente ao gene NRPS, possui uma repetição em si mesmo que pode ser efeito de um evento evolutivo pretérito de duplicação. Para testar se esse gene de tamanho alterado teve sua função inviabilizada ou estimulada, se faz necessário a medição da concentração de MAAs sintetizados por esta linhagem, seja em condição normal de crescimento ou sob estímulos externos, como a exposição a luz ultravioleta (Sinha et al., 1999).

Sobre as relações filogenéticas das cianobactérias brasileiras estudadas, não houve correlação nítida entre ecossistema de origem e organização dos genes relacionados a síntese de MAAs, uma vez que linhagens provenientes de um mesmo nicho apresentaram variações entre si e com àquelas espécies pertencentes a outros biomas. O arranjo dos genes *mysABCD* de forma organizada foi observado em linhagens de origem Amazônica, da Mata Atlântica e de corpos d'água localizados no sul e nordeste brasileiros. Assim, não há parâmetro direto de comparação que possa ser estabelecido entre habitat original e organização do *cluster* de MAAs. No entanto, taxonomicamente este arranjo foi observado apenas em linhagens das ordens Nostocales e Chroococcales (identificado também em *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Microcystis panniformis* FACHB1757, *Staniera* sp. NIES3757 e *Staniera cyanosphaera* PCC7437) o que pode indicar que um dos fatores determinantes da organização dos genes relacionados a produção de MAAs está conectado às relações filogenéticas de cada linhagem, ao invés do habitat de ocorrência.

Esta vertente de pensamento foi explorada por Jain et al. (2017), onde foram compilados dados da literatura que demonstram a produção de MAAs majoritariamente em espécies da ordem Nostocales. Contudo, os autores também relatam determinações constitutivas ou através de estímulos físico-químicos em espécies das ordens Chroococcales e Oscillatoriales. Segundo eles, as demais ordens de cianobactérias ainda não foram amplamente exploradas, o que dificulta a compreensão da história evolutiva dos genes desta via. O grupo monofilético (que compartilha um ancestral em comum) das Nostocales é, sem dúvidas, o mais estudado na pesquisa científica global. Contudo, sua plasticidade fenotípica, que lhes permite colonizar habitats tropicais, temperados e polares, somado ao seu arsenal metabólico diverso, com centenas de produtos naturais e moléculas de interesse descritas, posiciona esta ordem em um local de destaque que causou este viés científico (Sukenic et al., 2012; Driscoll et al., 2018; Gavriilidou et al., 2022). A observação do arranjo gênico deste estudo parece refletir a existência de mais dados acerca da ordem Nostocales, somando ao conhecimento público comum às observações acerca das linhagens brasileiras.

Em relação à origem taxonômica dos genes relacionados à produção de metabólitos fotoprotetores, especificamente os MAAs, sua distribuição dispersa os coloca presentes nos genomas da maior parte do filo Cyanobacteria, o que denota a relevância destes compostos com funções associadas à melhoria do *fitness* das cianobactérias frente a adversidades ambientais enfrentadas em uma escala geológica de tempo muito ampla (Jain et al., 2017; Garcia-Pichel et al., 2019). Enquanto vantagem evolutiva, estes genes compõem sequências conservadas através das gerações desde quando os ancestrais das cianobactérias, durante a diversificação dos procariontos, tiveram que resistir ao estresse da exposição UV direta (Sorrels et al., 2009).

Sobre a correlação entre distribuição geográfica e relações filogenéticas, a plasticidade das cianobactérias limita o estabelecimento de conclusões sólidas. Marquardt e Palinka (2007) descreveram algo similar ao que foi observado para os genes de MAA neste estudo, quando observaram a posição taxonômica de 30 linhagens do gênero *Phormidium*. Através de uma abordagem polifásica, unindo dados genéticos e morfológicos, os autores não conseguiram estabelecer uma afinidade das relações filogenéticas com os habitats de isolamento de cada amostra. Do mesmo modo, um estudo focado em analisar a capacidade de produção de ficoeritrinas em diversas linhagens do gênero *Microcystis* não obteve uma correlação nítida, descrevendo ainda variações em espécies que ocorrem num mesmo ecossistema (Otsuka et al., 2001). Bittencourt-Oliveira et al. (2001) e Wilson et al. (2005) ambos analisaram linhagens de *Microcystis* isoladas em lagos e reservatórios do Brasil e Estados Unidos, descrevendo variações genéticas (relacionadas a genes de toxinas, regiões flangeadoras e espaçadores intergênicos de ficocianinas) em lagos próximos e até mesmo dentro do mesmo lago. Estas descobertas corroboram a hipótese de que muitas ordens e famílias de cianobactérias ainda são polifiléticas, sendo que as descrições baseadas em morfologia que as agrupam podem estar mascarando diferenças genéticas de linhagens que possuem distribuição cosmopolita e ancestralidade complexa (Garcia-Pichel et al., 1996; Wilmotte et al., 1997).

Ainda assim, em clados específicos de cianobactérias em menores níveis taxonômicos, existem correlações de ocorrência geográfica e genética sendo feitas. Haande et al. (2008) realizou uma análise filogenética abrangente com dezenas de linhagens da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, identificando padrões de similaridade relacionados a geografia para diversos genes, como o *nifH* (nitrogenases), ITS1 e o PC-IGC (espaçador intergênico de ficocianina). Esta espécie de cianobactéria tem demonstrado recentemente a capacidade de invadir ecossistemas temperados, sendo que sua expansão global pode estar interligada a colonização gradual e contínua de habitats diversos. Isto ocorre graças a plasticidade fisiológica e tolerância genética descritas nas cianobactérias (Badger et al., 2006; Ishida et al., 2009).

No ambiente natural, o que pode estar de fato ocorrendo é a interação de subespécies de uma mesma linhagem dentro de cada comunidade. Esta ocorrência conjunta (ou compartilhamento de nicho) pode estar relacionada à convergência de traços e interações metabólicas entre organismos que afetam aspectos físico-químicos (como disponibilidade de nutrientes), tornando-se fatores determinantes para explicar a confluência entre filogenia e habitat (Tromas et al., 2018).

Em suma, a hipótese inicial deste capítulo foi refutada, levando à conclusão de que a presença do *cluster* de genes relativos a escitonemina e MAAs não ocorre necessariamente organizada nos genomas de cianobactérias originárias de habitats com alta incidência de radiação solar. Portanto, relações filogenéticas evolutivas podem ser uma alternativa para explicar a presença organizada dos genes envolvidos na síntese de MAAs nos genomas cianobacterianos. A anotação destes genes é o primeiro passo para determinar o potencial biotecnológico de cianobactérias brasileiras tropicais para a produção de escitonemina e MAAs. Análises por espectrometria dos extratos de linhagens de interesse podem adicionar dados mais contundentes em relação aos níveis de síntese de MAAs, sejam constitutivamente produzidos ou estimulados em bioensaios através de fatores físico-químicos.

3. Produção constitutiva de MAAs em cianobactérias brasileiras

Resumo

Substâncias com potencial fotoprotetor, tais como os aminoácidos do tipo micospolina (MAAs), podem ser sintetizados de modo constitutivo por cianobactérias como estratégia de mitigação dos danos associados à radiação solar. Contudo, esta síntese ocorre de maneira efetiva se associada à presença de genes específicos organizados em sintenia. A fim de explorar o efeito da arquitetura gênica na produção constitutiva de MAAs, analisou-se quantitativamente os extratos cianobacterianos em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS-MS). As linhagens originárias do Pantanal, que não apresentam arranjos gênicos ordenados, não exibiram concentrações mensuráveis dos MAAs avaliados, enquanto que as linhagens ITEP-024 e CENA596 com agrupamentos gênicos lineares, apresentaram valores detectáveis de shinorina e porphyra-334 em diferentes meios de cultura testados. Este resultado indica que a organização gênica serve como uma informação preliminar que reflete o potencial biossintético mensurável da produção constitutiva de MAAs em cianobactérias.

3.1. Introdução específica

Os aminoácidos do tipo micospolina (MAAs) constituem um grupo diverso de metabolitos sem cor e solúveis em água produzidos por cianobactérias e outros organismos com diversos papéis em processos biológicos, incluindo foto proteção UV (Jain et al., 2017; Lawrence et al., 2018), propriedades antioxidantes (Rastogi et al., 2016), regulação osmótica (Waditee-Sirisattha et al., 2014), defesa contra a dissecação (Feng et al., 2012) e contra estresse térmico (Michalek-Wagner, 2001). Além da presença dos genes relacionados às enzimas que sintetizam os MAAs de maior interesse, como shinorina e porphyra-334, de forma agrupada no genoma (Hu et al., 2015; Geraldine; Pinto, 2021), uma outra forma de abordagem muito utilizada para avaliar o potencial produtor de cada linhagem cianobacteriana tem sido a determinação da produção de MAAs em condições normais de cultivo (produção constitutiva) versus aquela estimulada por estresse, como temperatura, salinidade, acidez ou radiação UV (Geraldine et al., 2019; Rosic, 2021).

Nos estudos sobre síntese de produtos naturais, o foco de avaliação vai além das bases genéticas e inclui o metabolismo celular como um todo, que é dependente das condições nutricionais mínimas para o crescimento das cianobactérias de maneira eficiente (Lau et al., 2015). A presença de micronutrientes (como cobre, manganês, zinco e outros) é essencial para fixação de nitrogênio, uso eficiente de luz e funcionamento do maquinário enzimático (Rueter; Peterson, 1987). A remoção das condições ótimas de crescimento, como a ausência de

fósforo (P), podem causar alterações metabólicas com efeitos secundários que muitas vezes são desejados, como o acúmulo de lipídeos (Cordeiro et al., 2017). Especificamente para os MAAs, os pesquisadores sugerem que sob baixas concentrações de nitrogênio (N) no meio há uma redução da produção de MAAs, uma vez que estas substâncias são derivadas de anéis aminociclohexenona ou aminociclohexenimina (Karentz, 2001). Todavia, deficiências moleculares particulares, como de enxofre (S), parecem causar um aumento no rendimento de MAAs específicos que agem para contrabalancear as condições estressantes e proteger o metabolismo celular (Singh et al., 2010), sendo que algumas espécies de cianobactérias são capazes de manter seu crescimento sem alterar as concentrações de MAAs produzidos mesmo sob ausência de N ou P (Mohlin; Wulff, 2008).

Estas distinções fisiológicas entre linhagens cianobacterianas dificultam seu agrupamento quando consideramos suas vias de biossíntese. Cada espécie tem potencial de adaptação metabólica distinta, relacionada tanto a fatores ambientais quanto genéticos. Já foi descrito para algumas espécies que o crescimento em ambientes sombreados produz menos MAAs do que naquelas que crescem em habitats expostos diretamente a luz (Aigner et al., 2018). Isto pode estar relacionado a economia de energia e substratos nas espécies sombreadas que não necessitam da proteção adicional dos MAAs ou que apresentam a falta da capacidade em produzi-los. Compreender esta diferença é crucial na busca por linhagens que podem ser usadas como modelos em estudos biotecnológicos.

A fim de prosseguir a investigação da produção de aminoácidos do tipo micosporina em cianobactérias isoladas do Pantanal brasileiro, as linhagens *Arthrospira platensis* CENA597, *Arthrospira platensis* CENA650, *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Geminocystis* sp. CENA526, *Pantanalinema rosanae* CENA516 e *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563 foram cultivadas e sua biomassa submetida a extração para mensurar a produção constitutiva de MAAs. Adicionalmente, quatro espécies com arranjos gênicos organizados identificados no capítulo anterior (*Nodularia spumigena* CENA596, *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, *Brasilonema sennae* CENA114 e *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1) foram cultivadas a fim de servir como comparação para os dados obtidos nas linhagens do Pantanal, que não possuem os genes relativos a MAAs agrupados. Deste modo, a hipótese central testada neste capítulo foi a de que, quando presente, o arranjo dos genes relacionados a síntese de MAAs organizado em sequência linear no genoma está diretamente relacionado a produção efetiva de concentrações mensuráveis de MAAs, mesmo sem o uso de fatores de estresse para estimular sua síntese.

3.2. Materiais e Métodos

Condições de cultivo das cianobactérias

As espécies a serem estudadas são as linhagens de cianobactérias isoladas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal em trabalhos anteriores (Andreote et al., 2014; Malone et al., 2014; Vaz et al., 2015; Genuário et al., 2017) além de outras quatro linhagens de outros habitats para comparação, presentes no biobanco de culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP (Tabela 2). Como descrito anteriormente, as linhagens adicionais representam cianobactérias que tiveram os arranjos gênicos identificados no capítulo anterior como organizados em *cluster*, diferindo das linhagens isoladas do Pantanal.

Tabela 2. Informações gerais sobre as cianobactérias utilizadas

Linhagem	Meio de cultura	Habitat de origem	Montagem do genoma
<i>Nodularia spumigena</i> CENA596	Z8 (Kotai, 1972)	Água salobra em criação de camarões (Rio Grande do Sul/Brasil)	Gca_001623485.1 (Popin et al., 2016)
<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> ITEP-024	Z8 (Kotai, 1972)	Reservatório Tapacurá (Pernambuco/Brasil)	Gca_019598945.1 (Lima et al., 2017)
<i>Geminocystis</i> sp. CENA526	Z8 (Kotai, 1972)	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Em elaboração
<i>Arthrospira platensis</i> CENA597	Z8 (Kotai, 1972)	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Em elaboração
<i>Arthrospira platensis</i> CENA650	Z8 (Kotai, 1972)	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Em elaboração
<i>Pantanalinema rosanae</i> CENA516	Z8 (Kotai, 1972)	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Em elaboração
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528	Z8 (Kotai, 1972)	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Em elaboração
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> CCIBt3563	Z8 modificado com adição de sal	Lagoa salino-alcálica (Mato Grosso do Sul/Brasil)	Gca_015245355.1 (Delbaje et al., 2021)
<i>Brasilonema sennae</i> CENA114	Z8[0] sem fonte de nitrogênio	Interior de cano de ferro para passagem da água de uma nascente (São Paulo/Brasil)	Gca_006968745.1 (Alvarenga et al., 2020)
<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1	Z8[0] sem fonte de nitrogênio	Porção axilar da folha de uma orquídea (Espírito Santo/Brasil)	Gca_012912125.1 (Alvarenga et al., 2020)

Para a avaliação da produção constitutiva de MAAs, as linhagens cresceram em triplicata por 45 dias com rotação da posição dos frascos em relação às lâmpadas. Ambas *Brasilonema octagenarum* e *Brasilonema sennae* cresceram por 45 dias adicionais, totalizando 90 dias, uma vez que seus inóculos iniciais foram retirados de meio de cultivo sólido e tiveram uma longa fase de aclimação (*lag*) ao meio líquido. Todas as linhagens foram cultivadas no mesmo meio de cultura (Tabela 2) e, a fim de testar a influência da variação do estado nutricional causado pelo uso de diferentes meios, as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526, *Nodularia spumigena* CENA596, *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 e *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1 cresceram também em meio BG-11 (Allen, 1968), sendo que as três primeiras foram cultivadas em um terceiro meio, o ASM-1 (Gorham et al., 1964). A ideia inicial era incluir *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1 em ambos os meios adicionais (BG-11 e ASM-1), mas esta linhagem não apresentou crescimento considerável no meio ASM-1, mesmo depois dos 90 dias estipulados.

As culturas utilizadas foram mantidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em temperatura de 22 ± 1 °C, luz fluorescente ($40\text{-}50 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), com ciclo claro/escuro de 14/10h e rotação aleatória dos frascos. Todos os meios de cultura e frascos utilizados foram previamente esterilizados em autoclave vertical por 20 min à 120 °C e 1 atm de pressão (Fabbe LTDA, Brasil).

Avaliação da produção constitutiva de MAAs em isolados cianobacterianos

No fim do período designado de crescimento, os cultivos de cada linhagem ($n = 3$) tiveram seus volumes totais centrifugados sob 10.000 rpm por 15 minutos à 5 °C (centrifuga Hettich Universal 320R, Alemanha), congelados a -18 °C e liofilizados por 48h sob vácuo inferior a 500 μHg e temperatura menor que -40 °C (Liofilizador Liotop L101, Brasil) para posterior extração.

Na extração ácida, aproximadamente 5,0 mg de biomassa liofilizada foram pesadas (balança de precisão OhausAR3130, Brasil) em tubos falcon, e 2 mL de solvente 0,1% ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (Fisher Scientific, grau LC/MS, Estados Unidos) (pH ~ 2,55) foram adicionados. Colocou-se os tubos para agitar no vórtex por 5s (Labnet Mixer S200, Estados Unidos) e no sonicador por 1 min com amplitude 30% e impulso 10 (Sonicador modelo 705 Fisher Scientific, Estados Unidos) antes de retornar ao vórtex por mais 5s. Essa agitação física tem o intuito de facilitar e agilizar o processo de extração mediada pelo

solvente. Após a sonicação e vórtex, o processo de extração ocorreu por uma hora em temperatura ambiente.

Passado o período de extração, uma nova centrifugação foi feita para remover os restos celulares (10.000 rpm, 10 min, 5 °C). O sobrenadante foi pipetado em uma seringa contendo filtros de 0,45 µm PVDF (Analítica, Brasil), sendo filtrado diretamente em frascos próprios para análise de HPLC previamente identificados. Este protocolo de extração próprio para análises de MAAs em cianobactérias foi desenvolvido e validado por Geraldles et al. (2020).

Determinação das concentrações de MAAs através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS-MS)

A quantificação de MAAs presentes nas amostras foi realizada em um sistema de cromatografia líquida série 1290 operando em modo positivo de ionização equipado com uma bomba 1290 VL e um sistema injetor HiP ALS 1260 acoplado em um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (QqQ) 6460 (Agilent Technologies, Estados Unidos). Para quantificar a concentração de MAAs específicos, como shinorina e porphyra-334, utilizaram-se padrões com concentrações conhecidas adicionados para leitura nas mesmas corridas que as amostras. Estes padrões foram doados pelo Professor Ernani Pinto, do laboratório de Ecotoxicologia do CEA/USP.

O solvente de extração foi usado como Buffer A na corrida (0,1% ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio), enquanto o Buffer B continha acetonitrila e água Milli-Q (8:2) + 0,1% ácido fórmico (v/v) em um quociente de vazão de 0,5 mL/min. O início da corrida de separação continha 100% de Buffer A até os dois primeiros minutos de corrida, seguida pela injeção de 95% de Buffer B no sexto minuto e uma manutenção de gradiente por um minuto e meio. Após isso, um equilíbrio de 0% Buffer B era mantido por quatro minutos até a próxima injeção de amostra. Por terem baixo peso molecular e serem altamente polares, os picos de MAAs ocorrem nos primeiros minutos de corrida, agilizando as leituras e permitindo a economia de reagentes. Entre as amostras, correu-se um branco composto por Buffer A (o solvente de extração). Todos os dados obtidos foram analisados com o software MassHunter Workstation B.04.01. Esses parâmetros de corrida seguem o que foi descrito em Geraldles et al. (2020).

A fim de quantificar a produção constitutiva detectada em cada linhagem, foram utilizadas as equações das retas obtidas a partir dos dados estimados para cada padrão (Figura 11). Como houve nas amostras apenas picos de detecção mensuráveis para shinorina e porphyra-334, os dados de micosporina-glicina-alanina e do padrão de palitina não foram apresentados.

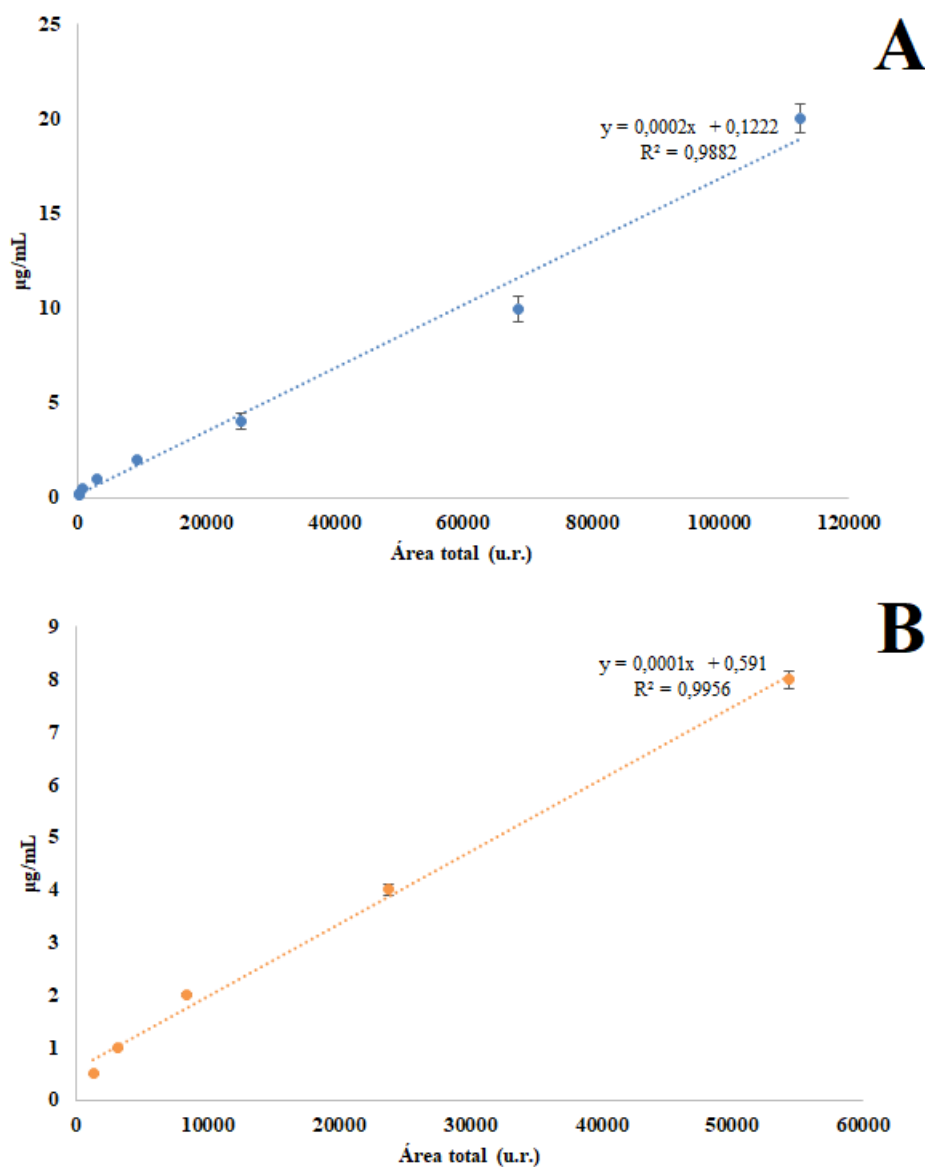


Figura 11. Curvas padrões para a shinorina (A) e porphyra-334 (B) com as respectivas equações das retas usadas para estimar a produção constitutiva dos extratos cianobacterianos. Pontos representam a média dos valores obtidos com os respectivos desvios padrões.

3.3. Resultados

Os valores obtidos para a produção constitutiva de shinorina (SHI) e porphyra-334 (P-334) que foram mensurados para cada linhagem estão descritos na Tabela 3. A maior parte das cianobactérias testadas não apresentou concentrações detectáveis destes MAAs, sendo que a *Nodularia spumigena* CENA596 e a *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 possuem tanto shinorina quanto porphyra-334. Enquanto a ITEP-024 apresentou a maior concentração total de shinorina obtida neste experimento, CENA596 teve o nível mais alto de porphyra-334.

