



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Área Biología - Subárea Microbiología

Universidad de la República – Ministerio de Educación y Cultura – PNUD

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Microbiología

Expresión de genes de toxinas de *Cylindrospermopsis raciborskii* en distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes

Lic. Natalia Rigamonti

Orientador: Dra. Claudia Piccini

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Co-orientador: Dr. Luis Aubriot

Sección Limnología, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias (FCIEN)

Uruguay, 2016

A mi Milagros

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible de no ser por...

Claudia y su confianza en mí para hacer expresión de cianos, por su apoyo, motivación y gran paciencia, y sobre todo por fomentar el amor por la investigación.

Luis y Sylvia y sus enriquecedores aportes, por abrirme las puertas de su laboratorio para que pudiera conocer las cianos con otros lentes. Y los escenciales cultivos de Fátima!

la colonia de Micro, a todos, por permitirme ser parte de su unido y alegre ambiente mientras estuve allí.

mis amigos Clara, Xime, Vale, Ami, Matiti, Marce, Anabel, Feli y otros que de cerca o lejos de alguna manera siempre estuvieron alentando e inspirando.

mis padres, el Bocho y la Bilma, que siempre siempre están para dar una y mil manos

mi amada familia

el apoyo económico de ANII y PEDECIBA.

Gracias!!!

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Floraciones de cianobacterias tóxicas	3
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	6
¿Pueden las condiciones ambientales estimular la expresión de cianotoxinas?	12
HIPOTESIS	14
Predicciones	14
OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y METODOS	16
Análisis <i>in silico</i> del <i>cluster sxt</i>	16
Aislamientos y condiciones de cultivo de <i>C. raciborskii</i>	16
Diseño de <i>primers</i>	18
Lisis celular de cultivos de <i>C. raciborskii</i>	19
Extracción y purificación de ADN	20
Extracción y purificación de ARNm	21
PCR de fragmentos de <i>sxtl</i> y <i>cyrA</i>	21
Retrotranscripción y generación de ADN copia (RT-PCR)	22
PCR cuantitativo Tiempo Real (qPCR-TR)	22
Cálculos de cuantificación relativa	22
Estudio de expresión del gen <i>sxtl</i> por cuantificación relativa en MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 y del gen <i>cyrA</i> en CYP011k	23
RESULTADOS	25
Análisis del <i>cluster sxt</i>	25
Eficiencia de la extracción de ácidos nucleicos y de la retrotranscripción	27
Detección de genes y ARNm involucrados en biosíntesis de CYN y STX para las cepas estudiadas	28
Estudio de expresión del gen <i>sxtl</i> por cuantificación relativa en MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 y del gen <i>cyrA</i> en CYP011k	31
Estudio de expresión del gen <i>cyrA</i> por cuantificación relativa en la cepa CYP011k	35

DISCUSION.....	37
Análisis bioinformático del gen <i>sxt1</i>	38
Diferencias entre tratamientos: preferencias ambientales de cada cepa.....	39
Diferencias globales entre cepas - hipótesis de ecotipos de <i>C. raciborskii</i>	42
Evaluación de la expresión del gen <i>cyrA</i> – involucrado en la síntesis de cylindrospermopsina.....	45
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51
ANEXOS.....	60
Curvas de amplificación para los primers <i>sxt1</i> y 16S para determinar la determinación de eficiencias.....	60
Ensayos de otros métodos de lisado de cultivos de <i>C. raciborskii</i>	61
Evaluación la sensibilidad de detección de la qPCR-TR.....	62
Estudios preliminares sobre la influencia de la presencia de predadores sobre la expresión de STX.....	63

RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias son fenómenos que ocurren frecuentemente en los ecosistemas acuáticos límnicos y se han incrementado en las últimas décadas debido a la eutrofización y el cambio climático. En general, las especies que producen floraciones son potencialmente tóxicas, lo cual provoca el deterioro de la calidad del agua y pérdida de biodiversidad. Por ello, las floraciones de cianobacterias deben ser detectadas en estadios tempranos de su desarrollo, siendo necesario predecir el fenómeno para aplicar medidas preventivas. La cianobacteria filamentosa *Cylindrospermopsis raciborskii* constituye un gran riesgo por su aparente comportamiento invasor hacia latitudes templadas y alta toxicidad. Dicha cianobacteria produce las toxinas cylindrospermopsina (CYN), que causa la inhibición irreversible de la fosfatasa del hígado, tumores y diarreas, y saxitoxina (STX) que bloquea el flujo de sodio en la membrana celular resultando en parálisis muscular. No se conocen aún los factores que promueven la producción de toxinas en esta especie. Sin embargo, se postula que la actividad metabólica afecta la producción de toxinas, por ejemplo en condiciones ambientales subóptimas tales como el estrés por nutrientes. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de genes involucrados en la síntesis de CYN (cyrA) y STX (sxtl) en cepas de *C. raciborskii* productoras de dichas toxinas cultivadas en distintas condiciones de estrés nutricional (variaciones en la disponibilidad de nitrógeno y fósforo) mediante PCR en tiempo real (qPCR-TR). La cepa de *C. raciborskii* productora de CYN correspondió a un aislamiento de Australia (CYPK011K), mientras que las productoras de STX se aislaron de sistemas acuáticos de Uruguay (MVCC19 y MVCC14) y USA (CCMP1973). Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas expresaron los genes para ambas cianotoxinas en

todas las condiciones ensayadas, observándose distintos patrones de expresión entre ellas. Las cepas uruguayas no mostraron expresión de cyrA, confirmando la ausencia de producción de CYN en los cultivos. En general, las cepas productoras de STX mostraron mayor expresión del gen sxtl en condiciones de deficiencia de N, siendo mayor aún cuando había P presente. Las diferencias en la expresión de sxtl observadas para las distintas cepas en las condiciones nutricionales ensayadas reflejarían diferencias a nivel ecofisiológico, sugiriendo que se tratarían de distintos ecotipos de la especie. La evidencia obtenida hasta el momento apunta a que no existiría una regulación génica del cluster sxt dada por los nutrientes en sí, sino que la expresión aparenta ser constitutiva y depender de la capacidad de crecimiento de las cepas.

INTRODUCCIÓN

Floraciones de cianobacteria tóxicas

Las floraciones de cianobacterias son aumentos abruptos de una población o de algunas poblaciones en un período corto de tiempo que ocurren naturalmente en los cuerpos de agua y pueden ser uni o multiespecíficos. Sin embargo, en las últimas décadas han aumentado su frecuencia a nivel mundial y esto se lo atribuye al cambio climático (Paerl & Huisman, 2008), que ha ocasionado el aumento de la temperatura a nivel mundial y a la eutrofización, que es el aumento de nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) debido a actividades antropogénicas como son la escorrentía de suelos con fertilizantes o ingreso de desechos orgánicos o aguas servidas a los ecosistemas acuáticos, entre otros (Schindler *et al.*, 2008, Conely & Paerl, 2009). Los factores generales que causan las floraciones se encuentran esquematizados en la

Figura 1 junto con las consecuencias (Gkelis *et al.*, 2014, Smith & Schindler, 2009).

Una de las principales consecuencias de las floraciones de cianobacterias es la intoxicación, ya que muchas producen cianotoxinas que pueden ocasionar la muerte tanto de animales acuáticos como terrestres, y humanos por la ingesta de alimentos y agua contaminadas, y a la exposición durante actividades recreaciones acuáticas en cuerpos de aguas contaminados (Corbel *et al.*, 2014, Merel *et al.*, 2013, Alonzo *et al.*, 2009, Azevedo *et al.*, 2002).

Las poblaciones de cianobacterias en una floración pueden ser dominadas por una única especie o por varias, algunas de las cuales pueden ser no tóxicas (Chorus & Bartram, 1999). Aun dentro de un florecimiento de una única especie puede haber mezcla de poblaciones tóxicas y no tóxicas (Chorus & Bartram, 1999). Como cada

especie puede producir más de un tipo de toxina y su producción puede variar con distintas condiciones ambientales, entre cepas y según el estado fisiológico, la toxicidad de una floración puede ser producida por una cepa extremadamente tóxica que se encuentre en baja biomasa en relación al resto de las cepas no tóxicas dominantes (Piccini *et al.*, 2013, 2011, Martigani, 2012).