Tabela 3. Concentração de shinorina (SHI) e porphyra-334 (P-334) detectadas nas cianobactérias de acordo com o meio de cultura usado. Os resultados são apresentados com $\mu\text{g}_{\text{MAAs}}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$. O (--) indica ausência de detecção do MAA. O (X) indica presença do MAA em níveis abaixo do limite inferior de detecção

Linagem	Meio de Cultura	SH ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	P-334 ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Palitina	Micosporina-glicina-alanina
<i>Nodularia spumigena</i> CENA596	Z8	$0,06 \pm 0,04$	$4,79 \pm 3,64$	--	--
	ASM-1	$0,05 \pm 0,02$	$2,59 \pm 1,58$	--	--
	BG-11	$0,07 \pm 0,04$	$6,17 \pm 4,56$	--	--
<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> ITEP-024	Z8	$3,14 \pm 0,98$	$0,32 \pm 0,18$	X	--
	ASM-1	$2,76 \pm 1,32$	$0,26 \pm 0,09$	--	--
	BG-11	$4,07 \pm 1,47$	$0,36 \pm 0,19$	X	X
<i>Geminocystis</i> sp. CENA526	Z8	--	--	--	--
	ASM-1	--	--	--	--
	BG-11	--	--	--	--
<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1	Z8 (0)	--	--	X	--
	BG-11	--	--	X	--
<i>Brasilonema sennae</i> CENA114	Z8 (0)	--	--	X	--
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528	Z8	--	--	--	--
<i>Anabaenopsis elenkini</i> CCIBt3563	Z8 mod.	--	--	--	--
<i>Arthrospira platensis</i> CENA597	Z8	--	--	--	--
<i>Arthrospira platensis</i> CENA650	Z8	--	--	--	--
<i>Pantanalinema rosanae</i> CENA516	Z8	--	--	--	--

As concentrações de porphyrina-334 detectadas em *N. spumigena* CENA596 apresentaram variação nítida em seus valores absolutos mensurados entre os meios de cultura testados (BG-11 \geq Z8 > ASM-1), apesar de não exibir significância estatística. Em relação aos demais MAAs avaliados, tanto a palitina (PAL) quanto a micosporina-glicina-alanina (MGA) não apresentaram valores acima do limite inferior de detecção. No entanto, foram identificados picos similares ao padrão de palitina em *Brasilonema sennae* CENA114, *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1 (em ambos os meios testados) e *S. torques-reginae* ITEP-024 (somente nos meios BG-11 e Z8). A micosporina-glicina-alanina, por sua vez, teve um pico característico somente na linhagem ITEP-024 cultivada em BG-11. Nota-se que para estes quatro MAAs, avaliados apenas as linhagens com arranjo gênico organizado obtiveram resultado positivo.

Uma vez que a linhagem ITEP-024 foi a única que apresentou sinais de detecção associados a todos os MAAs avaliados, apresenta-se seu cromatograma em comparação aos padrões utilizados (Figura 12). O intuito é mostrar que a identificação dos MAAs segue diversos parâmetros que permitem afirmar com segurança a identidade da molécula captada pelo detector. Observa-se que o tempo de retenção dos padrões é o mesmo que o observado na amostra do extrato de ITEP-024. Além disso, os valores de massa carga (m/z) e padrões de fragmentação para cada MAA (não representados) seguem os mesmos moldes observados nos padrões. A análise foi realizada em modo positivo com ionização por eletrospray (+ESI). Além disso, se trata de uma análise de corrente iônica total (TIC), que representa a magnitude somada em toda a faixa de massas detectadas para cada ponto da corrida. Por se tratar de um resultado obtido em MS/MS, a análise também ocorre através do monitoramento de reações múltiplas (MRM), que detecta simultaneamente vários analitos com diferentes íons de origem e/ou produtos, utilizando uma energia de fragmentação de 100,0V neste caso.

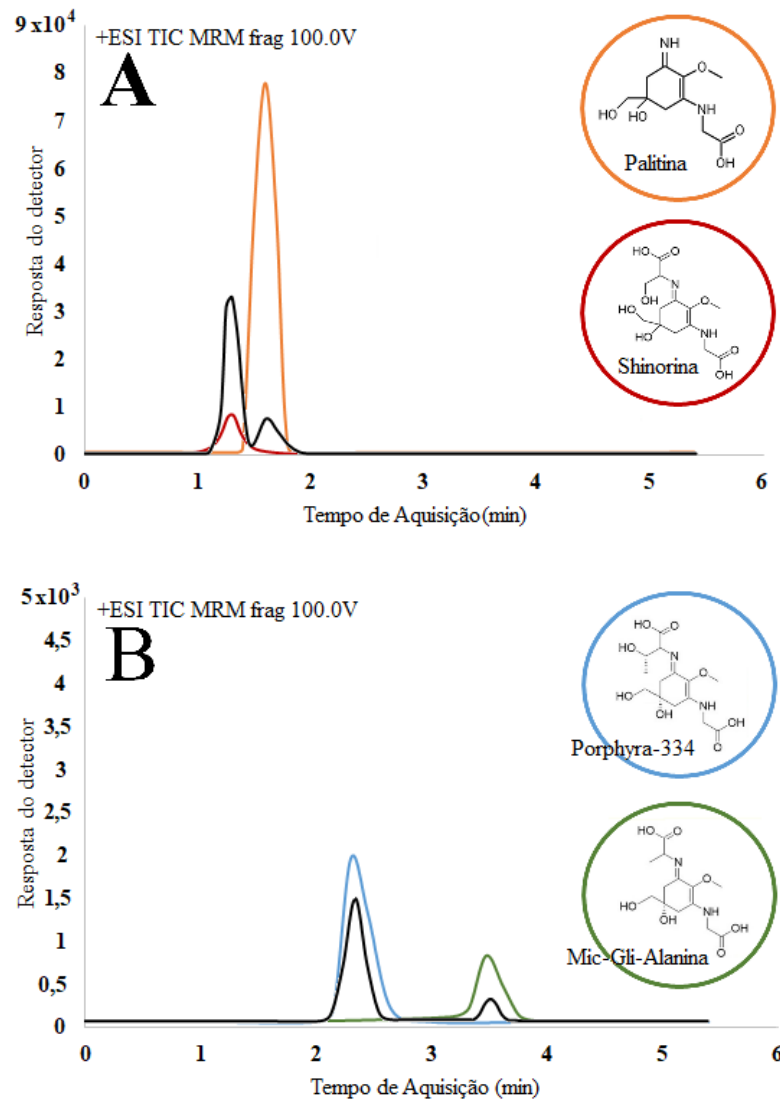


Figura 12. Cromatograma de íons totais vs cromatograma de íon extraído em modo positivo com ionização por eletrospray (+ESI) e monitoramento de reações múltiplas (MRM) dos padrões utilizados (A- shinorina 4 $\mu\text{g/mL}$ e palitina 4 $\mu\text{g/mL}$ / B- porphyra-334 4 $\mu\text{g/mL}$ e micosporina-glicina-alanina 0,8 $\mu\text{g/mL}$) em cores, versus os picos obtidos em *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 (em preto).

3.4. Discussão

Segundo a hipótese original, aparentemente existe uma sobreposição dos dados apresentados na anotação gênica (do capítulo anterior) com as produções constitutivas de MAAs específicos das cianobactérias analisadas. As linhagens originárias das lagoas salino- alcalinas do Pantanal (*Arthrospira platensis* CENA597, *Arthrospira platensis* CENA650, *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Geminocystis* sp. CENA526, *Pantanalinema rosanae* CENA516 e *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563) possuem longos fragmentos intergênicos

(superiores a 15.000 pb) distanciando cada gene com função similar aos relacionados a síntese de MAAs, não formando um *cluster* contínuo colinear e em sintenia ou adjacente que favorece a transcrição gênica (Graham, 1995). De modo prático, isto pareceu refletir nos níveis dos MAAs avaliados, que foram indetectáveis nestas linhagens. Contudo, a avaliação de MAAs direcionada (com apenas 4 padrões) permite concluir apenas que as linhagens do Pantanal não produzem os MAAs mais comumente encontrados em cianobactérias.

Para as espécies de *Brasilonema* avaliadas, apesar da presença do arranjo gênico organizado, ambas não apresentaram concentrações mensuráveis de SHI, P-334, PAL e MGA. Houve apenas a presença de um pico característico de palitina, contudo este foi menor que o limite inferior de detecção. O *cluster* gênico identificado nestas linhagens, diferente daquele presente em *S. torques-reginae* ITEP-024 e *N. spumigena* CENA596, possui genes adicionais após *mysABC*, como *mysH* e *mysE* além de um transportador e outra metiltransferase, sendo recentemente descrito como propício para a síntese particular da palitina (Chen et al., 2021), que é considerada um MAA secundário. Pode-se dizer que as linhagens dotadas do arranjo gênico organizado estão se beneficiando de seu arcabouço genético para produzir compostos protetores de UV (Boucar et al., 2021).

Diversos estudos na literatura discutem uma ampla variedade de estratégias utilizadas pelas cianobactérias para evitar danos causados pela RUV que vão além da síntese de moléculas fotoprotetoras. O acúmulo de carotenoides e a motilidade de deslizamento (Quesada; Vicent, 1997; Demay et al., 2019), foto-inibição auto induzida e dissipação de calor (Karsten, 2008), produção de enzimas antioxidantes e sistemas eficientes de reparo de DNA (Castenholz; Garcia-Pichel, 2012) são apenas alguns exemplos. Todas as linhagens testadas sob condições de cultivo controle (sem fatores de estresse, como incrementos na intensidade de luz ou na temperatura) podem estar utilizando uma ou diversas destas táticas para evitar danos associados a luz.

A ideia de estratégias adicionais para evitar danos causados por UV é particularmente relevante para as cianobactérias isoladas nas lagoas do Pantanal. Como discutido por Castenholz e Garcia-Pichel (2012), as linhagens originárias de habitats hipersalinos podem lidar com o estresse da radiação ultravioleta através da mobilidade na coluna d'água mediada por aerótopos (estruturas similares a vesículas de gás utilizadas para flutuabilidade). Esta movimentação ao longo do dia permite capturar níveis ótimos de luz para fotossíntese sem expor as cianobactérias à foto-inibição. Este comportamento já foi descrito em filamentos móveis da espécie *Spirulina labyrinthiformis* (Garcia-Pichel et al., 1994) em comunidades provenientes de ecossistemas hipersalinos. Com a exceção de *Geminocystis* sp. CENA526,

todas as demais linhagens do Pantanal testadas (Tabela 2) também são filamentosas com capacidade de se deslocar por deslizamento, possivelmente utilizando desta aptidão ao invés de sintetizar MAAs para absorver UV.

Tanto *Nodularia spumigena* CENA596 quanto *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 foram as únicas espécies testadas que produziram MAAs em concentrações detectáveis, estando nas mesmas condições de luz que as demais linhagens e sem radiação UVA ou UVB adicionais, que é descrito na literatura como um fator de indução de MAAs (Shang et al., 2018; Le Moigne et al., 2021). *N. spumigena* e *S. torques-reginae* diferem das linhagens do Pantanal por possuírem o arranjo gênico relativo às MAAs organizado em seus genomas e também quanto ao habitat de origem, sendo a primeira de um lago salobre usado para criação de camarões na zona subtropical do Brasil e a segunda de um reservatório de água doce no Nordeste, ambientes nos quais ambas são capazes de formar florações (Werner et al., 2012; Popin et al., 2016). Neste caso, a capacidade de sintetizar altas concentrações de MAAs as favoreceriam diante do crescimento descontrolado que ocorre em florações. Além disso, ambas são espécies filamentosas que possuem a capacidade de utilizar diversas estratégias combinadas para se proteger da radiação solar. A presença do *cluster* gênico, que beneficia as condições ótimas para a produção de MAAs, acrescenta um dado importante para a biologia da CENA526 e da ITEP-024, ainda que já reportada anteriormente em ambas as linhagens, mas sem a associação direta ao arcabouço gênico (Geraldles et al., 2019; Geraldles et al., 2020a), quando se descreveu pela primeira vez a presença de MGA em uma cianobactéria (ITEP-024). Na triagem feita por Geraldles et al. (2019) com 69 diferentes linhagens de cianobactérias, a síntese de MAAs foi detectada em apenas 37% de todas as espécies testadas. Isto demonstra que apesar do estudo contínuo por mais de três décadas do potencial das cianobactérias como produtoras de substâncias para absorção de UV, somente uma pequena fração de toda a diversidade destes organismos é realmente relevante como alvos biotecnológicos viáveis para produção de MAAs em larga escala.

Uma combinação de fatores é importante quando avaliamos a produção de MAAs em cianobactérias. O arranjo genético associado à história evolutiva de cada linhagem e a presença do *cluster* gênico organizado importa, assim como as condições físicas de cultivo (foto período, pH e temperatura usados) e a composição química dos meios (presença de sal e amônia, por exemplo), podendo causar flutuações nos níveis de aminoácidos do tipo micosporinas detectados (Singh et al., 2008; Mushir; Fatma, 2011). Hartmann et al. (2015) não encontrou concentrações mensuráveis de MAAs em *Leptolyngbya foveolarum* CCALA081 e *Calothrix* sp. CCALA032, mas descreveu 0,31 µg por mg de peso seco de porphyra-334 em

Nostoc commune CCALA118. As três linhagens cresceram em meio BG-11 à 20°C num período claro/escuro 16:8h. Esta concentração de P-334 é maior do que o que já foi reportado para outras linhagens do gênero *Nostoc*, como em *Nostoc* sp. CCIBt3247 e *Nostoc* sp. CCIBt3292 cultivadas em ASM-1 sob 24°C e foto período 12:12h (Geraldles et al., 2020b) ou *Nostoc* sp. R76DM em BG-11 a 25°C com 72h de exposição a UV (Rastogi et al., 2016). Estas diferenças em níveis de MAAs podem ser parcialmente causadas pelas variações nutricionais no cultivo celular. Por outro lado, a produção diferencial de MAAs nestas *Nostoc* podem refletir diferenças espécie-específicas ligadas aos seus habitats de origem, o que induziria diversos perfis metabólicos (CCALA118 foi isolada dos Alpes Italianos, R76DM é proveniente de Gujarat, Índia e CCIBt3247 e CCIBt3292 são do bioma Mata Atlântica do Brasil).

Aigner et al. (2018) adicionou dados relevantes para a compreensão da produção de MAAs em cianobactérias e sua relação com seus habitats naturais. Analisando três espécies de *Chamaesiphon*, os autores identificaram altos índices de P-334 em duas espécies isoladas de biofilmes epilíticos (que crescem sobre rochas) presentes em riachos dos alpes Austríacos expostos diretamente a luz solar (*C. starmachii* $1,65 \pm 0,68 \mu\text{g mg}^{-1}$ e *C. geitleri* $0,79 \pm 0,15 \mu\text{g mg}^{-1}$) contra uma produção muito inferior de uma espécie isolada de um riacho sombreado por vegetação (*C. polonicus* $0,064 \pm 0,013 \mu\text{g mg}^{-1}$). Se o habitat de origem realmente tem ligação com a produção constitutiva de MAAs, então os resultados observados em *Brasilonema sennae* CENA114 e *B. octagenarum* UFV-OR1 podem ser explicados deste modo. Apesar de possuírem o arranjo gênico organizado, ambas foram isoladas de ambientes sombreados, seja de um biofilme crescendo no interior de um cano de ferro ou de um biofilme epifítico (que cresce sobre superfícies vegetais) presente na região axilar de folhas de orquídea da Mata Atlântica (Tabela 2). Isto demonstra ainda mais a importância de amostrar cianobactérias de localidades diversas e ainda pouco exploradas, a fim de identificar linhagens que sejam naturalmente adaptadas para produzir metabólitos de interesse com altos rendimentos (Dextro et al., 2021).

Dada a produção constitutiva detectada no meio de cultura Z8, uma hipótese secundária que motivou este experimento surgiu do questionamento de que diferentes condições nutricionais poderiam influenciar a síntese de MAAs. O Z8 é considerado um meio padrão para crescimento de microrganismos, especialmente cianobactérias (Niva, 1976; Costa et al., 2014; Monteiro et al., 2017), possuindo uma mistura diversa de micronutrientes que podem estar ausentes em outros meios, como I, Cr, Cd, Al e Ni (Kotai, 1972). Para avaliar esta influência, dois outros meios utilizados por pesquisadores para o cultivo de cianobactérias, o BG-11 e o ASM-1, também foram testados. Notou-se que o uso destes meios afetou mais expressivamente

os valores mensurados de P-334, especificamente em *Nodularia spumigena* CENA596, sem alterar consideravelmente as concentrações de SHI detectadas (variação observada na ITEP-024 menor que 1.5x). As linhagens CENA596 e ITEP-024, crescendo em BG-11, apresentaram respectivamente os maiores valores absolutos de P-334 ($6,17 \pm 4,56 \mu\text{g mg}^{-1}$) e SHI ($4,07 \pm 1,47 \mu\text{g mg}^{-1}$) medidos. Independente do meio de cultura usado, ambas exibiram níveis detectáveis de MAAs, dando suporte à importância de possuir os genes desta via de síntese arranjados de modo organizado e em sintonia no genoma. As demais linhagens que foram cultivadas em BG-11 (CENA526 e UFV-OR1) não produziram níveis mensuráveis dos MAAs alvo. Com isto, podemos compreender que a organização genética e o ambiente nutricional de crescimento são apenas alguns dos fatores associados a complexa produção de aminoácidos do tipo micosporina em cianobactérias.

O meio ASM-1 pode ser considerado nutricionalmente menos favorecido que outros meios de cultivo, principalmente devido às suas baixas concentrações de N e P. Gerald et al. (2020b) não detectaram MAAs em 21 linhagens de cianobactérias cultivadas em ASM-1, mesmo depois de 72h expostas a UVA + UVB. Neste caso, pode ter sido observada a incapacidade de síntese de MAAs destas linhagens por fatores genéticos, ou ainda o efeito do estado nutricional do meio, não concedendo suporte suficiente para que houvesse biossíntese destas substâncias secundárias em detrimento de moléculas essenciais para a sobrevivência celular. Os autores também estimaram a produção constitutiva de MAAs em duas espécies presentes neste trabalho, *N. spumigena* e *S. torques-reginae*, em meio ASM-1, detectando $0,002 \mu\text{g mg}^{-1}$ e $0,96 \mu\text{g mg}^{-1}$ de SHI e $1,31 \mu\text{g mg}^{-1}$ e $0,002 \mu\text{g mg}^{-1}$ de P-334 respectivamente. Comparado com os resultados obtidos neste estudo, todos os valores mensurados em ASM-1 para ambas as linhagens foram superiores aos reportados previamente. Esta variação, observada nas mesmas espécies que cresceram nos mesmos meios de cultura, ilustra a importância dos demais parâmetros de crescimento, como a temperatura, ciclo de luz e inóculo inicial utilizado, influenciando na concentração final de MAAs detectada. Para a espécie *Geminocystis* sp. CENA526, que não possui o arranjo dos genes relacionados com MAAs organizado em seu genoma, o cultivo em diferentes condições nutricionais (ASM-1, BG-11 e Z8) não teve efeito na síntese de aminoácidos do tipo micosporina. Isso pode ser um indicio de que a organização gênica seja um fator de maior relevância em comparação ao estado nutricional.

Não obstante, fatores de estresse parecem ser capazes de induzir a síntese de MAAs mesmo em linhagens sem produção constitutiva evidente. A espécie do Pantanal *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563 testada não produziu valores detectáveis de SHI, PAL, P-334 ou MGA no meio Z8(0), mas Bairwa et al. (2021) reportou uma produção de shinorina de $0,1 \mu\text{g mg}^{-1}$ de

peso seco em uma cultura de *Anabaenopsis* sp. SCLyA (isolada do lago hipersalino Sambar, na Índia) crescendo em BG-11 e exposta a luz UVB. Apesar de ambas pertencerem ao mesmo gênero e serem encontradas em habitats similares (lagoas salino-alcálicas), outros fatores bióticos e abióticos podem atuar para determinar seus perfis metabólicos. Neste caso, a indução por UV e o meio de cultura mais rico podem ser parcialmente responsáveis pela síntese de MAAs. Não se pode desconsiderar também a possibilidade de que a linhagem SLCyA tenha a base genética para síntese de MAAs em arranjo organizado, diferentemente do que foi observado na CCIBt3563. Ou ainda, que sua identificação taxonômica no gênero *Anabaenopsis* esteja equivocada. Infelizmente o genoma da SLCyA ainda não foi sequenciado ou ainda não foi publicamente disponibilizado, para que seu status taxonômico fosse confirmado ou o *cluster* biossintético de MAAs fosse anotado.

O meio BG-11 possui um espectro diverso de nutrientes e uma alta concentração de nitrogênio proveniente de duas fontes distintas, nitrato e amônio (Allen, 1968). Em contraste aos demais meios testados, o BG-11 é muito mais rico em N (aproximadamente 1,51 g/L) que o Z8 (0,52 g/L) e o ASM-1 (0,17 g/L), sendo o único dos três meios testados a conter amônio diretamente como um componente adicionado na formulação (citrato férrico de amônio, $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$). Shio e Nakamori (1970) estudaram a produção de treonina em bactérias, descrevendo que aspectos nutricionais do meio de cultura afetam a quantidade de treonina sintetizada. Eles associaram uma maior concentração de treonina à presença de amônio, a qual pode ser diretamente utilizado na via do ácido aspártico. As diferenças medidas neste estudo podem estar conectadas a um ambiente nutricional enriquecido, uma vez que P-334 é um composto obtido através da reação química que liga a micosporina-glicina (um intermediário de MAA compartilhado entre SHI, MGA e P-334) a treonina, um aminoácido comumente utilizado na biossíntese de proteínas (Rees, 1946). Para a SHI, as pequenas diferenças observadas no BG-11 podem estar simplesmente relacionadas a um ambiente mais nutritivo e saudável, melhorando o *fitness* celular em geral. Estudos adicionais são necessários para compreender os pormenores da biossíntese de shinorina. É possível que uma produção aumentada de serina (SHI é formada pela ligação da micosporina-glicina com a serina) seja um dos gatilhos para o aumento de sua concentração. O ambiente nutricional testado pode ter causado alterações no nível de MAAs mensurados, constituindo um fator relevante na busca de metabolitos alvo para ensaios biotecnológicos e seus respectivos substratos essenciais, uma área de estudo que carece de pesquisa aprofundada quando pensamos nos produtos naturais produzidos especificamente por cianobactérias.

Ao avaliar os resultados obtidos neste estudo, é necessário considerar que as linhagens usadas são monoculturas de muitas gerações crescendo em condições laboratoriais controladas de temperatura, luminosidade e disponibilidade elevada de nutrientes. Isto contrasta enormemente com as circunstâncias ambientais que impõem estresses bióticos e abióticos capazes de alterar a expressão gênica e a metabólica celular (Burford et al., 2020). Lakeman et al. (2009) descreve que condições de laboratório fixas gradualmente alteram traços naturais do fitoplâncton quando vistos na natureza, como a morfologia de filamentos e a capacidade de produzir toxinas. Nas devidas proporções, este efeito também pode estar ocorrendo na produção constitutiva de MAAs estimada nesta pesquisa. Para testar esta hipótese, estudos com foco em transcriptomas de amostras recém-isoladas do habitat de origem seriam necessários. Llewellyn et al. (2020a) identificaram uma regulação positiva no *cluster* gênico relacionado a MAAs no transcriptoma de *Chlorogloeopsis fritschii* PCC6912 como uma resposta a exposição à luz infravermelha, indicando que esta técnica pode ser uma ferramenta aliada nas pesquisas de cunho ecológico e biotecnológico.

Observando este capítulo, a hipótese de que o arranjo gênico relativo à síntese de MAAs está ligado a produção constitutiva detectável destes compostos em cianobactérias parece ter fundamento. Esta correlação foi observada especialmente nas linhagens *Nodularia spumigena* CENA596 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, ambas capazes de formar florações e provenientes de lagoas expostas diretamente a luz solar. As outras linhagens deste estudo que também apresentaram o arranjo dos genes de MAA organizados, *Brasilonema sennae* CENA114 e *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1, não apresentaram concentrações mensuráveis dos MAAs testados (apesar da presença de picos de palitina). Porém, ambas foram isoladas de biofilmes em habitats terrestres sombreados. As demais linhagens, originárias das lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, não possuem os genes relacionados a biossíntese de MAAs como *cluster* colinear em sintonia e não apresentaram produção constitutiva detectável das variantes que foram medidas. Os resultados discutidos neste capítulo demonstram que a produção de metabólitos fotoprotetores em cianobactérias engloba múltiplos fatores (ambiental, nutricional, evolutivo e genético) e requer pesquisas científicas adicionais, como o uso de estímulos físicos e/ou químicos para uma possível indução de níveis mensuráveis em espécies sem arranjo gênico organizado e um maior rendimento nas espécies com a presença do *cluster* de genes associados aos aminoácidos do tipo micospolina.

4. Produção de MAAs estimulada por radiação UV

Resumo

A produção de compostos fotoprotetores em cianobactérias pode ser estimulada através da exposição a fatores de estresse, tais como a composição e quantidade de luz, concentração de nitrogênio e salinidade e temperatura aumentadas. Contudo, ainda existe uma lacuna no conhecimento científico quando se estabelece uma relação entre as bases gênicas e a produção de metabólitos induzidos especificamente pela exposição a luz UV. Para avaliar isto, as linhagens deste estudo foram cultivadas com 72h de indução por UVA+UVB e seus extratos foram analisados em busca da produção de aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Adicionalmente, inferiu-se a concentração de carotenoides e a motilidade em meio sólido de todas as linhagens a fim de descrever estratégias complementares de foto proteção que podem ser empregadas pelas cianobactérias estudadas. Observou-se que somente as linhagens com agrupamentos gênicos organizados foram efetivamente estimuladas pela radiação UV, gerando mais subsídios para a importância da análise prévia de *clusters* gênicos quando se pretende buscar modelos biológicos para a produção biotecnológica de compostos alvo.

4.1. Introdução específica

Estudos biotecnológicos realizados para avaliar o crescimento celular e induzir a produção de moléculas alvo em microalgas e cianobactérias utilizam-se rotineiramente de estímulos físicos e químicos, testando desde o aumento ou a redução de temperatura e/ou salinidade e fontes distintas de nutrientes essenciais até a adição de concentrações estressantes de metais e intensidades luminosas variadas (Pade; Hagemann, 2014; Dextro et al., 2018; Silva et al., 2018; Nalley et al., 2018; Cassier-Chauvat et al., 2021; Dextro 2021).

Para organismos autotróficos, um dos pontos focais de estudos metabólicos gira em torno das enzimas, moléculas e estruturas relacionadas a fotossíntese (Stramski; Morel, 1990; MacIntyre et al., 2002). A qualidade e a intensidade da luz que chega às células são pontos importantes que afetam a biomassa gerada e os produtos naturais sintetizados em cultivos laboratoriais (Silaban et al., 2014; Khatoon et al., 2018). Neste âmbito, destaca-se o uso da radiação ultravioleta (RUV) e sua influência sob diferentes linhagens de cianobactérias como o objetivo principal de diversos pesquisadores nas últimas três décadas (Aráoz et al., 1998; Karsten et al., 1998; Castenholz; Garcia-Pichel, 2012; Rastogi et al., 2014; Chandra et al., 2020; Singh et al., 2020; Bairwa et al., 2021).

Para cianobactérias, descreve-se na literatura que a exposição à RUV induz a síntese de moléculas com funções protetoras, de aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) a antioxidantes e carotenoides (Wada et al., 2015; Boucar et al., 2021). Isto demonstra os mecanismos celulares herdados pelas cianobactérias, refletindo suas adaptações aos danos causados pelo UV. Como exemplo de prejuízo mediado por radiação, sabe-se que a porção específica da radiação solar com comprimento de onda entre 280 e 315 nm, conhecida como UVB, pode alterar a estrutura das proteínas, afetar a integridade do DNA e inativar inúmeras moléculas bioativas essenciais à sobrevivência celular (Karentz et al., 1991; Bothwell et al., 1994). Além de modular a síntese de pigmentos fotossintéticos e de MAAs, a ausência ou o excesso de luz parece ser capaz de estimular a motilidade das cianobactérias não-sésseis. O movimento orientado em resposta a estímulos luminosos conhecido como fototropismo vem sendo descrito em algumas linhagens, como a *Rivularia* sp. IAM M261 (Hirose; Katayama, 2021). Esta motilidade para fugir da luz danosa pode ser outro mecanismo de proteção UV empregado por cianobactérias através do deslizamento (Quesada; Vincent, 1997).

Independente da mobilidade, quando expostos a intensidades elevadas de UVA e UVB, microrganismos fotossintetizantes parecem ser induzidos a sintetizar MAAs em concentrações mais elevadas do que àquelas observadas em crescimento normal (Sinha et al., 2003; Shang et al., 2018). Em alguns casos, a presença de MAAs em cianobactérias só é identificada após a indução por UV (Geraldos et al., 2020). A regulação positiva da transcrição gênica e da atividade enzimática das moléculas envolvidas na via de biossíntese de MAAs e de parte da via do chiquimato podem ser estimuladas pela radiação UV (Shick et al., 1999), sendo que esta indução aparentemente ocorre de maneira significativa apenas no início desta rota metabólica, causando o acúmulo dos chamados MAAs primários, como shinorina, micosporina-glicina e porphyra-334 (Rosic; Dove, 2011). O processamento e conversão destas substâncias em MAAs secundários, tais como a palitina, não parecem ser afetados pelo aumento da exposição a RUV (Shick, 2004).

Desta forma, para investigar o efeito específico das frações UVA e UVB na síntese de aminoácidos do tipo micosporina nas linhagens de cianobactérias brasileiras utilizadas previamente neste trabalho, a produção de MAAs de cada uma delas após 72 h de exposição ao UV foi mensurada. Com os resultados obtidos nos capítulos anteriores, foi possível estabelecer uma relação entre a presença do agrupamento gênico de MAAs organizado em *cluster* com uma concentração constitutiva detectável de MAAs específicos. O passo seguinte nesta linha de raciocínio, e que fundamenta este capítulo, é observar o efeito da exposição à radiação UVA e UVB na produção estimulada de MAAs. As hipóteses aqui testadas foram as de que

(A) a radiação UV adicional não causará diferenças significativas em relação ao que foi observado no capítulo anterior para a produção constitutiva (contrariando o descrito na literatura); (B) a radiação UV adicional estimulará a produção de moléculas fotoprotetoras em todas as linhagens, independentemente de suas concentrações constitutivas anteriormente estimadas e de seus arranjos gênicos previamente descritos; (C) a radiação UV adicional estimulará diferencialmente as linhagens, de acordo com a organização de seus genes e suas produções constitutivas, induzindo maiores concentrações nas cianobactérias que já produziam MAAs mesmo sem exposição a UVA e UVB.

4.2. Materiais e Métodos

Indução de substâncias fotoprotetoras com UV

Foram utilizadas neste bioensaio todas as linhagens previamente testadas e que tiveram suas produções constitutivas de MAAs estimadas (*Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Pantanalinema rosanae* CENA516, *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Arthrospira platensis* CENA597, *Arthrospira platensis* CENA650, *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, *Nodularia spumigena* CENA596, *Brasilonema sennae* CENA114 e *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1). Todas cresceram em meio Z8 (Z8 modificado com adição de NaCl para a linhagem CCIBt3563 e Z8[0] sem nitrogênio para as linhagens CENA114 e UFV-OR1) sob as mesmas condições de cultivo utilizadas no capítulo anterior (temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, luz fluorescente de $40\text{-}50 \mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ciclo claro/escuro de 14/10h). O período experimental total foi o mesmo que o utilizado para estimar a produção constitutiva (42 dias para as linhagens do Pantanal, CENA596 e ITEP-024; 87 dias para ambas CENA114 e UFV-OR1) com a diferença de que os três últimos dias de crescimento contaram com um período de exposição à luz UVA e UVB (totalizando 72h de exposição) provenientes de duas lâmpadas TLK 40W 10R-UVA e duas lâmpadas TL 40W 12RS-UVB (Philips, Holanda), completando o período total de 45 dias de bioensaio (90 dias para as linhagens do gênero *Brasilonema*).

Uma vez que o vidro bloqueia a passagem de luz ultravioleta, os cultivos crescidos em Erlenmeyer foram transferidos para garrafas estéreis de cultura feitas de poliestireno virgem, opticamente claras, de 250 mL e com tampas ventiladas equipadas com filtros, livres de DNase e RNase (Kasvi, modelo KII-2250, Brasil). A fim de garantir que as garrafas utilizadas realmente permitiam a passagem de radiação UV, testou-se a

absorbância das mesmas em comparação à uma cubeta de poliestireno transparente (Figura 13), concluindo-se que o modelo de garrafas testado poderia ser utilizado neste experimento sem afetar os resultados obtidos.

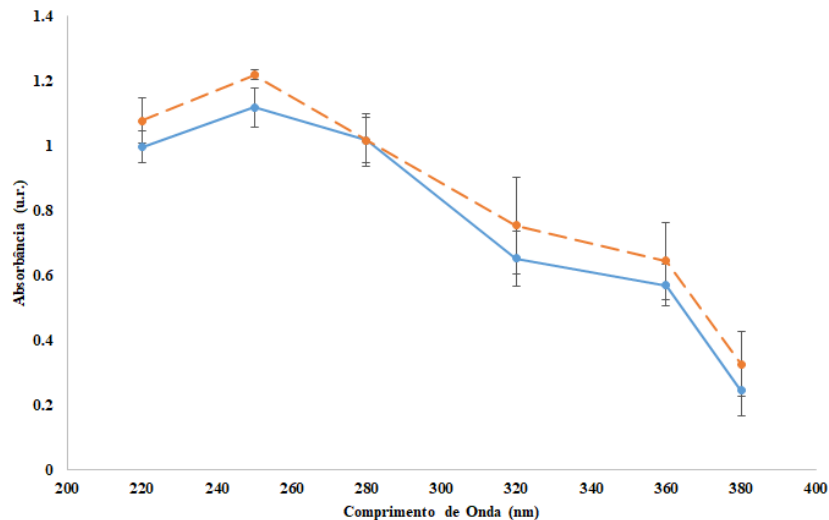


Figura 13. Teste de passagem de radiação UV nas garrafas modelo KII-2250 da Kasvi. Absorbância inferida nos comprimentos de onda que abrangem UVA e UVB em uma cubeta de poliestireno (linha azul contínua) e na amostra da garrafa KII-2250 (linha laranja descontínua) representando a média de cinco leituras em cada comprimento de onda com desvio padrão.

Após as 72h de exposição ao UV e completando o período experimental planejado, os cultivos foram processados do modo já descrito no capítulo anterior, através de centrifugação, congelamento e liofilização para então passarem pela extração ácida (subitem *Avaliação da produção constitutiva de MAAs em isolados cianobacterianos* do Materiais e Métodos do capítulo 2). Uma vez feita a extração, as amostras dos cultivos submetidos ao estímulo de RUV foram analisadas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, segundo as especificações descritas por Geraldês et al. (2020), também utilizadas na determinação da produção constitutiva. Por fim, a quantificação da produção de MAAs estimulada por UVA e UVB foi feita através das equações das retas extraídas dos dados de leitura dos padrões (Figura 14). Os padrões com concentrações conhecidas de MAAs disponíveis no período destas leituras correram no aparelho juntamente com as amostras e seus resultados permitiram calcular as concentrações destes compostos nas amostras. Para fins de comparação do efeito da exposição ao UVA e UVB, também se cultivaram réplicas de cada linhagem em luz fluorescente sem indução UV como dado de referência para a produção constitutiva obtida no mesmo período total de cultivo (45 dias).

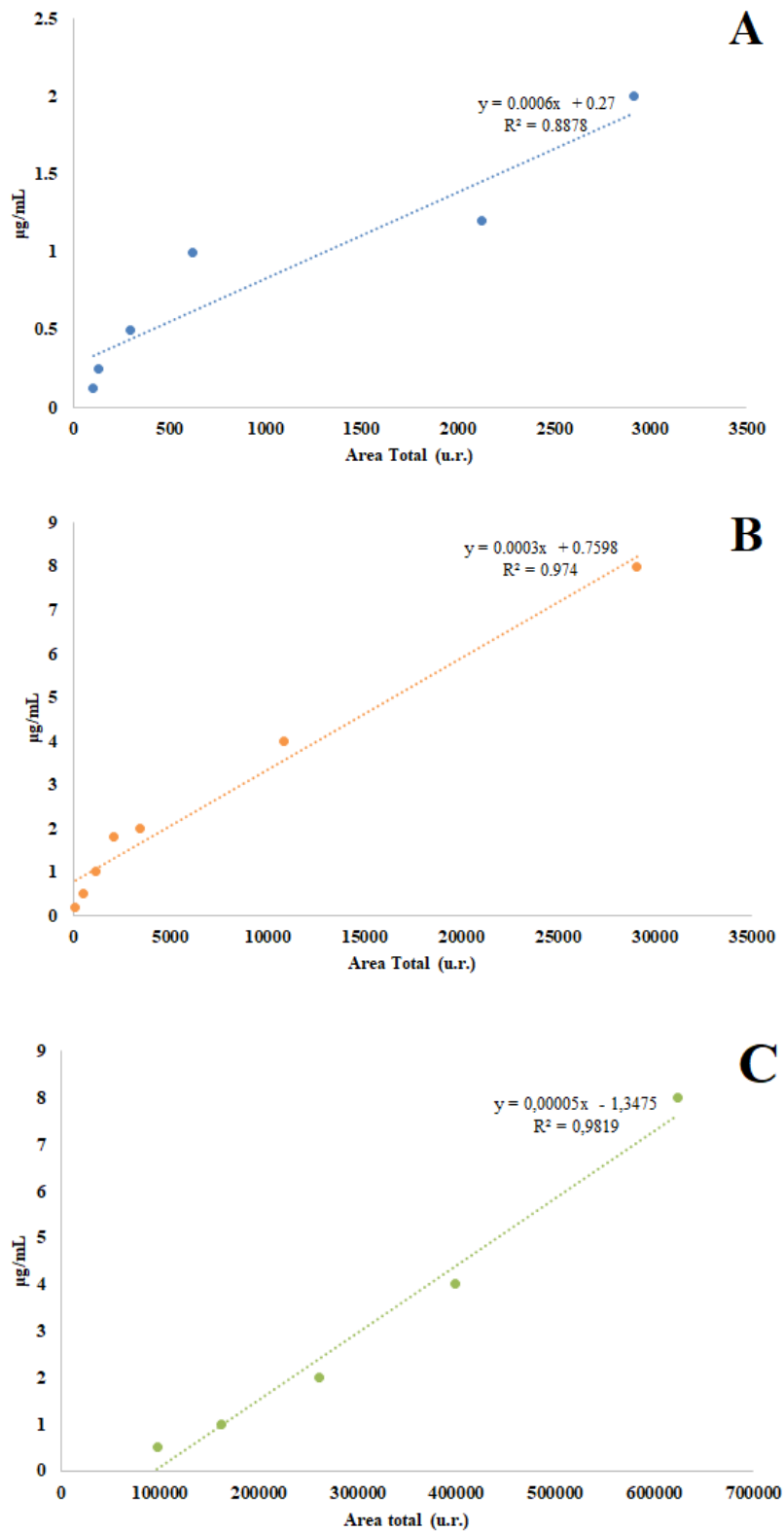


Figura 14. Curvas padrões para a shinorina (A), porphyrin-334 (B) e palitina (C) com as respectivas equações das retas usadas para estimar a produção estimulada por RUV dos extratos cianobacterianos.

Determinação da concentração de clorofila a e carotenoides com exposição UV

Adicionalmente, realizou-se uma análise de clorofila *a* e carotenoides totais para avaliar uma estratégia de foto proteção suplementar que pode estar sendo empregada pelas cianobactérias. Coletou-se 1 mL de cada linhagem (crescidas em triplicata, $n = 3$) no primeiro dia de cultivo, após 42 dias de crescimento e nas duas condições finais; com e sem exposição ao UV por 72h (completando o período final de 45 dias de experimento em ambas). Estas alíquotas foram filtradas em membrana de vidro de diâmetro 47 mm (GE Life Sciences, Estados Unidos) com uma bomba de vácuo. Os filtros foram armazenados em Eppendorfs âmbar, ideais para extrações sensíveis à luz, colocados em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração, como descrito por Strickland e Parson (1968). Os Eppendorfs foram então preenchidos com 1,1 mL de acetona 90% gelada, vortexados por 30s e armazenados sob refrigeração e no escuro por 24h. Depois deste período, os Eppendorfs foram centrifugados sob 3.000 rpm a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min e o sobrenadante foi utilizado nas leituras feitas em espectrofotômetro UV/VIS (Modelo Lambda Bio, Perkin Elmer, Alemanha) nos comprimentos de onda indicados por Kirk e Allen (1965), cujas equações abaixo transcritas foram usadas nos cálculos das concentrações de clorofila *a* e carotenoides totais.

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645}) \quad (1)$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = A_{480} + (0,114 \times A_{663}) - (0,638 \times A_{645}) \quad (2)$$

Rastreamento de outras micosporinas no espectro UV

A fim de determinar a ocorrência qualitativa de outros aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) que não foram contemplados nas análises quantitativas com os padrões disponíveis, realizou-se uma triagem nas amostras das cianobactérias após a extração ácida, tanto da biomassa crescida sob a exposição de UV quanto daquela apenas cultivada em luz fluorescente. Utilizou-se um espectrofotômetro SP-2000 UV da Bel Photonics (BioVera, Brasil) na amplitude de 310 a 360nm, que contempla o pico de absorbância de 25 diferentes MAAs conhecidos (Rastogi et al., 2020).

Avaliação de motilidade estimulada por luz (fototropismo)

Como experimento complementar, aferindo ainda outro mecanismo descrito na literatura como modulador da interação das cianobactérias com a luz, avaliou-se a capacidade de deslocamento das linhagens testadas induzida por luz fluorescente direcional em meio BG-11 sólido feito com ágar em placas de Petri estéreis de poliestireno (Figura 15). As cianobactérias foram inoculadas por esfregação em uma linha demarcada na extremidade da placa que ficou mais distante da fonte de luz (LED do interior da incubadora BOD). Uma montagem com papelão foi utilizada para garantir que a luz atingisse as placas em apenas uma direção (Figura 15B). O deslocamento de cada linhagem foi registrado em milímetros (mm) ao longo de 14 dias, permitindo mensurar a velocidade de deslocamento em mm/dia.

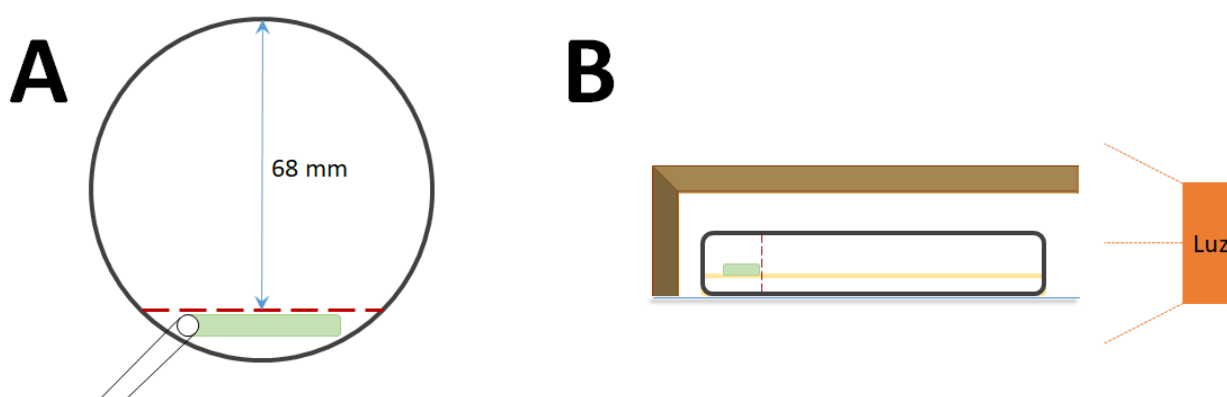


Figura 15. Avaliação de motilidade em meio sólido com luz direcional. (A) Aplicação da biomassa cianobacteriana na extremidade da placa de Petri anterior a linha que delimita 68 mm de distância da outra extremidade. (B) Posição da placa e das barreiras causando unidirecionalidade da fonte de luz.

4.3. Resultados

Os valores de shinorina e porphyrina-334 obtidos para a produção com e sem indução de UV por 72h foram calculados para cada linhagem testada (Tabela 4). Todas as cianobactérias isoladas do Pantanal (*Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Pantanalinema rosanae* CENA516, *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Arthrospira platensis* CENA597 e *Arthrospira platensis* CENA650) não apresentaram concentrações detectáveis dos MAAs avaliados. A linhagem *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1 teve $0,28 \pm 0,04 \mu\text{g}_{\text{Palitina}}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$. Somente em *Nodularia spumigena* CENA596 e *Sphaerospermopsis torques-reginae*

ITEP-024 foram obtidas concentrações mensuráveis de SHI e P-334, com sinais da presença de palitina em ambas expostas ao UV e somente em ITEP-024 houve pico de micospolina-glicina-alanina também com indução. A exposição à radiação UVA + UVB causou aumento estatisticamente significativo na concentração de porphyrina-334 tanto em *N. spumigena* (3,2 vezes mais) quanto em *S. torques-reginae* (7,6 vezes mais), sendo que para a linhagem ITEP-024 também houve acréscimo significativo nos valores de shinorina (2,3 vezes mais). Nota-se que somente as linhagens que possuem o arranjo gênico organizado apresentaram níveis detectáveis dos MAAs alvo mesmo após o estímulo por radiação ultravioleta A e B.

Tabela 4. Concentração de shinorina (SHI) e porphyrina-334 (P-334) detectadas nas cianobactérias de acordo com a condição de exposição ao UV. Os resultados são apresentados em $\mu\text{g}_{\text{MAAs}}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$. O (--) indica ausência de detecção do MAA. O (X) indica presença do MAA em níveis abaixo do limite inferior de detecção (para palitina e micospolina-glicina-alanina $< 0,01$). O (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as condições sem e com 72h de exposição ao UV por teste ANOVA ($p < 0.005$).