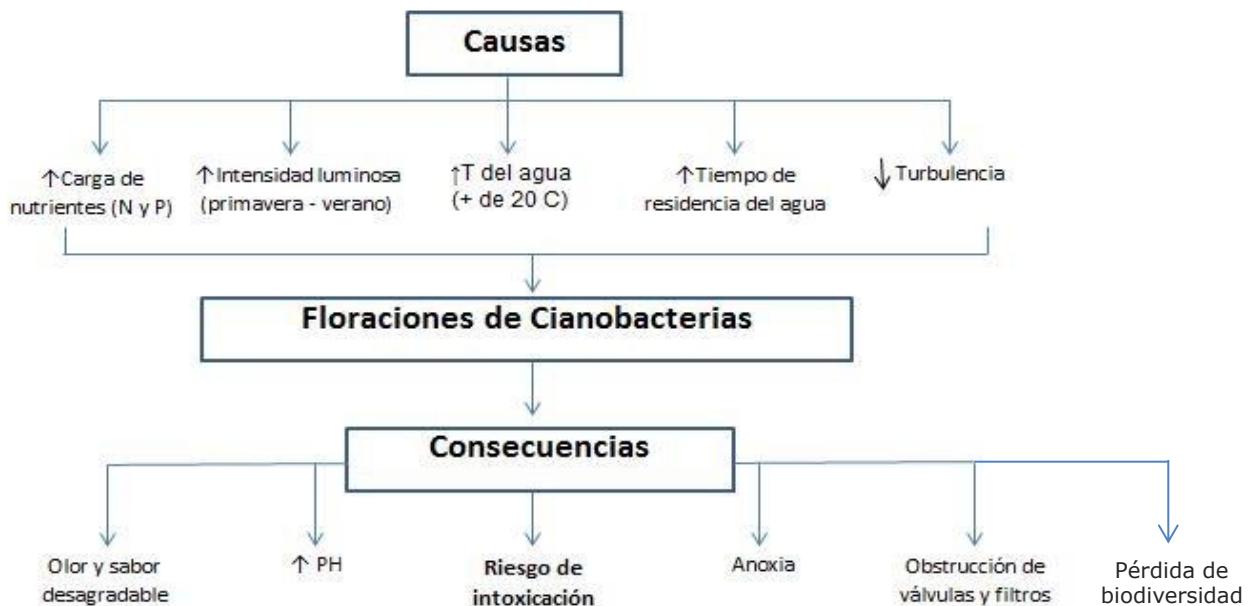


Figura 1 - Causas y consecuencias generales de las floraciones de cianobacterias.

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios que se encuentran contenidas dentro de las células o unidas a ellas y solo un pequeño porcentaje del total se halla disuelto en el agua, el que es liberado cuando se lisan las células ya sea naturalmente por senescencia, por el ataque de depredadores y patógenos o por el tratamiento con alguicidas. Las cianotoxinas comprenden un amplio rango de moléculas que se clasifican en tres categorías de acuerdo con su órgano blanco. Las identificadas hasta el presente son hepatotoxinas que involucra 90 tipos de microcistinas, 9 tipos de

nodularinas y 3 tipos de cylindrospermopsina, neurotoxinas que involucra 20 tipos de saxitoxinas, 3 tipos de beta-N-metil amino-L-alanina (BMAA), 5 tipos de anatoxinas-A, y dermatoxinas que incluye múltiples lipopolisacaridos (LPS) desencadenantes de gastroenteritis o respuestas alérgicas (Merel *et al.*, 2013, Chorus, 2012). El número de cianotoxinas conocidas crece día a día (Wiese *et al.*, 2010, Merel *et al.*, 2013, Pantelic *et al.*, 2013). Las cianobacterias pueden producir varias toxinas simultáneamente y se ha caracterizado más de una microcistina a partir de una única cepa, aunque usualmente solo una o dos toxinas son dominantes para una cepa específica (Dittmann *et al.*, 2013).

Existen más de 40 especies representantes de 20 géneros de 3 órdenes de cianobacterias que producen cianotoxinas en el mundo (Stewart & Falconer, 2008). En el Uruguay se han encontrado floraciones tóxicas en los ríos Uruguay y Río Negro, en el estuario Río de la Plata, en los embalses de Salto Grande y de Río Negro, en lagos y lagunas como Lago Javier, Laguna Blanca, Laguna de Rocha y Laguna de Castillos (Bonilla *et al.*, 2015, 2009, 2006, Ferrari, 2009, Vidal & Kruk, 2008, Vidal *et al.*, 2007, Sienra & Ferrari, 2006, Ferrari & Vidal, 2006, Ferrari & Méndez, 2004 y 2000, Kruk *et al.*, 2002, De León & Yunes, 2001, Bonilla & Conde, 2000, Pérez *et al.*, 1999, Somma, 2014). Si bien en nuestro país los análisis se han enfatizado en cianobacterias plantónicas, son de igual importancia las floraciones tóxicas de especies bentónicas que también pueden ocasionar grandes deterioros en los cuerpos de agua (Borges *et al.*, 2015, Quiblier *et al.*, 2013). Las cianobacterias encontradas hasta el momento en Uruguay pertenecen a 15 géneros: 5 del Orden *Chroococcales*, 4 del Orden *Oscillatoriales* y 6 del Orden *Nostocales*. Dentro del Orden *Nostocales* encontramos

Raphidiopsis, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* y *Cylindrospermopsis* (Bonilla *et al.*, 2015).

Cylindrospermopsis raciborskii

La cianobacteria *C. raciborskii*, del orden Nostocales, forma filamentos que contienen varias células vegetativas cilíndricas y presenta aerotopos, heterocistos terminales y acinetes ovalados y separados de los heterocistos (Padisák, 1997). Presenta por tanto diferenciación celular, en la que distintas células cumplen diferentes funciones. El poseer heterocistos le permite fijar el nitrógeno atmosférico cuando los niveles de nitrógeno inorgánico son extremadamente bajos. Esta especie produce floraciones dispersivas en sistemas someros eutróficos mezclados. Es capaz de tolerar un amplio rango de temperaturas y regímenes lumínicos, y presenta diversas estrategias nutricionales (Antunes *et al.*, 2015, Bonilla *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2012, Vidal & Kruck, 2008).

Se la describió originalmente como una especie tropical (Padisák, 1997), pero recientemente se ha registrado un aumento de floraciones en climas subtropicales y templados a nivel mundial (Sinha *et al.*, 2012, Bonilla *et al.*, 2012). Las características fisiológicas de la especie le confieren un carácter invasor (Sukenik *et al.*, 2012). Su reciente aparición en zonas templadas se adjudica tanto al cambio climático como a la eutrofización (Antunes *et al.*; 2015, Tundisi *et al.*, 2015, Wood *et al.*, 2014, Sinha *et al.*, 2012), así como también a su eficiencia en la captación de nutrientes (Amaral *et al.*, 2014, Shafik *et al.*, 2001, Istvánovics *et al.*, 2000). Estudios de las cepas de nuestro

país revelaron, además, su gran plasticidad fenotípica y la existencia de distintos ecotipos (Bonilla *et al.*, 2012, Piccini *et al.*, 2011).

C. raciborskii es capaz de producir cylindrospermopsina, saxitoxina y sus análogos neosaxitoxina y neusaxitoxina, microcistina LR, además de LPS; aunque se continúan descubriendo nuevas toxinas (Jaja-Chimedza *et al.*, 2015, Wimmer *et al.*, 2014, O’Neil *et al.*, 2012). Según su distribución geográfica es el tipo de toxina que generalmente producen, siendo las cepas de Asia y Australia productoras de cylindrospermopsina, las cepas de Sudamérica productoras de saxitoxina y sus análogos, y las cepas de Europa, África y Norteamérica no producen toxinas (Carloto *et al.*, 2015, Stucken *et al.*, 2009). Análisis genéticos indican que existen *clusters* filogeográficos continentales debido a una dispersión antigua de la especie a nivel mundial lo que explicaría la distribución y su toxicidad (Sinha *et al.*, 2012, Piccini *et al.*, 2011, Gugger *et al.*, 2005, Neilan *et al.*, 2003).