Linhagem	Condição	SH ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	P-334 ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Palitina	Mic-gli-ala
<i>Nodularia spumigena</i> CENA596	Sem UV	0,06 \pm 0,01	2,35 \pm 0,04*	--	--
	Pós 72h UV	0,07 \pm 0,01	7,66 \pm 0,45*	X	--
<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> ITEP-024	Sem UV	3,85 \pm 0,13*	0,23 \pm 0,06*	X	--
	Pós 72h UV	9,03 \pm 1,12*	1,69 \pm 0,13*	0,03 \pm 0,01	X
<i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-OR1	Sem UV	--	--	X	--
	Pós 72h UV	--	--	0,28 \pm 0,04	--
<i>Brasilonema sennae</i> CENA114	Sem UV	--	--	X	--
	Pós 72h UV	--	--	X	--
<i>Geminocystis</i> sp. CENA526	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--
<i>Anabaenopsis elenkini</i> CCIBt3563	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--
<i>Arthrospira platensis</i> CENA597	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--
<i>Arthrospira platensis</i> CENA650	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--
<i>Pantanalinema rosanae</i> CENA516	Sem UV	--	--	--	--
	Pós 72h UV	--	--	--	--

Os valores estimados de clorofila *a* e carotenoides totais no início e no fim do experimento demonstram que a exposição ao UV afeta diferentemente a síntese de pigmentos fotossintéticos de cada linhagem (Tabela 5). A maior parte das cianobactérias testadas apresentou redução de clorofila *a* e/ou carotenoides totais nas amostras expostas ao UV quando comparadas diretamente àquelas que, ao final de 45 dias, cresceram apenas em luz fluorescente (*N. spumigena* CENA596, *S. torques-reginae* ITEP-024, *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *P. rosanae* CENA516, *B. sennae* CENA114, *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650). Para as demais linhagens (CENA526, CENA528 e UFV-OR1), entretanto, a radiação UVA+UVB serviu de estímulo, causando um aumento nas concentrações de pigmentos, ainda que estatisticamente significativo para a clorofila *a* somente em UFV-OR1 e para carotenoides em CENA526.

Tabela 5. Concentrações de clorofila *a* e carotenoides totais calculadas nas cianobactérias de acordo com a condição de exposição ao UV, apresentados em mg/L. O (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as condições sem e com 72h de exposição ao UV por teste ANOVA ($p < 0.005$).

Linhagem	Pigmento	Dia 1	Dia 42	Dia 45 (sem UV)	Dia 45 (pós 72h UV)
CENA596	Clorofila <i>a</i>	1,31 ± 0,05	6,08 ± 0,03	6,80 ± 0,08*	3,25 ± 0,46*
	Carotenoides	0,09 ± 0,002	0,48 ± 0,02	0,56 ± 0,02*	0,22 ± 0,04*
ITEP-024	Clorofila <i>a</i>	1,74 ± 0,02	8,13 ± 0,02	7,77 ± 0,09*	4,51 ± 0,41*
	Carotenoides	0,10 ± 0,004	0,69 ± 0,01	0,71 ± 0,01*	0,30 ± 0,10*
UFV-OR1	Clorofila <i>a</i>	1,83 ± 0,04	7,50 ± 0,08	7,94 ± 0,15*	9,75 ± 0,67*
	Carotenoides	0,11 ± 0,002	0,46 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,52 ± 0,04
CENA114	Clorofila <i>a</i>	0,86 ± 0,02	7,62 ± 0,05	7,59 ± 0,03*	7,20 ± 0,02*
	Carotenoides	0,08 ± 0,003	0,42 ± 0,02	0,53 ± 0,09	0,52 ± 0,002
CENA526	Clorofila <i>a</i>	2,43 ± 0,05	6,17 ± 0,04	6,15 ± 0,25	6,48 ± 0,29
	Carotenoides	0,10 ± 0,008	0,41 ± 0,02	0,52 ± 0,02*	0,70 ± 0,03*
CENA528	Clorofila <i>a</i>	2,47 ± 0,01	8,74 ± 0,09	9,52 ± 0,11	9,78 ± 0,18
	Carotenoides	0,12 ± 0,005	0,33 ± 0,05	0,79 ± 0,08	0,85 ± 0,07
CCIBt3563	Clorofila <i>a</i>	1,60 ± 0,02	6,35 ± 0,03	6,25 ± 0,02*	4,69 ± 0,06*
	Carotenoides	0,05 ± 0,009	0,33 ± 0,05	0,79 ± 0,08	0,71 ± 0,06
CENA597	Clorofila <i>a</i>	1,46 ± 0,08	5,26 ± 0,07	5,49 ± 0,05*	4,17 ± 0,20*
	Carotenoides	0,11 ± 0,006	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,02*	0,28 ± 0,04*
CENA650	Clorofila <i>a</i>	2,48 ± 0,08	5,43 ± 0,05	5,11 ± 0,13*	4,67 ± 0,08*
	Carotenoides	0,19 ± 0,002	0,48 ± 0,08	0,42 ± 0,04*	0,35 ± 0,01*
CENA516	Clorofila <i>a</i>	2,30 ± 0,04	8,16 ± 0,08	8,54 ± 0,11*	7,67 ± 0,09*
	Carotenoides	0,10 ± 0,003	0,39 ± 0,04	0,86 ± 0,06	0,72 ± 0,08

Em relação à triagem dos extratos cianobacterianos nos comprimentos de onda de ação das micosporinas, observa-se que as linhagens sem o arranjo gênico identificado não apresentaram outros picos que pudessem indicar a presença de micosporina que não foram avaliadas nas análises de HPLC, nem mesmo sob estímulo UVA+UVB (Figura 16). Ambas as linhagens do gênero *Brasilonema* tiveram picos entre 310 e 325 nm, possivelmente relacionados a palitina, enquanto a ITEP-024 e a *Nodularia* apresentaram picos em torno de 330-335 nm, típicos de shinorina e porphyra-334.

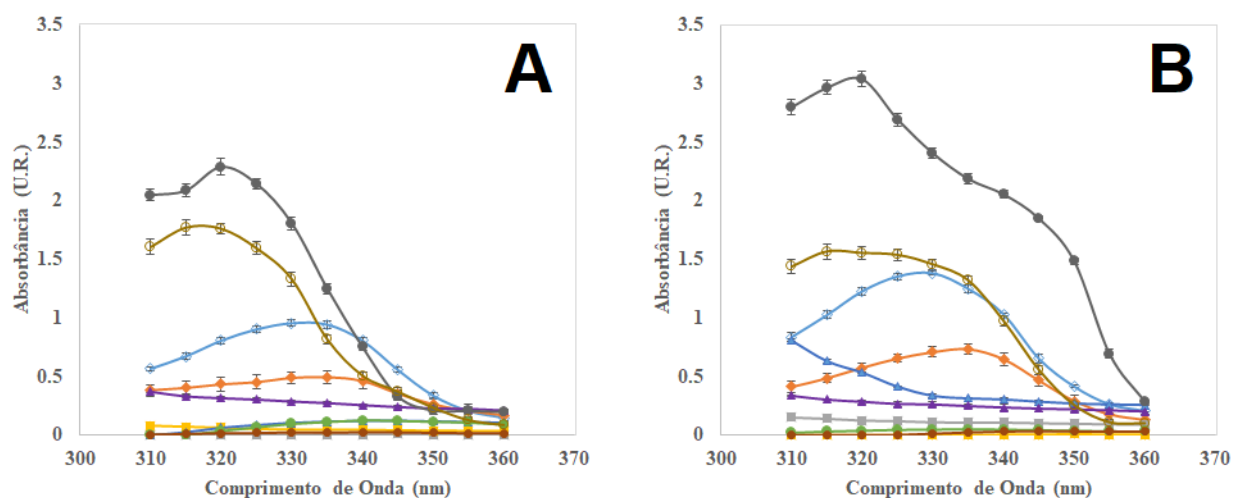


Figura 16. Absorbância aferida nos comprimentos de onda entre 310 à 360 nm nos extratos cultivados em luz fluorescente (A) e com o estímulo UV (B). Legenda das linhagens: ● UFV-OR1; ○ CENA114; ◇ ITEP-024; ◆ CENA596; ● CENA516; ● CCIBt3563; ■ CENA597; ■ CENA650; ▲ CENA526; ▲ CENA528.

Por fim, avaliando o deslocamento total de cada linhagem após 14 dias, nota-se que algumas apresentaram fototropismo positivo, deslocando-se de maneira mais efetiva em direção à luz (Figura 17). A única linhagem não filamentosa testada, a *Geminocystis* sp. CENA526, cresceu apenas no local da inoculação, como esperado. Dentre as filamentosas, destacam-se *Arthrospira platensis* CENA650, *Pantanalinema rosanae* CENA516 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 como as linhagens que tiveram maior capacidade de deslocamento (todas com velocidade superior a 3 mm/dia) e, aparentemente, foram mais responsivas à luz.

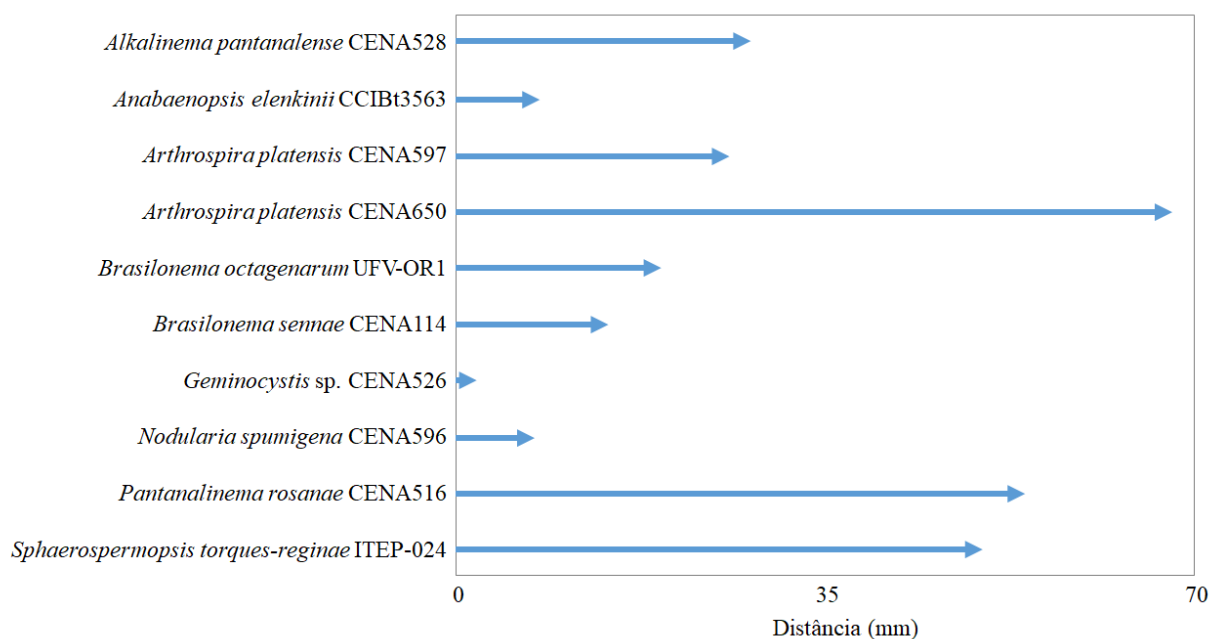


Figura 17. Distância percorrida (em mm) por cada linhagem após 14 dias de exposição a luz fluorescente unidirecional.

4.4. Discussão

A principal estratégia fotoprotetora de cianobactérias descrita na literatura é a síntese de metabólitos especializados como aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) e escitonemina (Bandaranayake, 1998; Conde et al., 2000; Karentz, 2001; Balskus; Walsh, 2010; Carreto; Carignan, 2011; Castenholz; Garcia-Pichel, 2012; Hartmann et al., 2015; Lawrence et al., 2018; Geraldles et al., 2019; Bairwa et al., 2021; Boucar et al., 2021). Sob exposição direta à radiação ultravioleta A e B, estes microrganismos utilizam estas moléculas de elevado coeficiente de extinção molar para absorver parte dos fótons mais energéticos incidentes, reduzindo os danos celulares causados pela RUV (Wada et al., 2013). Embora a descrição dos MAAs aponte para bases genéticas conservadas que virtualmente permitiriam a síntese destes compostos por todo o filo Cyanobacteria (Balskus; Walsh, 2010; Garcia-Pichel et al., 2019), o estudo focal da diversidade de linhagens tem demonstrado aptidões distintas para esta via de síntese que parece estar relacionada ao arranjo gênico de cada linhagem (Dextro et al., 2023a). Além disso, diferentes famílias de cianobactérias parecem ser capazes de acionar estratégias alternativas de sobrevivência à radiação que envolvem evasão por mobilidade (Quesada; Vicent, 1997), alteração do padrão de síntese de pigmentos fotossintetizantes (Demay et al., 2019) e produção aumentada de enzimas antioxidantes (Castenholz; Garcia-Pichel, 2012).

Observando o padrão encontrado neste estudo, a hipótese inicial que melhor explica os dados é a de que a radiação UV estimula de maneira distinta cada linhagem, sendo que a organização gênica referente ao agrupamento de biossíntese dos MAAs e as produções constitutivas (sem estímulo) são dados preliminares importantes na predição da estratégia de sobrevivência de cada cianobactéria sob exposição UVA e UVB. Conforme analisado, as linhagens originárias do Pantanal brasileiro não apresentaram concentrações detectáveis dos MAAs específicos shinorina, porphyra-334, palitina ou micosporina-glicina-alanina mesmo após 72h de exposição ao UV e não possuem picos que possam indicar a presença de outros MAAs ou compostos que absorvam UV na faixa de 310 a 360nm. Embora provenientes de um habitat associado à intensa exposição à luz solar, esta pode não ser sua estratégia central de foto proteção. Resultados similares, relatando a ausência de detecção de MAAs após exposição UV já foram descritos na literatura para muitos gêneros de cianobactérias pertencentes a múltiplas ordens, tais como *Scytonema* e *Chlorogloeopsis* (Nostocales), *Rhabdoderma* e *Leptolyngbya* (Synechococcales), *Desertifilum* (Oscillatoriales) e *Cyanosarcina* (Chroococcales) (Hartmann et al., 2015; Geraldles et al., 2020b). Para as demais ordens deste filo (Chroococciopsidales, Pleurocapsales, Spirulinales e Gloeobacterales) faltam dados tanto do potencial de produção constitutiva quanto sob estímulo de radiação UV (Jain et al., 2017).

De um ponto de vista ecológico, apesar de não produzirem isoladamente MAAs, as linhagens do Pantanal podem estar se beneficiando de suas capacidades protetoras. Esse é o caso de diversos organismos não-produtores, como a lebre-do-mar *Aplysia californica* (Kicklighter et al., 2011). Apesar de não produzir MAAs, ao menos 3 formas de palitina já foram detectadas em sua tinta, provenientes de sua dieta rica em algas. Algo similar poderia estar acontecendo nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal no nível de comunidade.

Analisando microalgas e cianobactérias de fontes termais do Mar Morto, Oren et al. (2008) relataram concentrações muito baixas ou inexistentes de MAAs e escitonemina em diversos pontos de coleta. Em suas análises, foram descritas cianobactérias filamentosas (*Phormidium*, *Scytonema*, *Oscillatoria* e *Spirulina*) e unicelulares (*Merismopedia* e *Chroococcus*) com características termófilas (crescendo em elevadas temperaturas) e halofílicas (crescendo em alta concentração de sais). Mesmo em experimentos de exposição direta à radiação solar (placas de Petri abertas por 10h expostas ao sol das 7:00h às 17:00h), os extratos cianobacterianos não foram induzidos a produzir compostos com capacidade de absorver UV. Para os autores, quando as cianobactérias sobrevivem em condições ambientais extremas, não há retorno metabólico (*pay off*) na produção de MAAs e escitoneminas, especialmente nos períodos de pico de atividade metabólica

fotossintética. Seguindo este mesmo raciocínio, para as linhagens do Pantanal brasileiro, que crescem em concentrações muito elevadas de salinidade (variando entre 0,4 e 2,4 g/L), alcalinidade e pH (>9,5) (Pellegrinetti et al., 2022) também pode não haver retorno fisiológico viável para o investimento energético da construção de moléculas especializadas na proteção UV.

Adicionalmente, foi detectada a alteração da produção de clorofila *a* e carotenoides totais em todas as linhagens do Pantanal. A redução da produção, observada em *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Pantanalinema rosanae* CENA516, *Arthrospira platensis* CENA597 e *A. platensis* CENA650 pode ter sido causada por foto branqueamento e foto inibição, reforçando a ausência de substâncias protetoras contra UV e a redução do metabolismo mediada pela radiação (Garcia-Pichel et al., 1993). Para CENA516 e CENA650, entretanto, a avaliação de motilidade associada a estímulos luminosos pode indicar uma estratégia de evasão de luz mediada pelo fototropismo. Apesar de serem espécies planctônicas, ambas têm capacidade de formar tapetes bentônicos através de sua mucilagem e que são encontrados especialmente nas épocas de seca do Pantanal, quando as lagoas em que estas cianobactérias vivem se reduzem a poucos centímetros de coluna d'água. Neste cenário extremo de maior exposição à radiação solar, mover-se em direção ao substrato nos períodos críticos de radiação ao longo do dia seria uma estratégia plausível de sobrevivência. Especificamente para *A. elenkinii* CCIBt3563, a presença de aerótopos é uma estratégia de fuga da exposição à radiação UV que permite a migração vertical na coluna d'água (Santos et al., 2018), e que não se reflete em mobilidade em substratos sólidos como testado, uma vez que se baseia em flutuabilidade.

Para as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526 e *Alkalinema pantanalense* CENA528, a expressão aumentada de carotenoides pode representar uma estratégia de foto proteção. Schagerl e Muller (2006) descreveram a aclimatação de quatro diferentes cianobactérias ao aumento da intensidade luminosa (de 15 para 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), obtendo incrementos estatisticamente significativos em carotenoides para todas elas. Das linhagens exploradas pelos pesquisadores, somente *Anabaena torulosa* ASW01023 apresentou uma concentração de carotenoides estimulada pela luz superior aos valores estimados neste trabalho (1,0 mg/L).

Na triagem da absorbância na faixa de 310 a 360nm, nota-se que o extrato de CENA526 exposto ao UV apresentou um pico anterior a 310nm que pode representar a presença do carotenoide do tipo tetraterpeno chamado fitoeno, que já foi descrito em cianobactérias e possui absorbância máxima em 286nm (Tsuchiya et al., 2005; Liang et al., 2006; Meléndez-Martínez et al., 2019). As chances da linhagem *Geminocystis* sp. CENA526 produzir fitoeno

dentre seus carotenoides totais mensurados é considerável, ainda mais ponderando que a fitoeno desaturase é uma das mais importantes enzimas utilizadas na biossíntese de carotenoides em cianobactérias, sendo compartilhada também com plantas e microalgas (Liang et al., 2006). Um recente estudo avaliando o terpenoma da *Geminocystis* sp. CENA526 contribuiu com dados que reforçam a ideia de que esta linhagem produz uma gama diversa de carotenoides, incluindo a identificação do gene fitoeno sintase (*crtB*) em seu genoma. Os carotenoides são tetraterpenos que podem atuar em diversas funções celulares, sendo a foto proteção apenas uma delas (Machado, 2022).

Em relação às linhagens do gênero *Brasilonema* estudadas, houve detecção de picos de palitina com e sem exposição UV (tanto nas análises qualitativas quanto nas quantitativas). Estas linhagens apresentam um *cluster* gênico organizado que se diferencia do tradicional *mysABCD* descrito para outras linhagens, sendo recentemente proposto como ideal para a produção de palitinas (Chen et al., 2021) e possuem um hábito de crescimento em tufo de filamentos fixos que se desenvolvem aderidos a um substrato. Sua mobilidade foi baixa no período avaliado (14 dias), sem necessariamente apresentar uma correlação positiva de fototropismo (movimento estimulado pela luz). Em relação aos pigmentos medidos, ambas mantiveram taxas muito semelhantes de síntese de carotenoides totais com e sem estímulo de UVA+UVB, porém houve aumento na concentração de clorofila *a* em *Brasilonema octagenarum* UFV-OR1 e uma redução desta em *Brasilonema sennae* CENA114. Quesada e Vincent (1997) descreveram diferentes sensibilidades de duas linhagens de cianobactérias (*Phormidium murrayi* e *Oscillatoria priestleyi*) expostas a 96h de UVB. Enquanto *P. murrayi* se mostrou resistente, *O. priestleyi* apresentou quedas consideráveis nas concentrações tanto de clorofila *a* quanto de carotenoides. He et al. (2002) descrevem a redução de clorofila em algumas cianobactérias expostas a UVB como uma possível estratégia de sobrevivência que reduz o foto branqueamento celular e os danos diretos causados pela radiação ultravioleta. De qualquer modo, tanto a linhagem UFV-OR1 quanto CENA114 parecem dotadas de um arsenal complementar de estratégias de foto proteção. É importante ainda ressaltar que, em seus habitats de origem, ambas crescem em locais sombreados, recebendo toda a luz fotossinteticamente ativa que necessitam para sobreviver sem sofrer exposição solar direta.

Finalmente, para *Nodularia spumigena* CENA596 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 o perfil de estratégias de foto proteção detectados com os resultados produzidos foi distinto. Enquanto a CENA596 apresentou baixo estímulo de motilidade à luz e produção induzida majoritariamente de porphyra-334, a ITEP-024

mostrou-se altamente móvel, deslocando-se por mais de 40mm em direção a luz, e produzindo sob estímulo UVA+UVB concentrações aumentadas de shinorina, porphyra-334 e palitina, além do pico detectado de micosporina-glicina-alanina. Com uma gama tão diversa de MAAs e capacidade motora considerável, entende-se que a redução observada nos carotenoides totais e clorofila *a* na ITEP-024 (de 58% e 42%, respectivamente) após 72h de exposição à radiação UVA+UVB foi ocasionada por um redirecionamento metabólico, onde a sobrevivência diante da exposição ao UV priorizou a síntese de MAAs e possivelmente outros compostos antioxidantes em detrimento dos pigmentos fotossintéticos. Este mesmo raciocínio pode explicar a queda de 61% em carotenoides totais e 53% em clorofila *a* medidas na linhagem CENA596, cuja estratégia prioritária de proteção parece ser a síntese de porphyra-334, MAA que protege de maneira eficaz apenas a radiação no comprimento de onda 334 nm, cobrindo de forma mais efetiva a parcela UVA da radiação ultravioleta. Foto inibição em uma cianobactéria produtora de um arcabouço específico de MAAs também foi reportado por Garcia-Pichel et al. (1993) em *Gloeocapsa* sp. O perfil de absorção do extrato desta linhagem mostrou apenas um pico de absorção em 326 nm, o que expõem esta linhagem a danos mediados tanto pelo UVB (280 a 315 nm) quanto a porção distal do UVA (em torno de 400 nm). Além do branqueamento celular (redução da síntese de clorofila), a radiação UVB parece ser capaz de afetar a carotenogênese em cianobactérias, causando a redução de diferentes carotenoides intracelulares (no citoplasma ou no interior dos tilacóides) que atuam como importantes agentes foto protetores, dissipadores de calor e antioxidantes, com capacidade quelante para espécies reativas de oxigênio (Quesada; Vincent, 1997; Llewellyn et al., 2020b).

Baseado na interpretação conjunta dos dados produzidos neste capítulo somados àqueles discutidos nos capítulos anteriores, podemos concluir que as cianobactérias são capazes de utilizar diferentes mecanismos de proteção contra o dano mediado pela luz e pela radiação UV. Estas estratégias parecem estar ligadas tanto à estrutura gênica (e, por conseguinte, à história evolutiva de cada linhagem) quanto às adaptações ecológicas ao longo do tempo aos seus habitats de ocorrência que deixam sinais observáveis nos genomas. Em condições de cultivo laboratorial e nos bioensaios de estímulo por exposição a UV, cada linhagem apresentou um padrão de comportamento próprio, ressaltando a relevância em se avaliar e descrever cada vez mais a diversidade cianobacteriana global, a fim de se encontrar linhagens que tenham aptidão inata para produzir metabólitos especializados com interesse biotecnológico em níveis elevados, como encontrado em *Nodularia spumigena* CENA596 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. Uma vez descritas, estas linhagens permitem o avanço de estudos bioquímicos baseados em metodologias de expressão heteróloga para avaliação de sua

viabilidade econômica e logística em aplicações industriais. As linhagens do Pantanal, organismos de interesse inicial deste estudo, provaram-se muito bem adaptadas ao seu habitat de origem sem a necessidade ou capacidade de produzir substâncias fotoprotetoras, que são o foco central deste trabalho.

5. Investigação da estrutura e função do gene *mysD* da via biossintética de MAAs em cianobactérias

Resumo

A fim de conhecer mais a fundo uma das arquiteturas gênicas associadas à produção de aminoácidos do tipo micosporina em cianobactérias, o último gene do *cluster* formado por *mysABCD* foi estudado em detalhes quanto à sua estrutura e função bioquímica. A compreensão de cada etapa de uma via biossintética permite sua replicação eficiente em laboratório e comparação através de diferentes modelos biológicos, anotando variações que modifiquem o uso de substratos e a necessidade de cofatores para a síntese bem-sucedida de um metabólito especializado. Para isso, foram localizados todos os *clusters* contendo o gene *mysD* nas montagens de genomas cianobacterianos disponíveis no NCBI. A sequência de aminoácidos do produto de tradução de cada gene *mysD*, bem como suas estruturas terciárias, foram avaliadas através de todo o filo e comparadas com as cópias do mesmo gene proveniente de outras bactérias e macroalga. Através de uma filogenia deste gene, de seu alinhamento e de uma análise das estruturas proteicas de seu produto utilizando o *AlphaFold*, foi possível aferir que o gene *mysD* do *cluster* cianobacteriano não deveria ser nomeado como transcrevendo a enzima D-Alanina-D-Alanina ligase, uma vez que esta desempenha uma função bioquímica distinta daquela prevista para a biossíntese de MAAs. A nova nomenclatura “micosporina-glicina-amina ligase” é sugerida a fim de harmonizar os estudos focados em micosporinas.

5.1. Introdução específica

Quando os estudos bioquímicos para descrição de vias metabólicas agregaram dados genéticos, ficou evidente que algumas rotas biossintéticas são expressas através de genes agregados linearmente nos genomas, também conhecidos como *clusters* gênicos (Lawrence, 1999). A principal vantagem evolutiva relacionada a estes agrupamentos organizados é a expressão otimizada dos genes através de promotores próprios, acelerando a síntese dos compostos do metabolismo secundário que beneficiam os organismos produtores, como moléculas de resistência ou de interação biológica (Polturak; Osbourn, 2021). Seja em plantas ou microrganismos, a presença destes *clusters* facilitou a descrição de vias metabólicas uma vez que as enzimas necessárias para a síntese do produto final não estão caoticamente dispersas no genoma, constituindo um verdadeiro mapa bioquímico cujas peças principais já são conhecidas (Osbourn, 2010).

A expressão heteróloga se tornou a principal aliada metodológica da descrição de vias metabólicas, permitindo a clara observação da função de cada gene e sua respectiva enzima na construção de biomoléculas de interesse (Wenzel; Müller, 2005). Esta estratégia *in vitro* ainda permite analisar se existem cofatores essenciais para uma produção otimizada, quais as interações proteicas dentre as enzimas da via e se há especificidade de substratos.

Especificamente na via de biossíntese de aminoácidos do tipo micoporina, desde os primeiros estudos observou-se a correlação entre a organização gênica e as enzimas necessárias para alcançar as moléculas bioativas (Garcia-Pichel et al., 1993). Nos experimentos com o *clusters* composto por *mysABCE* encontrado em *Anabaena variabilis* ATCC29413 (Balskus; Walsh, 2010), a ferramenta de expressão heteróloga demonstrou que os dois primeiros genes, quando expressos em *Escherichia coli*, resultam na formação de 4-deoxigadusol, molécula que serve como núcleo principal para as micoporinas, sendo o alvo das imino ligações (entre uma amina primária e uma cetona) de diferentes aminoácidos que resultam na grande diversidade de MAAs descritas até hoje. A expressão do *cluster* completo resultou na formação de shinorina, enquanto que os três primeiros genes produziram apenas o intermediário micoporina-glicina. As mesmas observações foram feitas utilizando o agrupamento gênico presente em *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (Gao; Garcia-Pichel, 2011b). A expressão heteróloga de *mysABC* produziu micoporina-glicina e a adição do quarto gene *mysD*, que difere daquele presente no *cluster* presente na *Anabaena*, levou à detecção de shinorina (majoritária), porphyra-334 e micoporina-2-glicina (minoritárias).

Desde sua descrição como parte desta rota metabólica, o gene *mysD* tem causado controvérsia por não apresentar afinidade específica a um único substrato, utilizando promiscuamente diversos aminoácidos em diferentes organismos estudados (Gao; Garcia-Pichel, 2011b; Miyamoto et al., 2014; Chen et al., 2021). Apesar da capacidade em ligar aminoácidos distintos, a enzima expressa por *mysD* parece apresentar substratos preferenciais, o que modifica a concentração final de MAAs produzidos. Uma hipótese alternativa para explicar os MAAs sintetizados pelos *clusters* contendo *mysD* seria que os produtos finais observados são um artefato da disponibilidade de aminoácidos no *pool* intracelular no momento de biossíntese ao invés de uma especificidade de substrato relaxada desta enzima.

De qualquer modo, nota-se na literatura corrente o uso indiscriminado da nomenclatura “D-Alanina-D-Alanina ligase” para descrever a enzima expressa pelo gene *mysD*. Contudo, baseado no grande volume de dados que descrevem sua função metabólica e seguindo as regras internacionais de nomenclatura da enzimologia (Thompson, 1962), esta terminologia está equivocada e gera confusão. Este quadro se agrava pelo fato de que existem genes (*murF* e *ddl*)

que possuem similaridade estrutural (sequência de nucleotídeos) em relação ao *mysD*, mas que expressam enzimas distintas, sendo uma delas corretamente identificada como D-Alanina-D-Alanina ligase. Este é o caso do gene *ddl*, da via biossintética de peptidoglicanos (Walsh, 1989), cuja nomenclatura está fundamentada na ideia de que o nome da enzima expressa por um gene deve representar os substratos envolvidos na reação catalisada (*ddl* liga duas moléculas de D-Alanina) e o seu tipo, no caso uma ligase, que envolve uma catalise unindo duas moléculas a partir da quebra da ligação difosfato do ATP (Tipton; Boyce, 2000). Assim, para resolver a nomenclatura da enzima expressa pelo gene *mysD*, este capítulo tem como foco central a comparação de sua estrutura proteica terciária com as das enzimas expressas por *ddl* e *murF*, além de explorar as relações filogenéticas do gene *mysD* no filo Cyanobacteria. A nova nomenclatura proposta para a enzima do gene *mysD* (micosporina-glicina-amina ligase) tem como função padronizar conforme as regras da enzimologia a maneira como uma importante enzima desta via é descrita, evitando confusões que atrapalham a comunicação científica (Dextro et al., 2023b).

5.2. Materiais e Métodos

Filogenia do gene mysD

Os arquivos contendo as regiões codificantes de proteínas (CDS) de todas as montagens de genomas cianobacterianos disponíveis no GenBank e no RefSeq foram avaliados a fim de identificar as linhagens que continham *clusters* gênicos colineares em sintenia referentes aos genes de biossíntese dos aminoácidos do tipo micosporina (MAAs). Dentre estas, aquelas que possuíam o gene *mysD* em seu arranjo foram salvas e suas sequências permitiram a montagem de um único arquivo na extensão FASTA. Genes parciais ou repetidos foram manualmente eliminados a fim de reduzir a presença de falsos negativos. Nesta listagem foram acrescentadas algumas bactérias que possuem cópias do gene *mysD* e o gene da macroalga *Porphyra umbilicalis*, descrita como produtora de MAAs (Gröniger et al., 1999), com o intuito de investigar uma possível ancestralidade em comum.

O arquivo FASTA final foi usado na construção da árvore filogenética de máxima verossimilhança das sequências de aminoácidos do produto do gene *mysD* de linhagens representativas do filo cianobactéria através do *software* MEGA11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), após seu alinhamento e utilizando os parâmetros predefinidos do sistema (Tamura et al., 2021). Nesta análise, a fim de inferir a história evolutiva das sequências,

utilizou-se o modelo de substituição de Jones-Taylor-Thornton (JTT) que leva em conta matrizes com taxas diferenciais de substituição de aminoácidos em proteínas (Jones et al., 1992). Mil etapas de replicação do *bootstrap* foram usadas para analisar a robustez da árvore filogenética produzida. A fim de explorar a ancestralidade de *mysD*, outros genes envolvidos em vias sintéticas com funções similares (*ddl*, *rimK* e *gshB*) foram adicionados à análise.

Estrutura terciária da enzima proveniente do gene mysD

A fim de analisar a estrutura terciária do produto de tradução do gene *mysD*, suas sequências de aminoácidos foram analisadas na plataforma *AlphaFold* (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022), que possui um extenso banco de dados de estruturas proteicas usados na predição de alvos desconhecidos. Foram selecionadas para esta avaliação as proteínas referentes aos genes de 20 linhagens que, segundo os dados filogenéticos, representam os principais clados formados. Suas estruturas foram comparadas em relação a localização e quantidade de α hélices e folhas β , bem como a predição das funções moleculares, os sítios de ligação de substrato e os domínios proteicos preditos através do *InterPro* (Paysan-Lafosse et al., 2022).

Análise comparativa das enzimas provenientes dos genes mysD, murF e ddl

Durante a busca do gene-alvo nos genomas cianobacterianos, foram encontrados três genes associados ao termo “D-Ala-D-Ala ligase” nestas predições automáticas, sendo eles o gene *mysD* da rota de biossíntese dos MAAs e os genes *ddl* e *murF*, ambos atuantes na via de produção de peptidoglicanos. Para explorar suas similaridades e diferenças estruturais e funcionais, as proteínas advindas destes genes foram avaliadas em relação à sua identidade quando alinhadas através do *ClustalW* (Hung et al., 2015), similaridade e cobertura usando o *BLAST 2.8.1+* (Boratyn et al., 2013) e através de suas estruturas terciárias preditas com o *AlphaFold*.

5.3. Resultados

Na busca pelo *cluster* gênico colinear em sintenia referente à biossíntese de MAAs, foram avaliadas 1568 montagens genômicas de cianobactérias, pertencentes a 10 ordens (Figura 18) e com diferentes níveis de qualidade e completude. Nos genomas de maior qualidade, com poucos *scaffolds*, a identificação dos genes foi mais eficiente. Destaca-se desta busca que mais

de 85% de todas as montagens de genomas cianobacterianos disponíveis no NCBI pertencem a apenas 3 ordens, Synechococcales, Nostocales e Oscillatoriales.

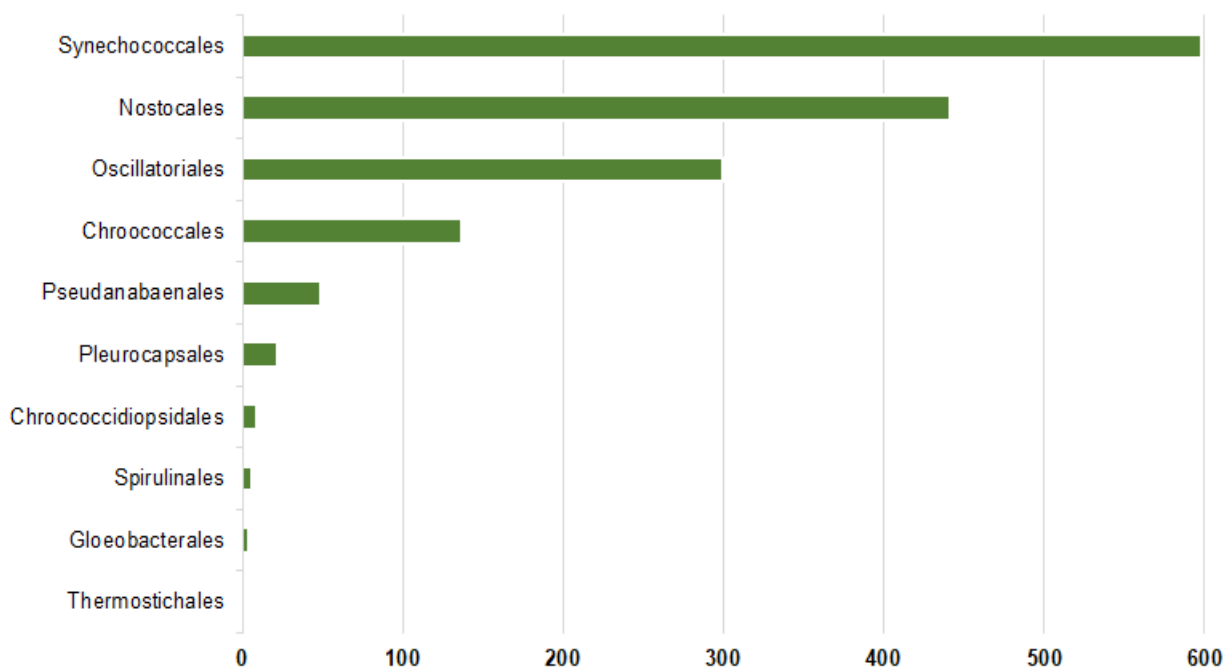


Figura 18. Quantidade de montagens genômicas disponíveis no NCBI que foram avaliadas por ordem cianobacteriana.

Em posse das montagens genômicas, foi identificada a presença do *cluster* contendo os genes da via de síntese de MAAs em 480 genomas pertencentes a 6 ordens distintas (Figura 19A). A ordem Nostocales sozinha representa 58% dos *clusters* anotados, sendo o gênero *Nostoc* o que mais possui estes genes alinhados e agrupados em seus genomas, encontrado em 79 montagens. Foram identificadas ao menos 10 diferentes configurações para este *cluster*, sendo comum a todos apenas a presença dos genes *mysAB*. Sendo o foco do estudo, foram destacados os *clusters* contendo o gene *mysD* em sua composição (Figura 19B), encontrados em 4 ordens e representando 57,4% de todos os *clusters* referentes a biossíntese de MAAs dos genomas de cianobactérias disponíveis no NCBI.

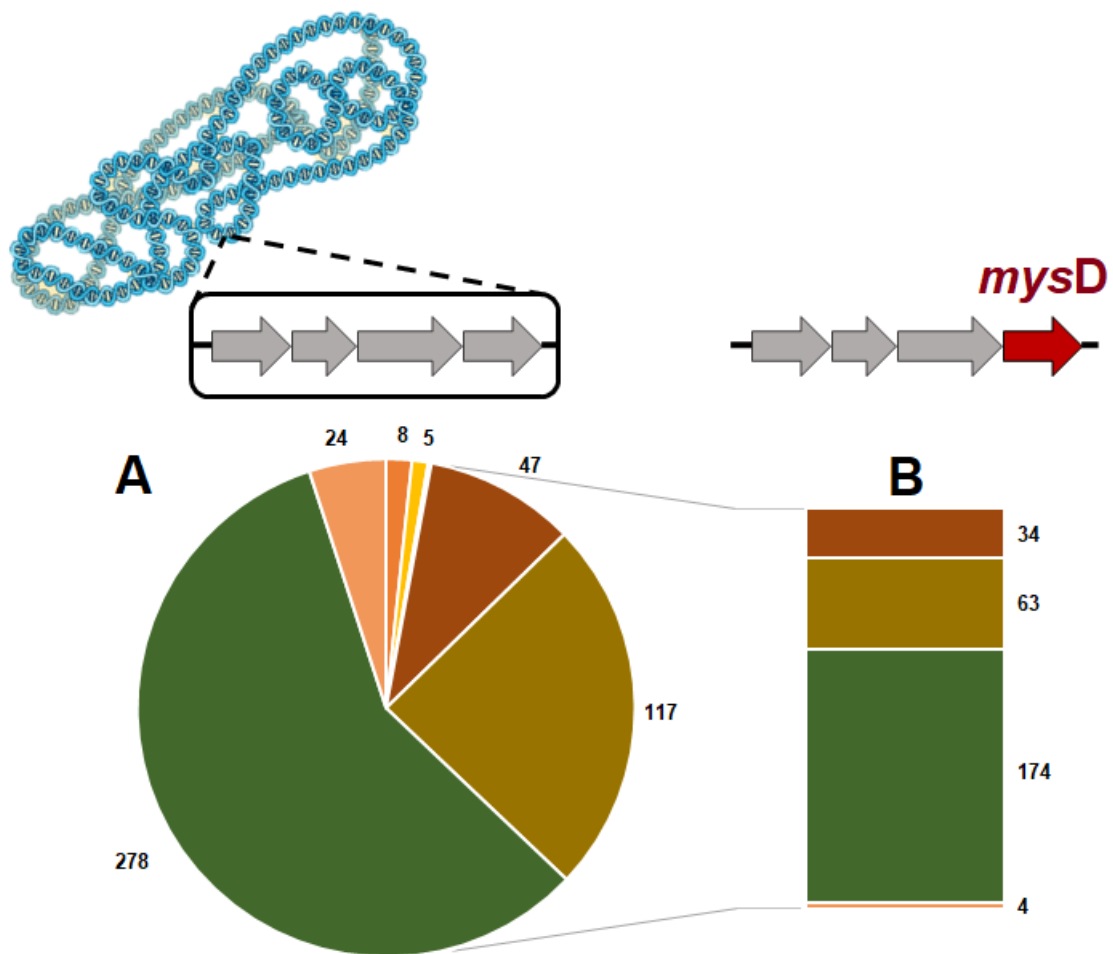


Figura 19. (A) Número de clusters gênicos referentes aos genes de biossntese de MAAs encontrados nos genomas de cada ordem cianobacteriana e (B) presença do gene *mysD* em cada um dos *clusters* anotados. Legenda: **Pleurocapsales**, **Chroococcidiopsidales**, **Synechococcales**, Nostocales, **Oscillatoriales** e **Chroococcales**.

A árvore filogenética construída com as sequências de aminoácidos da enzima expressa pelo gene *mysD* organizou cada proteína de acordo com suas relações evolutivas, baseado na similaridade entre cada sequência (Figura 20). É possível observar que esta enzima apresenta ancestralidade comum e grande similaridade dentre as cópias avaliadas, incluído aquelas provenientes de outras bactérias e da macroalga *Porphyra umbilicalis*. O grupo externo é formado por sequências referentes ao gene *ddl*, uma D-Alanina-D-Alanina ligase associada a via metabólica dos peptidoglicanos e que possui uma função distinta daquela proposta para *mysD* na biossntese de aminoácidos do tipo micospolina. Também foram incluídos nesta análise duas outras enzimas descritas como ATP-grasps (*rimK*, glutamato ligase; *gshB*, glutationa sintetase) que possuem função similar a *mysD*, uma vez que usam ATP e têm como substrato aminoácidos.

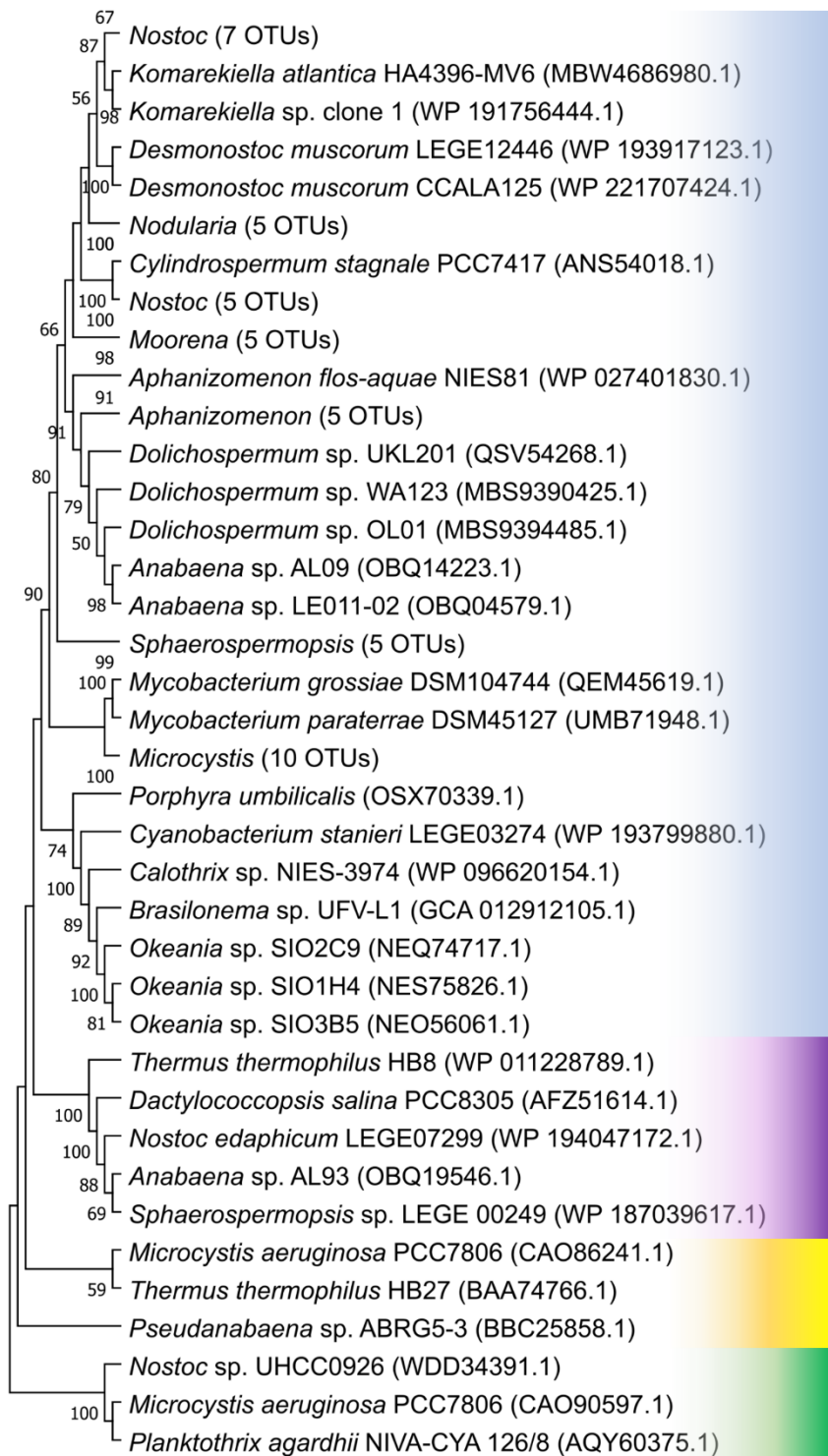


Figura 20. Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína expressa pelo gene *mysD* com número de acesso individual em parênteses, demonstrando a relação evolutiva entre linhagens que apresentam este gene agrupado em um *cluster* em cianobactérias e Actinomycetota (azul). Os grupos externos são compostos por sequências relacionadas aos genes *ddl* (roxo), *rimK* (amarelo) e *gshB* (verde) provenientes tanto de cianobactérias quanto de Actinomycetota. Valores de *bootstap* acima de 50 estão representados em cada nodo e a escala de distância representa a taxa de intercâmbio do vizinho mais próximo (NNI, *nearest-neighbour-interchange rate*).

Avaliando as conformações terciárias das proteínas previstas para algumas das linhagens que representam os grandes clados formados na filogenia, fica evidente a grande semelhança estrutural entre todas elas (Figura 21). Sua estrutura apresenta 12 ± 1 α hélices e 12 ± 1 folhas β em suas composições e seus sítios de ação enzimática concentram-se entre os resíduos 127 até 336, com pequenas variações (± 4 aminoácidos), sendo a exceção o gene fusionado (*mysCD*) de *Porphyra umbilicalis*, com sítio ativo entre os resíduos 619 até 898.

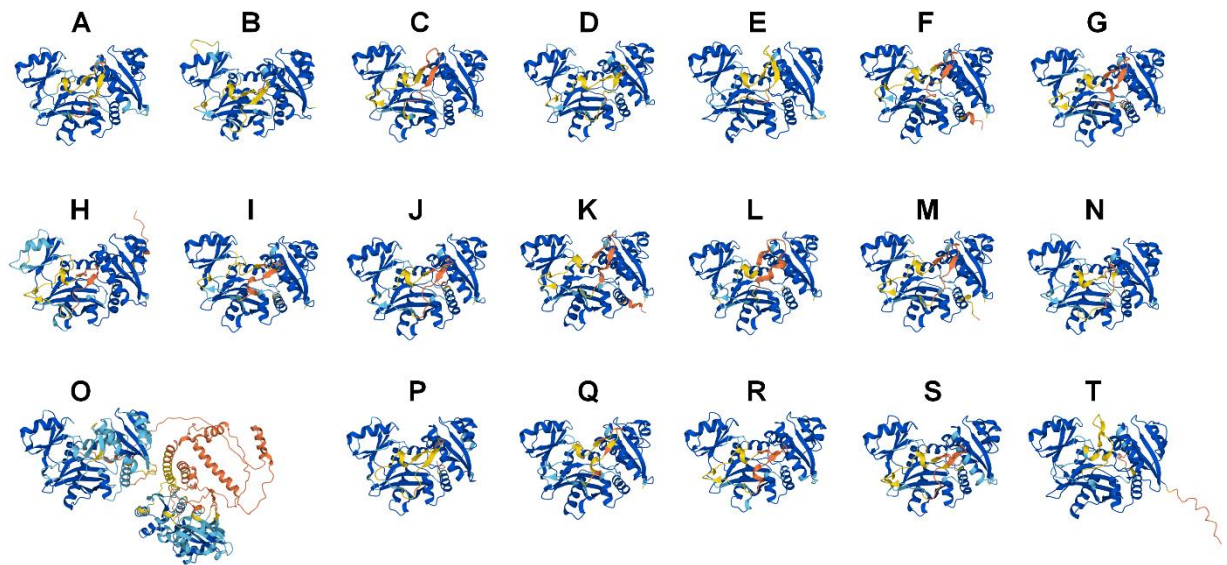


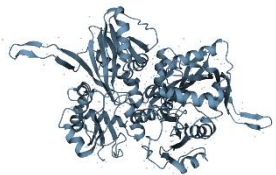
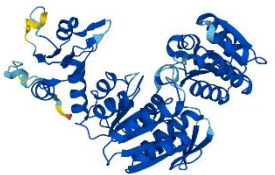
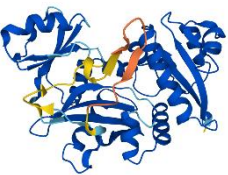
Figura 21. Estruturas terciárias previstas para as proteínas expressas pelos genes *mysD* de **A-** *Anabaena* sp. AL09; **B-** *Chamaesiphon minutus* PCC6605; **C-** *Crinalium epipsammum* PCC9333; **D-** *Crocospaera subtropica* ATCC51142; **E-** *Cyanobacterium* sp. HL69; **F-** *Cylindrospermum* sp. NIES-4074; **G-** *Desmonostoc muscorum* LEGE12446, **H-** *Microcystis aeruginosa* PCC9807; **I-** *Moorena producens* JHB; **J-** *Nodularia spumigena* CENA596; **K-** *Nostoc commune* BAE; **L-** *Nostoc flagelliforme* CCNUN1; **M-** *Nostoc punctiforme* PCC73102; **N-** *Oscillatoria nigro-viridis* PCC7112; **O-** *Porphyra umbilicalis* (gene *mysCD*); **P-** *Rhodococcus* sp. PBTS1; **Q-** *Scytonema tolypothrichoides* VB61278; **R-** *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024; **S-** *Tolypothrix* sp. PCC7910; **T-** *Trichodesmium erythraeum* GBRTLIN201. As cores representam a confiança estrutural do modelo, sendo azul alta (>70), amarelo mediana (<70, >50) e laranja baixa confiança (<50) sendo o *score* de pLDDT (valor de confiança por resíduo) do AlphaFold.

Para todas as sequências de *mysD* encontradas foi previsto na plataforma *InterPro* o mesmo domínio proteico (IPR011095) referente à porção C terminal da enzima D-Ala-D-Ala ligase. As funções moleculares previstas para todos os *mysD* foram as de ligações de íons metálicos, ligações de ATP e D-Ala-D-Ala ligase (GO:0008716). Nenhuma família de proteínas foi atribuída aos genes identificados como *mysD*. Inversamente, os genes que formam o grupo externo na filogenia (Figura 20), referentes às cópias de *ddl*, foram associados à família proteica

IPR005905, referentes à formação de peptidoglicanos para a biossíntese da parede celular. Curiosamente, além do domínio IPR011095, estes genes também apresentam a porção N terminal da enzima D-Ala-D-Ala ligase identificada como IPR011127.

A fim de compreender as diferenças funcionais e estruturais entre as proteínas sintetizadas pelos genes *mysD*, *ddl* e *murF*, compararam-se diversos parâmetros entre elas (Tabela 6). A enzima expressa pelo gene *ddl* é a que tem menor tamanho médio (em aminoácidos), sendo a única com forma homo dimérica. Apesar de ambas as proteínas codificadas por *mysD* e *murF* serem monoméricas, não houve similaridade entre elas no alinhamento BLAST. A principal distinção entre as três enzimas são seus substratos, que variam consideravelmente em polaridade e tamanho.

Tabela 6. Comparação funcional e estrutural das enzimas codificadas pelos genes *ddl*, *murF* e *mysD*.

	<i>ddl</i>	<i>murF</i>	<i>mysD</i>
Tamanho médio (aa)	319	449	341
Estrutura terciária			
Forma oligomérica	Homo dímero	Monômero	Monômero
Substratos	Alanina (aminoácido apolar, 89 Da) e ATP	UDP-tri peptídeo (polar, 1047 Da), D-Alanyl-D-Alanina (apolar, 160 Da) e ATP	Micosporina-glicina (polar, 245 Da), ATP e diversos aminoácidos
Similaridade BLAST com <i>mysD</i> Via biossintética	Cobertura 70% Identidade 30,5%	Sem similaridade	---
	Peptidoglicanos	Peptidoglicanos	Aminoácidos do tipo micosporina

Ainda comparando o produto destes três genes, nota-se que devido a sua ação enzimática a proteína expressa por *mysD* precisa ter sua nomenclatura modificada. Tanto *ddl* quanto *murF* apresentam o nome da sua enzima corretamente relacionado com os seus substratos-alvo (Figura 22). Este estudo sugere a adoção do nome “micosporina-glicina-amina ligase” para a proteína expressa por *mysD*.

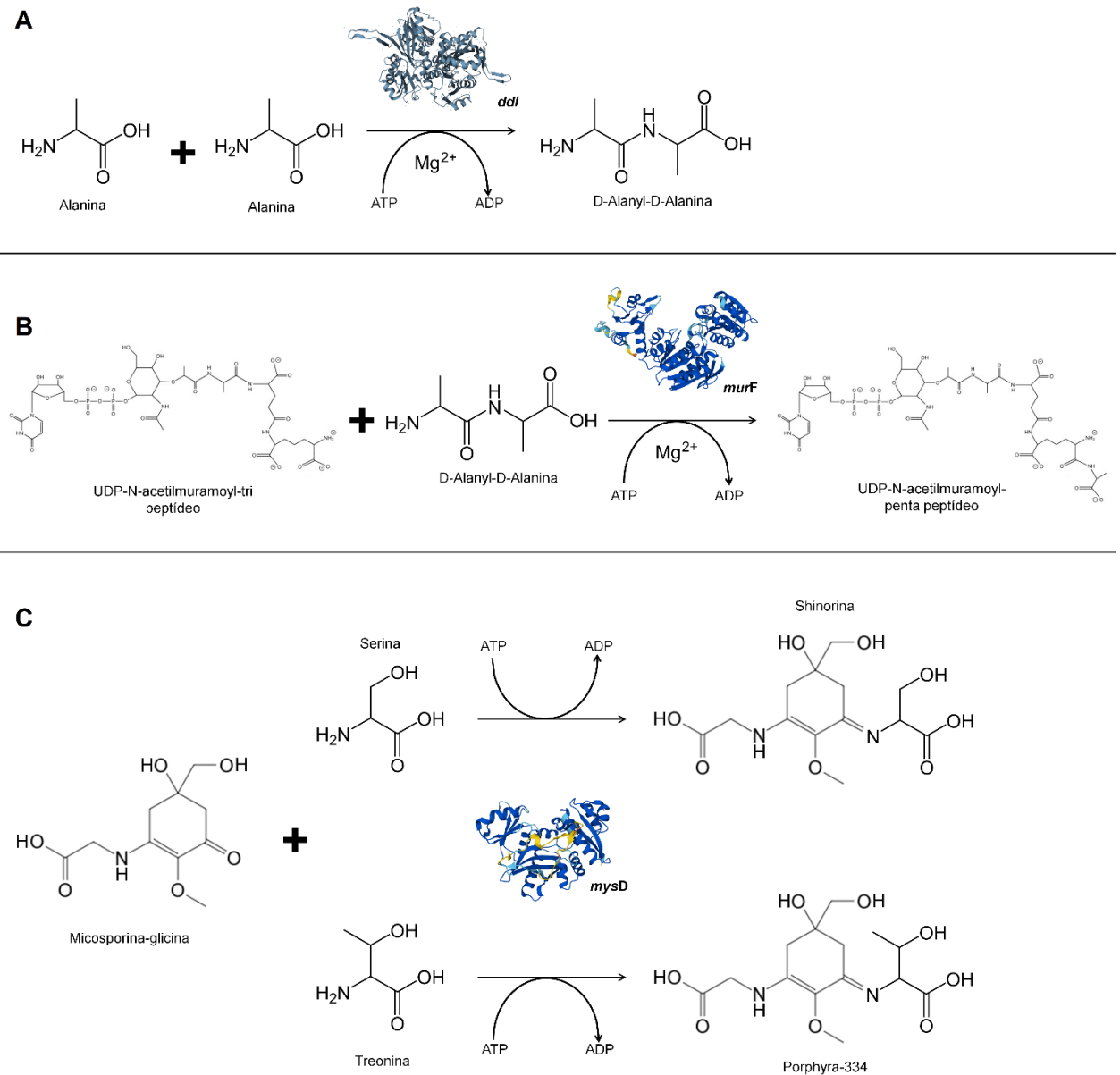


Figura 22. Reações enzimáticas previstas para as proteínas expressas pelos genes (A) *ddl* (D-Ala-D-Ala ligase), (B) *murF* (UDP-N-acetylmuramoyl-tri-peptídeo-D-Alanyl-D-Alanina ligase) e (C) *mysD* (micosporina-glicina-amina ligase).

5.4. Discussão

O filo Cyanobacteria vem sendo considerado como potencial produtor de MAAs desde a década de 90 (Vicent; Roy, 1993). Com a expansão dos estudos no tema, acessando cada vez mais linhagens de diversos contextos ambientais, as ferramentas genômicas e de análise bioquímica permitiram reformular a ideia clássica de que todas as cianobactérias possuem a capacidade de sintetizar MAAs. Refletindo apenas de um ponto de vista genômico, se a biossíntese destes compostos realmente depende da presença de um *cluster* gênico colinear em

sintetia e organizado, sua ocorrência limitada dentro do filo já impossibilitaria a produção universal de MAAs em centenas de linhagens. Este estudo reforça esta observação quando apenas 30%, das mais de 1.500 montagens genômicas de cianobactérias publicamente disponíveis apresentam o agrupamento gênico relacionado a biossíntese de aminoácidos do tipo micosporina (Figuras 18 e 19).

Alguns dos *clusters* mais estudados em cianobactérias são referentes à produção de toxinas, como a microcistina (Nishizawa et al., 1999). Com levantamentos globais que apontam para uma maioria (> 70%) de florações não-tóxicas (Sivonen, 1996), é possível assumir que, assim como observado para os MAAs, uma parcela considerável da diversidade cianobacteriana seja não-tóxica. Contudo, o viés científico favorece a disseminação de resultados positivos e tende a omitir aqueles que sejam menos favoráveis (Wilholt, 2009), perpetuando suposições generalistas sem forte fundamentação científica (como “*toda cianobactéria é tóxica*” ou “*toda cianobactéria produz aminoácidos do tipo micosporina*”). Algumas hipóteses interessantes que visam explicar as distinções metabólicas reportadas nas linhagens deste filo incluem a possibilidade de que as espécies não-produtoras sejam o resultado de eventos de edição genética, como deleções induzidas por elementos transponíveis (Christiansen et al., 2008); ou ainda, que *clusters* gênicos possam sofrer uma degeneração em sua integridade estrutural com o passar de um longo tempo geracional, tornando-se relíquias gênicas que deixam pistas da ancestralidade comum nos genomas de linhagens que perderam a capacidade de expressar uma determinada proteína ou sintetizar um composto específico (Soule et al., 2007; Gross et al., 2008).

No caso dos MAAs em cianobactérias, a presença do *cluster* (independentemente de sua composição) acontece com maior frequência em linhagens da ordem Nostocales (58%), o que pode ser interpretado como um indicio de que existe um componente evolutivo que explica sua ocorrência ou um viés científico devido ao maior foco de estudo alocado às linhagens desta ordem (Jain et al., 2017). Além disso, quantificar a presença do gene *mysD* em mais da metade de todos os *clusters* encontrados em 4 ordens diferentes aumenta a relevância da descrição apropriada deste gene e do papel de sua enzima nesta via biossintética. A relação filogenética entre os produtos de expressão das cópias de *mysD* encontradas agrupa as linhagens escolhidas para representar o filo Cyanobacteria como ramos de grande similaridade entre si. De qualquer modo, tanto o gene *mysD* pertencente aos *clusters* cianobacterianos quanto as cópias encontradas nos genomas de outras bactérias e da macroalga *Porphyra umbilicalis* apresentam uma inequívoca ancestralidade comum, distinguindo-os das sequências das proteínas codificadas pelos genes *ddl*, *rimK* e *gshB* que serviram como grupo externo.

Agrupando estes dados com a produção mensurada em cultivos cianobacterianos reportados na literatura, observam-se poucas linhagens em que já se detectou um composto relacionado à via biossintética de MAAs sem que houvesse a detecção do *cluster* organizado em um genoma do mesmo gênero. Isto ocorre em *Synechococcus* sp. 0-89-H-Syn (Garcia-Pichel; Castenholz, 1993), *Anabaenopsis* sp. SLCyA (Bairwa et al., 2021), *Anagnostidinema amphibium* CCIBT3214 (Geraldes et al., 2020b) e diversas linhagens de *Aliinostoc* sp. (Demay et al., 2020; Geraldes et al., 2019). Para *Synechococcus* sp. 0-89-H-Syn foi reportada a presença de Micosporina-glicina, um composto que pode ser compartilhado pela via do shikimato e cuja síntese ocorre após a expressão dos genes *mysABC* e em *Anabaenopsis* sp. SLCyA detectou-se shinorina. Das 252 montagens genômicas depositadas no NCBI descritas como pertencentes ao gênero *Synechococcus* e apenas duas do gênero *Anabaenopsis*, nenhuma apresentou os genes relacionados a MAAs agrupados. O sequenciamento especificamente do genoma destas duas linhagens poderia esclarecer essa dúvida, descrevendo as primeiras linhagens em ambos os gêneros como produtoras de MAAs contendo o respectivo *cluster* gênico ou definir taxonomicamente as linhagens 0-89-H-Syn e SLCyA com dados genômicos, corrigindo eventuais posicionamentos equivocados. No caso de *Aliinostoc* e *Anagnostidinema*, ainda não existem genomas publicamente disponíveis que permitam avaliar a ocorrência do *cluster* nestes gêneros.

Não houve grandes diferenças nas estruturas terciárias das cópias de *mysD* provenientes das mais de 200 linhagens cianobacterianas que apresentam este gene. Outras enzimas, como a asparaginase, possuem subdivisões em tipos distintos de acordo com sua diversidade estrutural, observando-se classes diferentes ocorrendo tanto entre amostras de procariotos e eucariotos quanto dentro de um mesmo filo (da Silva et al., 2022). A similaridade na estrutura terciária da enzima expressa por *mysD* reforça a ancestralidade comum deste gene e sua manutenção ao longo do tempo, indicando a importância da sua integridade e função para os organismos que o possuem. Outra hipótese que discute a manutenção estrutural de enzimas foi apresentada para explicar a similaridade observada nas glioxalases da maior parte dos eucariotos e dos procariotos (Kaur et al., 2017). Neste caso, os autores apresentam a ideia de que enzimas importantes para o metabolismo e que ocorrem em cópia única nos genomas são menos propensas a sofrerem alterações estruturais. Como evidencia, eles apresentam diferentes classes de glioxalases encontradas em plantas, um dos poucos grupos de organismos que possuem múltiplas cópias do gene relativo a esta enzima em seus genomas. Porém, em relação a *mysD*, podem existir variações em relação à eficiência catalítica apesar da semelhança estrutural observada neste estudo. Isto explicaria porque linhagens contendo *clusters* gênicos semelhantes

e cultivadas nas mesmas condições produzem MAAs em concentrações diferentes. Somente experimentos aprofundados em cristalografia e cinética enzimática poderiam detalhar variações funcionais entre as cópias de *mysD* observadas em cianobactérias.

O gene *mysD* recebeu este nome pela primeira vez há mais de uma década na publicação de Gao; Garcia-Pichel (2011b). Especificamente neste trabalho, os autores tiveram o cuidado de não relacionar a proteína expressa por *mysD* com a denominação “D-Alanina-D-Alanina ligase”, uma vez que na via biossintética proposta por eles fica evidente que esta enzima não atua na junção de duas moléculas de D-Alanina como é o caso do produto expresso pelo gene *ddl* (Salmond et al., 1980). Ainda assim, nos anos seguintes à publicação do artigo que nomeou *mysD*, diversas terminologias foram usadas para descrever a enzima expressa por este gene: “homólogo de D-Ala-D-Ala ligase” (Miyamoto et al., 2014), “ATP-grasp ligase” (Shimura et al., 2015) e “Shinorina sintetase” (Goswani et al., 2015). Desde então até as publicações mais recentes no tema, o gene *mysD* foi associado majoritariamente a D-Ala-D-Ala ligase (com variações como D-Ala ligase-*like* e *ddl* homólogo) em dezenas de artigos (Chen et al., 2021; Dabravolski; Isayenkov, 2022; D’Agostino et al., 2016; In et al., 2021; Jung et al., 2021; Katoch et al., 2016; Khani-Juyabad et al., 2022; Llewellyn et al., 2020a; Mishra; Sinha, 2022; Mogany et al., 2022; Osborn; Mahmud, 2019; Rosic, 2019; Shang et al., 2018; Zhang et al., 2021). Somente em Saha et al. (2021) *mysD* é associado a D-Alanyl-D-Alanina-carboxipeptidase devido à similaridade na sequência do gene encontrado pelos autores com uma enzima do tipo D-Alanyl-D-Alanina de um banco de dados após avaliação por BLAST.

Devido à similaridade do gene *mysD* com outros genes anteriormente descritos (como *ddl* e *murF*), foi relevante comparar a proteína expressa por cada um deles de modo a esclarecer confiantemente a necessidade de nomear a enzima proveniente de *mysD* a fim de identifica-la corretamente com a função que lhe vem sendo atribuída na última década. Tanto a estrutura terciária quanto os substratos das três enzimas diferem, indicando que apesar da similaridade em tamanho médio e da forma oligomérica (entre *mysD* e *murF*), suas funções bioquímicas são distintas (Tabela 6 e Figura 22). Geraldine et al. (2020a) apontaram em seu estudo que, devido à função de adicionar aminoácidos de forma pouco específica à molécula de micosporina-glicina, a enzima expressa pelo gene *mysD* deveria ser denominada de acordo com a reação catalítica que ela desempenha, que não corresponde a D-Ala-D-Ala ligase. Deste modo, observando os substratos de *mysD* e obedecendo as regras de nomenclatura vigentes da enzimologia, este trabalho sugere a utilização da terminologia “micosporina-glicina-amina ligase”, uma vez que a reação envolve uma molécula de micosporina-glicina que recebe diferentes aminoácidos através de seus grupos amina.

Um dos nomes sugeridos anteriormente, Shinorina sintetase (Goswani et al., 2015), erroneamente limita como substrato único de *mysD* o aminoácido serina. Isto porque diversos experimentos com expressão heteróloga dos genes deste *cluster* sinalizam que esta enzima é promíscua, utilizando ao menos 6 aminoácidos distintos como substrato, o que explica parte da diversidade de MAAs observada (Chen et al., 2021; Gao; Garcia-Pichel, 2011; Miyamoto et al., 2014). Apesar da falta de especificidade, *mysD* aparenta ter preferências por serina e treonina (que resultam em shinorina e porphyra-334, respectivamente) quando avaliados parâmetros enzimáticos como tempo de reação e taxa de consumo de substrato (Chen et al., 2021). Isto explicaria porque diferentes linhagens de cianobactérias que possuem a mesma composição de genes em seus *clusters* (como *Nodularia spumigena* CENA596 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, exibido nos capítulos anteriores desta tese) produzem concentrações e tipos diferentes de MAAs apesar de serem cultivadas nas mesmas condições nutricionais (sem que haja acréscimo ou déficit de aminoácidos particulares). Em situações ambientais, contudo, é cabível imaginar que, por ser uma enzima promíscua, a ambiguidade de substrato observada em *mysD* se torna uma vantagem evolutiva (Tawfik, 2010), propiciando a biossíntese de MAAs mesmo que haja uma flutuação na concentração e biodisponibilidade de aminoácidos no meio intracelular.

Com início na análise investigativa das montagens genômicas de cianobactérias brasileiras em busca do *cluster* gênico relacionado com a produção de aminoácidos do tipo micosporina, determinando suas concentrações constitutivas e induzidas por UV em uma dezena de linhagens, até a conclusão da necessidade em renomear uma das enzimas desta via biossintética, este trabalho explorou o metabolismo fotoprotetor de algumas linhagens de cianobactérias provenientes do Pantanal e de outros biomas brasileiros. Os dados produzidos avançam o debate científico referente a estes compostos com resultados inéditos e oferecem subsídio para que futuros estudos relacionados ao tema possam partir de um ponto de análise robusto e bem informado.

Referências Gerais

- Aigner, S., Herburger, K., Holzinger, A., Karsten, U. (2018). Epilithic *Chamaesiphon* (Synechococcales, Cyanobacteria) species in mountain streams of the Alps-interspecific differences in photo-physiological traits. *Journal of Applied Phycology*, 30:1125-1134
- Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates 1, 2. *J Phycology*, 4:1-4
- Alvarenga, D. O., Franco, M. W., Sivonen, K., Fiore, M. F., Varani, A. M. (2020). Evaluating Eucalyptus leaf colonization by *Brasilonema octagenarum* (Cyanobacteria, Scytonemataceae) using in planta experiments and genomics. *PeerJ*, 8:e9158
- Andreote, A. P. D., Vaz, M. G. M. V., Genuário, D. B., Barbiero, L., Rezende-Filho, A. T., and Fiore, M. F. (2014). Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology*, 50(4): 675-684.
- Andreote, A. P., Dini-Andreote, F., Rigonato, J., Machineski, G. S., Souza, B. C., Barbiero, L., and Fiore, M. F. (2018). Contrasting the genetic patterns of microbial communities in soda lakes with and without cyanobacterial bloom. *Frontiers in Microbiology*, 9: 244.
- Anisimova, M. and Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*, 55(4): 539-552.
- Aráoz, R., Shelton, M., Lebert, M. and Häder, D.P. (1998). Differential behaviour of two cyanobacterium species to UV radiation. Artificial UV radiation induces phycoerythrin synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 44(3): 175-183.
- Badger, M.R., Price, G.D., Long, B.M. and Woodger, F.J. (2006). The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 57(2): 249-265.
- Bairwa, H. K., Prajapat, G., Jain, S., Khan, I. A., Ledwani, L., Yadav, P., Agrawal, A. (2021). Evaluation of UVB protection efficiency of mycosporine like amino acid extracted from the cyanobacteria *Anabaenopsis* sp. SLCyA isolated from a hypersaline lake. *Bioresourse Technology Reports*, 15:100749
- Balskus, E. P., and Walsh, C. T. (2010). The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science*, 329(5999): 1653-1656.
- Banaszak, A. T., and Lesser, M. P. (2009). Effects of solar ultraviolet radiation on coral reef organisms. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(9): 1276-1294.
- Bandaranayake, W. (1998). Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Natural Product Reports*, 15(2): 159-172.
- Bird, G., Fitzmaurice, N., Dunlap, W. C., Chalker, B. E., and Bandaranayake, W. M. (1991). *U.S. Patent No. 5,000,946*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bittencourt-Oliveira, M. D. C., De Oliveira, M. C. and Bolch, C. J (2001). Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *Journal of Phycology*, 37(5): 810-818.

- Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezhuk, Y. and Raytselis, Y. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): W29-W33.
- Borge, O. (1925). Die von Dr. FC Hoehne wahrend der. Expedition Roosevelt-Rondon gesammelten Susswasseralgen. *Arkiv for Botanik*, 19: 1-56.
- Bothwell, M. L., Sherbot, D. M. and Pollock, C. M. (1994). Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic-level interactions. *Science*, 265(5168): 97-100.
- Boucar, M. C. M., Shen, L. Q., Wang, K., Zhang, Z. C. and Qiu, B. S. (2021). UVB irradiation enhances the production of unique mycosporine-like amino acids and carotenoids in the subaerial cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. CCNU1. *European Journal of Phycology*, 56(3): 316-323
- Bourrelly, P. (1970). Les Algues d'eau Douce: initiation à la Systematique, 3: Les Algues bleues et rouges, Les Eugléniens. Peridiniens et Cryptomonadines. Éditions N. Boubée and Cie, Paris, 512 pp.
- Burford, M. A., Carey, C. C., Hamilton, D. P., Huisman, J., Paerl, H. W., Wood, S. A., Wulff, A. (2020). Perspective: Advancing the research agenda for improving understanding of cyanobacteria in a future of global change. *Harmful Algae*, 91: p.101601
- Carreto, J. I., and Carignan, M. O. (2011). Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine Drugs*, 9(3): 387-446.
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J. and McQuillan, J. A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4) : 464-469.
- Cassier-Chauvat, C., Blanc-Garin, V. and Chauvat, F. (2021). Genetic, genomics, and responses to stresses in cyanobacteria: biotechnological implications. *Genes*, 12(4): p.500.
- Castenholz, R. W. (2015). General characteristics of the cyanobacteria. In Whitman, W. B. [Ed.] *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Digital Edition Wiley Online Library (Online service) provider. John Wiley and Sons Inc, Hoboken, NJ, pp. 1-23.
- Castenholz, R. W., Garcia-Pichel, F. (2012). Cyanobacterial responses to UV radiation. In: Whitton BA (ed) *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer, Dordrecht, pp 481-499.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4): 540-552.
- Chalmers, P. J., Fitzmaurice, N., Rigg, D. J., Thang, S. H., and Bird, G. (1990). UV absorbing compounds and compositions. *International patent application PCT/AU90/00078, publication no. WO, 90, 09995*.
- Chandra, R., Pons-Faudoa, F. P., Saldívar, R. P. and Rittmann, B. E. (2020). Effect of ultra-violet exposure on production of mycosporine-like amino acids and lipids by *Lyngbya purpurem*. *Biomass and Bioenergy*, 134: p.105475.

Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P. and Parks, D. H. (2019). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics*: btz848.

Chen, M., Rubin, G. M., Jiang, G., Raad, Z. and Ding, Y. (2021). Biosynthesis and Heterologous Production of Mycosporine-Like Amino Acid Palythines. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(16): 11160-11168.

Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq, B. and Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, 7(1): 1-9.

Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B. and Kurmayer, R. (2008). Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Molecular Biology and Evolution*, 25(8): 1695-1704.

Conde, F. R., Churio, M. S., and Previtali, C. M. (2000). The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 56(2-3): 139-144.

Cordeiro, R. S., Vaz, I. C., Magalhaes, S., Barbosa, F. A. (2017). Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89: 2021-2031.

Corre, C., and Challis, G. L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural Product Reports*, 26(8): 977-986.

Corrêa, M. D. P. (2015). Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(3): 297-313.

Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M. S., Ribeiro, M. J., Fernandes, M. H., Barros, P., Barreiro, A., Vasconcelos, V., Martins, R. (2014). Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: High potential as a source of anticancer compounds. *Marine Drugs*, 12: 98-114.

Costa, M. P., and Telmer, K. H. (2006). Utilizing SAR imagery and aquatic vegetation to map fresh and brackish lakes in the Brazilian Pantanal wetland. *Remote Sensing of Environment*, 105(3): 204-213.

Costa, N. B., Kolman, M. A., and Giani, A. (2016). Cyanobacteria diversity in alkaline saline lakes in the Brazilian Pantanal wetland: a polyphasic approach. *Journal of Plankton Research*, 38(6): 1389-1403.

da Silva, L. S., Doonan, L. B., Pessoa Jr, A., de Oliveira, M. A. and Long, P. F. (2022). Structural and functional diversity of asparaginases: Overview and recommendations for a revised nomenclature. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2): 503-513.

Dabravolski, S. A. and Isayenkov, S. V. (2022). Metabolites Facilitating Adaptation of Desert Cyanobacteria to Extremely Arid Environments. *Plants*, 11(23): p.3225.

D'Agostino, P. M., Javalkote, V. S., Mazmouz, R., Pickford, R., Puranik, P. R. and Neilan, B. A. (2016). Comparative profiling and discovery of novel glycosylated mycosporine-like amino acids in two strains of the cyanobacterium *Scytonema cf. crispum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19): 5951-5959.

Dass, C. (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry* (Vol. 16). John Wiley and Sons.

De la Coba, F. (2007) (a). Use of mycosporine-type aminoacid Porphyra-334 as an antioxidant. *International Patent WO2007/026035 A2*.

De la Coba, F. (2007) (b). Use of mycosporine-type aminoacid shinorine as an antioxidant. *International Patent WO2007/026038A2*.

De la Coba, F., Aguilera, J., De Galvez, M. V., Alvarez, M., Gallego, E., Figueroa, F. L., and Herrera, E. (2009). Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV absorbing compounds. *Journal of Dermatological Science*, 55(3): 161-169.

De-Lamonica-Freire, E. M., and Heckman, C. W. (1996). The Seasonal Succession of Biotic Communities in Wetlands of the Tropical Wet-and-Dry Climatic Zone: III. The Algal Communities in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil, with a Comprehensive List of the Known Species and Revision of two Desmid Taxa. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 81(2) : 253-280.

Delbaje, E., Andreote, A. P. D., Pellegrinetti, T. A., Cruz, R. B., Branco, L. H. and Fiore, M. F. (2021). Phylogenomic analysis of *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(2): p.004648.

Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Marine Drugs*, 17: p320.

Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J. M. and Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1): 1-6.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M. and Claverie, J. M. (2008). Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_2): W465-W469.

Derikvand, F., Yin, D. T., Barrett, R., and Brumer, H. (2016). Cellulose-based biosensors for esterase detection. *Analytical Chemistry*, 88(6): 2989-2993.

Desikachary, T. V. (1959). Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, 686 p.

Dextro, R. B., Moutinho, F. H. M. and Nordi, C. S. F. (2018). Growth and special structures production of *Nostoc paludosum* (Nostocaceae, Cyanobacteria) under nutrient starvation and different light intensities. *Revista Ambiente & Água*, 13.

Dextro, R. B. (2021). Growth dynamic on a co-cultivation of two Chlorophyta microalgae exposed to copper. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 33.

Dextro, R. B., Delbaje, E., Cotta, S. R., Zehr, J. P. and Fiore, M. F. (2021). Trends in Free-access Genomic Data Accelerate Advances in Cyanobacteria Taxonomy. *Journal of Phycology*, 57(5): 1392-1402.

Dextro, R. B., Delbaje, E., Geraldés, V., Pinto, E., Long, P. F. and Fiore, M. F. (2023a). Exploring the Relationship between Biosynthetic Gene Clusters and Constitutive Production of Mycosporine-like Amino Acids in Brazilian Cyanobacteria. *Molecules*, 28(3): p.1420.

Dextro, R. B., Fiore, M. F. and Long, P. F. (2023b). Resolving Confusion Surrounding d-Ala-d-Ala Ligase Catalysis in Cyanobacterial Mycosporine-Like Amino Acid (MAA) Biosynthesis. *ChemBioChem*, e202300158.

Dillon, J. G. and Castenholz, R. W. (1999). Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC radiation: implications for early photosynthetic life. *Journal of Phycology*, 35(4): 673-681.

Dillon, J. G., Tatsumi, C. M., Tandingan, P. G., and Castenholz, R. W. (2002). Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Archives of Microbiology*, 177(4): 322-331.

Domitrovic, Y. Z. (2002). Structure and variation of the Paraguay River phytoplankton in two periods of its hydrological cycle. *Hydrobiologia*, 472(1-3): 177-196.

Donia, M. S., and Schmidt, E. W. (2011). Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. *Chemistry and Biology*, 18(4): 508-519.

Dörr, F. A., Oliveira-Silva, D., Lopes, N. P., Iglesias, J., Volmer, D. A., and Pinto, E. (2011). Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(14): 1981-1992.

Dreher, T. W., Davis II, E. W., Mueller, R. S. and Otten, T. G. (2021). Comparative genomics of the ADA clade within the Nostocales. *Harmful Algae*, 104: p.102037.

Driscoll, C. B., Meyer, K. A., Šulčius, S., Brown, N. M., Dick, G. J., Cao, H., Gasiūnas, G., Timinskas, A., Yin, Y., Landry, Z. C. and Otten, T. G. (2018). A closely-related clade of globally distributed bloom-forming cyanobacteria within the Nostocales. *Harmful Algae*, 77: 93-107.

Drouet, F. (1938). The Brazilian Myxophyceae. II. *American Journal of Botany*, 25(9): 657-666.

Duan, Z., Ji, D., Weinstein, E. J., Liu, X., Susa, M., Choy, E., and Hornicek, F. J. (2010). Lentiviral shRNA screen of human kinases identifies PLK1 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Letters*, 293(2): 220-229.

Dvořák, P., Poulíčková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D. A. and Papini, A. (2015). Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation*, 24: 739-57.

Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I., and Sesterhenn, I. A. (2004). Tumours of the urinary system and male genital organs. *Pathology and genetics*.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797.

El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A. and Sonnhammer, E. L. L. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1): D427-D432.

Feng, Y. N., Zhang, Z. C., Feng, J. L. and Qiu, B. S. (2012). Effects of UVB radiation and periodic desiccation on the morphogenesis of the edible terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19): 7075-7081.

- Fleming, E. D., and Castenholz, R. W. (2008). Effects of nitrogen source on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(3): 301-308.
- Gao, Q., and Garcia-Pichel, F. (2011) (a). Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11): 791.
- Gao, Q. and Garcia-Pichel, F. (2011) (b). An ATP-grasp ligase involved in the last biosynthetic step of the iminomyosporine shinorine in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Journal of Bacteriology*, 193(21): 5923-5928.
- Garcia-Pichel, F., and Castenholz, R. W. (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment1. *Journal of Phycology*, 27(3): 395-409.
- Garcia-Pichel, F., Sherry, N. D. and Castenholz, R. W. (1992). Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochemistry and Photobiology*, 56(1): 17-23.
- Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. W. (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1): 163-169.
- Garcia-Pichel, F., Wingard, C. E. and Castenholz, R. W. (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1): 170-176.
- Garcia-Pichel, F., Mechling, M., Castenholz, R. W. (1994). Diel migrations of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1500-1511.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. and Muyzer, G. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3284-3291.
- Garcia-Pichel, F., Lombard, J., Soule, T., Dunaj, S., Wu, S. H. and Wojciechowski, M. F. (2019). Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later great oxidation event using gene phylogenies of a sunscreen. *Mbio*, 10(3): pp.e00561-19.
- Garrels, M. (2010). *Bash Guide for Beginners*. Fultus Corporation.
- Gavriilidou, A., Kautsar, S. A., Ziburanyi, N., Krug, D., Müller, R., Medema, M. H. and Ziemert, N. (2022). Compendium of specialized metabolite biosynthetic diversity encoded in bacterial genomes. *Nature Microbiology*, 7(5): 726-735.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In Kolkwitz, R. [Ed.] Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol. 14. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany (Johnson Reprint Corp., New York), pp. 1-1196.
- Genuario, D. B., Andreote, A. P. D., Vaz, M. G. M. V., and Fiore, M. F. (2017). Heterocyte-forming cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109: 105-112.

Geraldes, V., Jacinavicius, F. R., Genuário, D. B. and Pinto, E. (2019). Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria using ultrahigh-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34: p.e8634.

Geraldes, V., de Medeiros, L. S., Lima, S. T., Alvarenga, D. O., Gacesa, R., Long, P. F., Fiore, M. F. and Pinto, E. (2020a). Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. *Harmful Algae*, 35(2): 177-187.

Geraldes, V., de Medeiros, L. S., Jacinavicius, F. R., Long, P. F., Pinto, E. (2020b). Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the quantification of mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) from cyanobacteria. *Algal Research*, 46: p.101796.

Geraldes, V. and Pinto, E. (2021). Mycosporine-like amino acids (MAAs): biology, chemistry and identification features. *Pharmaceuticals*, 14(1): p.63.

Gorham, P. R., McLachlan, J., Hammer, U. T., Kim, W. K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Int Verein Theor Angew Limmol* 15: 796-804.

Goswami, A. and Van Lanen, S. G. (2015). Enzymatic strategies and biocatalysts for amide bond formation: tricks of the trade outside of the ribosome. *Molecular BioSystems*, 11(2): 338-353.

Graham, G. J. (1995). Tandem genes and clustered genes. *Journal of Theoretical Biology*, 175: 71-87.

Gröniger, A., Hallier, C. and Häder, D. P. (1999). Influence of UV radiation and visible light on *Porphyra umbilicalis*: photoinhibition and MAA concentration. *Journal of Applied Phycology*, 11(5): 437-445.

Gross, J., Meurer, J. and Bhattacharya, D. (2008). Evidence of a chimeric genome in the cyanobacterial ancestor of plastids. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 1-12.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696-704.

Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M. and Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, 7(5): 692-701.

Häder, D.-P., and Gao, K. (2015). Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Frontiers in Environmental Sciences*, 3: 14. doi: 10.3389/fenvs.2015.00014.

Hartmann, A., Becker, K., Karsten, U., Remias, D., Ganzera, M. (2015). Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs*, 13: 6291-6305.

He, Y. Y., Klisch, M. and Häder, D. P. (2002). Adaptation of Cyanobacteria to UV-B Stress Correlated with Oxidative Stress and Oxidative Damage. *Photochemistry and Photobiology*, 76(2): 188-196.

Helms, G. L., Moore, R. E., Niemczura, W. P., Patterson, G. M., Tomer, K. B., and Gross, M. L. (1988). Scytonemin A, a novel calcium antagonist from a blue-green alga. *The Journal of Organic Chemistry*, 53(6): 1298-1307.

- Hirose, Y. and Katayama, M. (2021). Draft genome sequence of the phototropic cyanobacterium *Rivularia* sp. strain IAM M-261. *Microbiology Resource Announcements*, 10(39): e00790-21.
- Hu, C., Völler, G., Süßmuth, R., Dittmann, E. and Kehr, J. C. (2015). Functional assessment of mycosporine-like amino acids in *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806. *Environmental Microbiology*, 17(5): 1548-1559.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2): W169-W175.
- Huang, Y., Chain, F. J., Panchal, M., Eizaguirre, C., Kalbe, M., Lenz, T. L., Samonte, I. E., Stoll, M., Bornberg-Bauer, E., Reusch, T. B. and Milinski, M. (2016). Transcriptome profiling of immune tissues reveals habitat-specific gene expression between lake and river sticklebacks. *Molecular Ecology*, 25(4): 943-958.
- Hung, C. L., Lin, Y. S., Lin, C. Y., Chung, Y. C. and Chung, Y. F. (2015). CUDA ClustalW: An efficient parallel algorithm for progressive multiple sequence alignment on Multi-GPUs. *Computational Biology and Chemistry*, 58: 62-68.
- In, J. S., Lim, J. M., Jung, S., Choi, D. W., Min, S. R. and Jeong, W. J. (2021). Production of porphyrin-334 in transgenic lines of *Nannochloropsis salina* by the expression of mycosporine-like amino acid biosynthetic genes of *P. yezoensis*. *Journal of Applied Phycology*, 33(3): 1663-1672.
- Ishida, K., Welker, M., Christiansen, G., Cadel-Six, S., Bouchier, C., Dittmann, E., Hertweck, C. and De Marsac, N. T. (2009). Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 2017-2026.
- Jain, S., Prajapat, G., Abrar, M., Ledwani, L., Singh, A. and Agrawal, A. (2017). Cyanobacteria as efficient producers of mycosporine-like amino acids. *Journal of Basic Microbiology*, 57(9): 715-727.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3): 275-282.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A. and Bridgland, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873): 583-589.
- Jung, P., D'Agostino, P. M., Brust, K., Büdel, B. and Lakatos, M. (2021). Final Destination? Pinpointing *Hyella disjuncta* sp. nov. PCC 6712 (Cyanobacteria) Based on Taxonomic Aspects, Multicellularity, Nitrogen Fixation and Biosynthetic Gene Clusters. *Life*, 11(9): p.916.
- Karentz, D. (2001). Chemical defenses of marine organisms against solar radiation exposure: UV absorbing mycosporine-like amino acids and scytonemim. In: McClintock JB, Baker BJ (eds) Marine chemical ecology. CRC press, USA, pp 481–520
- Karentz, D., Cleaver, J. E. and Mitchell, D. L. (1991). Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-b radiation 1. *Journal of Phycology*, 27(3): 326-341.
- Karlsson, I. (2011). Chemical and dermatological aspects of UV absorbing compounds. <http://hdl.handle.net/2077/26665>, Acesso em: 24/03/2022.

- Karsten, U. (2008). Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation. In: Amsler CD (ed) *Algal chemical ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 273-296
- Karsten, U., Franklin, L. A., Lüning, K. and Wiencke, C. (1998). Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta*, 205(2): 257-262.
- Katoch, M., Mazmouz, R., Chau, R., Pearson, L. A., Pickford, R. and Neilan, B. A. (2016). Heterologous production of cyanobacterial mycosporine-like amino acids mycosporine-ornithine and mycosporine-llysine in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20): 6167-6173.
- Kaur, C., Sharma, S., Hasan, M. R., Pareek, A., Singla-Pareek, S. L. and Sopory, S. K. (2017). Characteristic variations and similarities in biochemical, molecular, and functional properties of glyoxalases across prokaryotes and eukaryotes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4): p.250.
- Kersten, R. D., Yang, Y. L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S. J., Fenical, W., and Dorrestein, P. C. (2011). A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nature Chemical Biology*, 7(11): 794.
- Khani-Juyabad, F., Mohammadi, P. and Zarrabi, M. (2022). Insights from cyanobacterial genomic and transcriptomic analyses into adaptation strategies in terrestrial environments. *Genomics*, 114(4): p.110438.
- Khatoon, H., Leong, L. K., Rahman, N. A., Mian, S., Begum, H., Banerjee, S. and Endut, A. (2018). Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 249: 652-658.
- Kicklighter, C. E., Kamio, M., Nguyen, L., Germann, M. W. and Derby, C. D. (2011). Mycosporine-like amino acids are multifunctional molecules in sea hares and their marine community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28): 11494-11499.
- Kilbane, J. (2002). Application of Bioinformatics for Direct Study of Unculturable Microorganisms. Gas Technology Institute. *U.S. Patent Application* 09/960, 698.
- Kirk, J. T. O. and Allen, R. L. (1965). Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 21(6): 523-530.
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51: 346-53.
- Komárek, J. and Kaštovský, J. (2003). Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies*, 109: 305-25.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86: 295-335.
- Kotai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research*, 11: 5
- Lakeman, M. B., Von Dassow, P., Cattolico, R. A. (2009). The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* 8: 746-758

Larson, C. B., Crüseemann, M., and Moore, B. S. (2017). PCR-independent method of transformation-associated recombination reveals the cosmomycin biosynthetic gene cluster in an ocean Streptomycete. *Journal of Natural Products*, 80(4): 1200-1204.

Lau, N. S., Matsui, M. and Abdullah, A. A. A. (2015). Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products. *BioMed Research International*, 2015.

Lawrence, K.P., Long, P. F., Young, A. R. (2018). Mycosporine-like amino acids for skin photoprotection. *Current Medical Chemistry*, 25: 5512-5527

Lawrence, J. (1999). Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(6): 642-648.

Lawton, L. A., and Edwards, C. (2008). Conventional laboratory methods for cyanotoxins. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* (pp. 513-537). Springer, New York, NY.

Le Moigne, D., Demay, J., Reinhardt, A., Bernard, C., Kim Tiam, S., Marie, B. (2021). Dynamics of the Metabolome of *Aliinostoc* sp. PMC 882.14 in Response to Light and Temperature Variations. *Metabolites*, 11: 745

Leikoski, N., Fewer, D. P., Jokela, J., Wahlsten, M., Rouhiainen, L., and Sivonen, K. (2010). Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3): 701-709.

Letunic, I. and Bork, P. (2007). Interactive Tree of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1): 127-128.

Lewis, W. H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D. Z. and Ettema, T. J. (2021). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 225-40.

Li, X. C., Ferreira, D., and Ding, Y. (2010). Determination of absolute configuration of natural products: theoretical calculation of electronic circular dichroism as a tool. *Current Organic Chemistry*, 14(16): 1678-1697.

Liang, C., Zhao, F., Wei, W., Wen, Z. and Qin, S. (2006). Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics. *International Journal of Biological Sciences*, 2(4): p.197.

Lima, S. T., Alvarenga, D. O., Etchegaray, A., Fewer, D. P., Jokela, J., Varani, A. M., Sanz, M., Dorr, F. A., Pinto, E., Sivonen, K., Fiore, M. F. (2017). Genetic organization of anabaenopeptin and spumigin biosynthetic gene clusters in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. *ACS Chemical Biology*, 12: 769-778.

Llewellyn, C. A., and Airs, R. L. (2010). Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Marine Drugs*, 8(4): 1273-1291.

Llewellyn, C. A., Greig, C., Silkina, A., Kultschar, B., Hitchings, M. D., Farnham, G. (2020a) Mycosporine-like amino acid and aromatic amino acid transcriptome response to UV and far-red light in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. *Scientific Reports*, 10: 1-13

Llewellyn, C. A., Airs, R. L., Farnham, G. and Greig, C. (2020b). Synthesis, regulation and degradation of carotenoids under low level UV-B radiation in the filamentous cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. *Frontiers in Microbiology*, *11*: p.163.

Lubin D., and Jensen, E. H. (1995). Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature*, *377*: 710-713.

Machado, M. J. (2022). Terpenoma de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálicas do Pantanal. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/D.11.2022.tde-11082022-145740. Recuperado em 2022-12-02, de www.teses.usp.br.

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T. and Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of Phycology*, *38*(1): 17-38.

Malhi, Y., Pegoraro, E., Nobre, A. D., Pereira, M. G., Grace, J., Culf, A. D. and Clement, R. (2002). Energy and water dynamics of a central Amazonian rain forest. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *107*(D20): pLBA-45

Malla, S., and Sommer, M. O. (2014). A sustainable route to produce the scytonemin precursor using *Escherichia coli*. *Green chemistry*, *16*(6): 3255-3265.

Malone, C. F. S., Santos, K. R. S., and Sant'Anna, C. L. (2012). Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal Brasileiro. *Oecologia Australis*, *16*: 745-755.

Malone, C. F., Neto, M. J., and Sakamoto, A. Y. (2007). Gêneros de Algas no Plâncton de Lagoas Salinas Situadas na Fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, MS. *Revista Brasileira de Biociências*, *5*(S2): 588-590.

Malone, C. F. S., Alvarenga, D. O., Fiore, M. F. and Sant'Anna, C. L. (2014). Towards a phylogenetic position for the morphologically-defined genus *Pannus* (Cyanobacteria). *Nova Hedwigia*, *99*(3/4): 511-524.

Marquardt, J. and Palinska, K. A. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology*, *187*(5): 397-413.

Matsui, K., Nazifi, E., Hirai, Y., Wada, N., Matsugo, S., and Sakamoto, T. (2012). The cyanobacterial UV absorbing pigment scytonemin displays radical-scavenging activity. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *58*(2): 137-144.

McGill, R., Tukey, J. W. and Larsen, W. A. (1978). Variations of box plots. *The American Statistician*, *32*(1): 12-16.

McInnes, C., Mezna, M., and Fischer, P. M. (2005). Progress in the discovery of polo-like kinase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *5*(2): 181-197.

Medema, M. H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., and Fischbach, M. A. (2014). A systematic computational analysis of biosynthetic gene cluster evolution: lessons for engineering biosynthesis. *PLoS Computational Biology*, *10*(12): e1004016.

- Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M. and Mapelli-Brahm, P. (2019). Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. *Nutrients*, *11*(5): p.1093.
- Micallef, M. L., D'Agostino, P. M., Al-Sinawi, B., Neilan, B. A., and Moffitt, M. C. (2015). Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. *Marine genomics*, *21*: 1-12.
- Michalek-Wagner, K. (2001). Seasonal and sex-specific variations in levels of photo-protecting mycosporine-like amino acids (MAAs) in soft corals. *Marine Biology*, *139*(4): 651-660.
- Mishra, S. and Sinha, R. P. (2022). Biotechnological exploitation of cyanobacterial photoprotective metabolites. *Vegetos*, 1-17.
- Miyamoto, K. T., Komatsu, M. and Ikeda, H. (2014). Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(16): 5028-5036.
- Mogany, T., Kumari, S., Swalaha, F. M. and Bux, F. (2022). In silico analysis of enzymes involved in mycosporine-like amino acids biosynthesis in *Euhalothece* sp.: Structural and functional characterization. *Algal Research*, *66*: p.102806.
- Mohlin, M., Wulff, A. (2009). Interaction effects of ambient UV radiation and nutrient limitation on the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Microbial Ecology*, *57*: 675-686.
- Monteiro, M., Costa, M., Moreira, C., Vasconcelos, V. M., Baptista, M. S. (2017). Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in situ blooms. *Journal of Applied Phycology*, *29*: 879-888.
- Moustafa, A., Loram, J. E., Hackett, J. D., Anderson, D. M., Plumley, F. G. and Bhattacharya, D. (2009). Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS ONE*, *4*: e5758.
- Mtagati, T. A., Siame, B. A., and Shushu, D. D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, *78*(4): 382-397.
- Mueller, T. J., Berla, B. M., Pakrasi, H. B. and Maranas, C. D. (2013). Rapid construction of metabolic models for a family of Cyanobacteria using a multiple source annotation workflow. *BMC Systematic Biology*, *7*: 1-12.
- Müller, R., and Wink, J. (2014). Future potential for anti-infectives from bacteria—how to exploit biodiversity and genomic potential. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(1): 3-13.
- Mushir, S., Fatma, T. (2011). Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in cyanobacterium *Aulosira fertilissima*: Environmental perspective and characterization. *Current Research Journal of Biological Sciences*, *3*: 165-171.
- Nakamura, H., Kobayashi, J. I., and Hirata, Y. (1982). Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *250*: 113-118.
- Nalley, J. O., O'Donnell, D. R. and Litchman, E. (2018). Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria. *Algal Research*, *35*: 500-507.

Nett, M. (2014). Genome mining: concept and strategies for natural product discovery. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 99* (pp. 199-245). Springer, Cham.

Ninomiya, M., Satoh, H., Yamaguchi, Y., Takenaka, H., and Koketsu, M. (2011). Antioxidative activity and chemical constituents of edible terrestrial alga *Nostoc commune* Vauch. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1109292682-1109292682.

Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. I. and Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *The Journal of Biochemistry*, 126(3): 520-529.

Niva, A. (1976). Estimation of algal growth potential. *Norwegian Institute for Water Research*, 11: 2-25

Oliveira, M. D., and Calheiros, D. F. (2000). Flood pulse influence on phytoplankton communities of the south Pantanal floodplain, Brazil. *Hydrobiologia*, 427(1), 101-112.

Oren, A., Ionescu, D., Hindiyeh, M. and Malkawi, H. (2008). Microalgae and cyanobacteria of the Dead Sea and its surrounding springs. *Israel Journal of Plant Sciences*, 56(1-2), 1-13.

Osborn, A. R. and Mahmud, T. (2019). Interkingdom genetic mix-and-match to produce novel sunscreens. *ACS Synthetic Biology*, 8(11), 2464-2471.

Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, 26(10): 449-457.

Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3): 873-879.

Oyamada, C., Kaneniwa, M., Ebitani, K., Murata, M., and Ishihara, K. (2008). Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Marine Biotechnology*, 10(2): 141-150.

Pacheco, A. B. F., Guedes, I. A. and Azevedo, S. M. (2016). Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater? *Toxins*, 8(6): p.172.

Pade, N. and Hagemann, M. (2014). Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life*, 5(1): 25-49.

Pandey, A., Pathak, J., Singh, D. K., Ahmed, H., Singh, V., Kumar, D. and Sinha, R. P. (2020). Photoprotective role of UV-screening pigment scytonemin against UVB-induced damages in the heterocyst-forming cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HKAR-2. *Brazilian Journal of Botany*, 43(1): 67-80.

Pathak, J., Pandey, A., Maurya, P. K., Rajneesh, R., Sinha, R. P. and Singh, S. P. (2020). Cyanobacterial secondary metabolite scytonemin: a potential photoprotective and pharmaceutical compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(3): 467-481.

- Pathak, J., Sonker, A. S., Rajneesh, R., Kannaujiya, V. K., Singh, V., Ahmed, H. and Sinha, R. P. (2017). Screening and partial purification of photoprotective pigment scytonemin from cyanobacterial crusts dwelling on the historical monuments in and around Varanasi, India. *Microbiology Research*, 8(1): p.6559.
- Paul, B., Dixit, G., Murali, T. S. and Satyamoorthy, K. (2019). Genome-based taxonomic classification. *Genome*, 62: 45-52.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L. and Gough, J. (2022). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, gkac993, 1-10.
- Pellegrinetti, T. A., Cotta, S. R., Sarmiento, H., Costa, J. S., Delbaje, E., Montes, C. R., Camargo, P. B., Barbiero, L., Rezende-Filho, A. T. and Fiore, M. F. (2022). Bacterial communities along environmental gradients in tropical soda lakes. *Microbial Ecology*, 85: 892–903.
- Polturak, G. and Osbourn, A. (2021). The emerging role of biosynthetic gene clusters in plant defense and plant interactions. *PLoS Pathogens*, 17(7): p.e1009698.
- Popin, R. V., Rigonato, J., Abreu, V. A. C., Andreote, A. P. D., Silveira, S. B., Odebrecht, C., Fiore, M. F. (2016). Draft genome assembly of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain CENA596 in shrimp production ponds. *Genome Announcement*, 4: e00466-16
- Quesada, A., Vincent, W. F. (1997). Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *European Journal of Phycology*, 32: 335-342
- Rambla-Alegre, M., Reverté, L., del Río, V., de la Iglesia, P., Palacios, O., Flores, C., Caixach J. and Campàs, M. (2017). Evaluation of tetrodotoxins in puffer fish caught along the Mediterranean coast of Spain. Toxin profile of *Lagocephalus sceleratus*. *Environmental Research*, 158: 1-6.
- Rastogi, R. P., Madamwar, D., and Incharoensakdi, A. (2015). Sun-screening bioactive compounds mycosporine-like amino acids in naturally occurring cyanobacterial biofilms: role in photoprotection. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3): 753-762.
- Rastogi, R. P., Madamwar, D., Nakamoto, H. and Incharoensakdi, A. (2020). Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 43: p.100322.
- Rastogi, R. P., Sinha, R. P., Moh, S. H., Lee, T. K., Kottuparambil, S., Kim, Y. J., Rhee, J. S., Choi, E. M., Brown, M. T., Häder, D. P. and Han, T. (2014). Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141: 154-169.
- Rastogi, R. P., Sonani, R. R., Madamwar, D. and Incharoensakdi, A. (2016). Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. *Algal Research*, 16: 110-118.
- Rath, J., Mandal, S., and Adhikary, S. P. (2012). Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 115: 5-8.
- Rees, M. W. (1946). The estimation of threonine and serine in proteins. *Biochemical Journal*, 40: 632-640

Richa, K. V., Kesheri, M., Singh, G., and Sinha, R. P. (2011). Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2: 446-454.

Rosic, N. N. (2019). Mycosporine-like amino acids: making the foundation for organic personalised sunscreens. *Marine Drugs*, 17(11): p.638.

Rosic, N. N. (2021). Recent advances in the discovery of novel marine natural products and mycosporine-like amino acid UV absorbing compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-15

Rosic, N. N. and Dove, S. (2011). Mycosporine-like amino acids from coral dinoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24): 8478-8486.

Rueter, J. G., Petersen, R. R. (1987). Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21: 435-445

Salmond, G. P., Lutkenhaus, J. F. and Donachie, W. D. (1980). Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell envelope gene murG. *Journal of Bacteriology*, 144(1): 438-440.

Santos, K. R. D. S., and Sant'anna, C. L. (2010). Cyanobacteria from different types of lakes ("salina", "salitrada" and "baía") representative of the Pantanal da Nhecolândia, MS, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 33(1): 61-83.

Santos, K. R. D. S., Hentschke, G. S., Andreote, A. P. D., Laughinghouse IV, H. D., Ballot, A., Novelo, E., and Sant'Anna, C. L. (2018). Polyphasic characterization of newly isolated *Anabaenopsis* (Cyanobacteria) strains from tropical Brazil and Mexico. *Phytotaxa*, 367(1): 1-12.

Santos, K. R.D.S., Jacinavicius, F. R., and Leite, C. (2011). Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. *Fottea*, 11(1): 119-126.

Santos, K.R.D.S. (2013). Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales) (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica).

Schagerl, M. and Müller, B. (2006). Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *Journal of Plant Physiology*, 163(7): 709-716.

Schmid, D., Schürch, C., and Züllli, F. (2004). UVA-screening compounds from red algae protect against photoageing. *Personal Care*, 1: 29-31.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14): 2068-2069.

Shang, J. L., Zhang, Z. C., Yin, X. Y., Chen, M., Hao, F. H., Wang, K., Feng, J. L., Xu, H. F., Yin, Y. C., Tang, H. R., Qiu, B. S. (2018). UV-B induced biosynthesis of a novel sunscreen compound in solar radiation and desiccation tolerant cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 20: 200-213

Shick, J. M. (2004). The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. *Limnology and Oceanography*, 49(2): 442-458.

Shick, J. M., Romaine-Lioud, S., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagès, C. and Gattuso, J. P. (1999). Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*, 44(7): 1667-1682.

Shiio, I., Nakamori, S. (1970). Microbial Production of l-Threonine: Part II. Production by α -Amino- β -hydroxyvaleric Acid Resistant Mutants of Glutamate Producing Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34: 448-456

Shimura, Y., Hirose, Y., Misawa, N., Osana, Y., Katoh, H., Yamaguchi, H. and Kawachi, M. (2015). Comparison of the terrestrial cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. NIES-2104 and the freshwater *Leptolyngbya boryana* PCC 6306 genomes. *DNA Research*, 22(6): 403-412.

Siezen, R. J. (2011). Microbial sunscreens. *Microbial biotechnology*, 4(1): 1.

Silaban, A., Bai, R., Gutierrez-Wing, M. T., Negulescu, I. I. and Rusch, K. A. (2014). Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Engineering in Life Sciences*, 14(1): 47-56.

Silva, J. C., Echeveste, P. and Lombardi, A. T. (2018). Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161: 57-63.

Singh S. P., Klisch M., Sinha R. P., Häder D. P. (2010). Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. *Genomics*. 95: 120–8.

Singh, S. P., Klisch, M., Sinha, R. P., Häder, D.P. (2008). Effects of abiotic stressors on synthesis of the mycosporine-like amino acid shinorine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 1500-1505

Singh, D. K., Pathak, J., Pandey, A., Singh, V., Ahmed, H., Kumar, D. and Sinha, R. P. (2020). Ultraviolet-screening compound mycosporine-like amino acids in cyanobacteria: Biosynthesis, functions, and applications. In *Advances in cyanobacterial biology* (pp. 219-233). Academic Press.

Sinha, R. P., and Häder, D. P. (2008). UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174(3): 278-289.

Sinha, R. P., Singh, S. P., and Häder, D. P. (2007). Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89(1): 29-35.

Sinha, R. P., Ambasht, N. K., Sinha, J. P., Klisch, M. and Häder, D. P. (2003). UVB-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, 71(1-3): 51-58.

Sinha, R. P., Klisch, M. and Häder, D. P. (1999). Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1-3): 59-64.

Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35(sup6): 12-24.

Sorrels, C. M., Proteau, P. J., and Gerwick, W. H. (2009). Organization, evolution, and expression analysis of the biosynthetic gene cluster for scytonemin, a cyanobacterial UVAbsorbing pigment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14): 4861-4869.

Soule, T., Garcia-Pichel, F., and Stout, V. (2009) (a). Gene expression patterns associated with the biosynthesis of the sunscreen scytonemin in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in response to UVA radiation. *Journal of Bacteriology*, 191(14): 4639-4646.

Soule, T., Palmer, K., Gao, Q., Potrafka, R. M., Stout, V., and Garcia-Pichel, F. (2009) (b). A comparative genomics approach to understanding the biosynthesis of the sunscreen scytonemin in cyanobacteria. *BMC Genomics*, 10(1): 336.

Soule, T., Stout, V., Swingley, W. D., Meeks, J. C., and Garcia-Pichel, F. (2007). Molecular genetics and genomic analysis of scytonemin biosynthesis in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Journal of Bacteriology*, 189(12): 4465-4472.

Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J. R., and Marshall, L. A. (2002) (a). The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2): 858-866.

Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Grace, K., Gerwick, W. H., and Marshall, L. A. (2002) (b). Scytonemin—a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*, 51(2): 112-114.

Stobiecki, M., Skirycz, A., Kerhoas, L., Kachlicki, P., Muth, D., Einhorn, J., and Mueller-Roeber, B. (2006). Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics*, 2(4): 197-219.

Stramski, D. and Morel, A. (1990). Optical properties of photosynthetic picoplankton in different physiological states as affected by growth irradiance. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 37(2): 245-266.

Strickland, J. D. H., and Parsons, T. R. (1968). "A handbook of seawater analysis." *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*, 167: 311.

Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A. and Quesada, A. (2012). Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes—physiological, regional, and global driving forces. *Frontiers in Microbiology*, 3: p.86.

Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T., and Nagle, D. G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products*, 66(5): 605-608.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022-3027.

Tawfik, O. K. A. D. S. (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 471-505.

Teeling, H. and Glöckner, F. O. (2012). Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis—a bioinformatic perspective. *Briefings in Bioinformatics*, 13: 728-42.

Thajuddin, N. and Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 47-57.

- Thompson, R. H. S. (1962). Classification and Nomenclature of Enzymes: The Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry recommends measures of standardization. *Science*, 137(3528): 405-408.
- Tipton, K. and Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16(1): 34-40.
- Torres, A., Enk, C. D., Hochberg, M., and Srebnik, M. (2006). Porphyrin-334, a potential natural source for UVA protective sunscreens. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 5(4): 432-435.
- Tromas, N., Taranu, Z. E., Martin, B. D., Willis, A., Fortin, N., Greer, C. W. and Shapiro, B. J. (2018). Niche separation increases with genetic distance among bloom-forming cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9: p.438.
- Tsuchiya, T., Takaichi, S., Misawa, N., Maoka, T., Miyashita, H. and Mimuro, M. (2005). The cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 uses bacterial-type phytoene desaturase in carotenoid biosynthesis. *Febs Letters*, 579(10): 2125-2129.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A. and Židek, A. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1): D439-D444.
- Vaz, M. G. M. V., Genuário, D. B., Andreote, A. P. D., Malone, C. F. S., Sant'Anna, C. L., Barbiero, L., and Fiore, M. F. (2015). *Pantalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1): 298-308.
- Vermaas, W. F., Williams, J. G. and Arntzen, C. J. (1987). Sequencing and modification of psbB, the gene encoding the CP-47 protein of photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Molecular Biology*, 8(4): 317-326.
- Vincent, W. F. and Roy, S. (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews*, 1(1): 1-12.
- Wada, N., Sakamoto, T., and Matsugo, S. (2013). Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites*, 3(2): 463-483.
- Wada, N., Sakamoto, T., and Matsugo, S. (2015). Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants*, 4(3): 603-646.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y. and Takabe, T. (2014). Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5): 1763-1769.
- Walsh, C. (1989). Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 264(5): 2393-2396.
- Wang, G., Liu, Z., Lin, R., Li, E., Mao, Z., Ling, J., and Xie, B. (2016). Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. *PLoS Pathogens*, 12(7): e1005685.

Wang, H., Fewer, D. P. and Sivonen, K. (2011). Genome mining demonstrates the widespread occurrence of gene clusters encoding bacteriocins in cyanobacteria. *PLoS ONE*, 6: e22384.

Wang, Q., Fang, L., Chen, J., Hu, Y., Si, Z., Wang, S., and Zhang, T. (2015). Genome-wide mining, characterization, and development of microsatellite markers in *Gossypium* species. *Scientific Reports*, 5: 10638.

Wang, X., Zhou, H., Chen, H., Jing, X., Zheng, W., Li, R., and Li, Y. Z. (2018). Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18): E4255-E4263.

Wenzel, S. C. and Müller, R. (2005). Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(6): 594-606.

Werner, V. R., Laughinghouse IV, H. D., Fiore, M. F., Sant'Anna, C. L., Hoff, C., de Souza Santos, K. R., Neuhaus, E. B., Molica, R. J. R., Honda, R. Y., Echenique, R. O. (2012) Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. *Phycologia*, 51: 228-238

Whitehead, K., and Hedges, J. I. (2005). Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80(2): 115-121.

Whitton, B. A. and Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Springer, USA, Heidelberg, 718 p.

Wilholt, T. (2009). Bias and values in scientific research. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 40(1): 92-101.

Wilmotte, A., Stam, W. and Demoulin, V. (1997). Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusions. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 11-28.

Wilson, A. E., Sarnelle, O., Neilan, B. A., Salmon, T. P., Gehringer, M. M. and Hay, M. E. (2005). Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6126-6133.

Winnenburg, R., Wächter, T., Plake, C., Doms, A. and Schroeder, M. (2008). Facts from text: can text mining help to scale-up high-quality manual curation of gene products with ontologies? *Briefings in Bioinformatics*, 9(6): 466-478.

Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J. and Stahl, D. (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 254: 83-6.

Yang, L., Ding, G., Lin, H., Cheng, H., Kong, Y., Wei, Y., and Yang, C. (2013). Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis. *PLoS One*, 8(11): e80464.

Zhang, G., Zhang, Z., and Liu, Z. (2013). Scytonemin inhibits cell proliferation and arrests cell cycle through downregulating Plk1 activity in multiple myeloma cells. *Tumor Biology*, 34(4): 2241-2247.

Zhang, Z., Su, W. H., Feng, C., Yu, D. H., Cui, C., Xu, X. Y., and Yu, B. Z. (2007). Polo-like kinase 1 may regulate G2/M transition of mouse fertilized eggs by means of inhibiting the phosphorylation of Tyr15 of Cdc2. *Molecular Reproduction and Development*, 74(10): 1247-1254.

Zhang, Z. C., Wang, K., Hao, F. H., Shang, J. L., Tang, H. R. and Qiu, B. S. (2021). New types of ATP-grasp ligase are associated with the novel pathway for complicated mycosporine-like amino acid production in desiccation-tolerant cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 23(11) : 6420-6432.

Zhu, Q., Mai, U., Pfeiffer, W., Janssen, S., Asnicar, F., Sanders, J. G., Belda-Ferre, P. et al. (2019). Phylogenomics of 10,575 genomes reveals evolutionary proximity between domains Bacteria and Archaea. *Nature Communications*, 10: 1-14.

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J. H., Allen, E., Jensen, P. R. (2012). The natural product domain seeker NaPDoS: A phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PLoS One*, 7(3): e34064.