En nuestro país se ha encontrado *C. raciborskii* principalmente en la región Este, en lagos someros de Canelones y Maldonado destinados a la potabilización y la recreación (Fabre *et al.*, 2010, Vidal & Kruk, 2008, Bonilla & Conde, 2000). Un caso emblemático es el de las floraciones recurrentes de *C. raciborskii* en la Laguna del Sauce y Laguna Blanca, las que abastecen de agua potable a Maldonado, Punta del Este y José Ignacio, lo que ocasiona graves inconvenientes en la potabilización del agua. Se han aislado 2 cepas productoras de saxitoxina de estos ambientes (Bonilla *et al.*, 2009), las que constituyen ecotipos diferentes (Piccini *et al.*, 2011). Se ha confirmado que ambas cepas presentan el *cluster* genético para la biosíntesis de STX y producen ésta toxina en altas concentraciones, y que presentan genes del *cluster*

genético para la biosíntesis de CYN pero no son capaces de producirla (Piccini *et al.*, 2013, Hoff-Rissetti *et al.*, 2013).

Tanto la biosíntesis de saxitoxina como de cylindrospermopsina es no ribosomal (Dittman *et al.*, 2013). En el caso del *clúster* *cyr*, los genes para la biosíntesis, regulación y exportación de la toxina cylindrospermopsina (Sinha *et al.*, 2014, Pearson *et al.*, 2010, Mihali *et al.*, 2008) involucran 42 kb con 15 marcos de lectura abiertos, su organización se resume en la Figura 2.

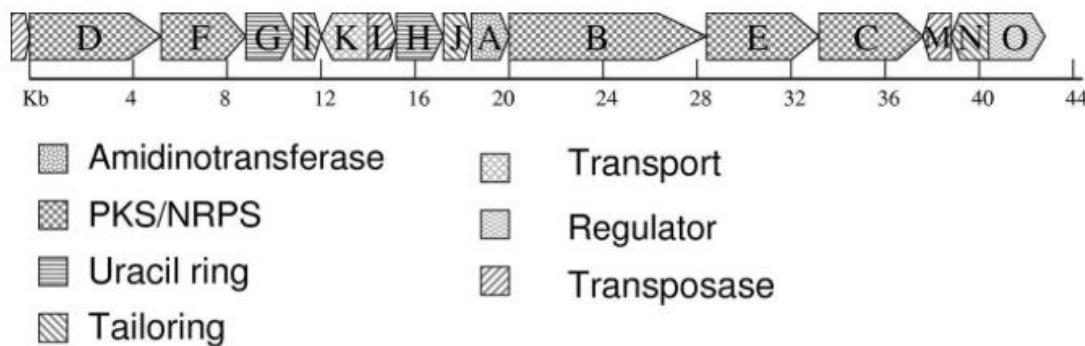


Figura 2 - Organización estructural del *cluster* génico de cylindrospermopsina para *C. raciborskii* AWT205 (Mihali *et al.*, 2008).

La estructura proteica de la toxina cylindrospermopsina es compleja por lo que involucra la actividad de varias enzimas como péptido sintasa no ribosomal (NRPS), poliquinasa sintasa (PKS) y sistema mixto de NRPS/PKS (Mihali *et al.*, 2008). Los genes que codifican para estas enzimas en general siempre están adyacentes entre sí en el cromosoma y forman *clusters* génicos de metabolitos secundarios. El primer paso de biosíntesis de CYN involucra una amidinotransferasa producto del gen *cyrA* y en el segundo paso la actividad de una NRPS producto del gen *cyrB*. Se continúa la formación del esqueleto carbonado de la toxina gracias a la actividad de una serie de

enzimas PKS, producto de los genes *cyrC*, *cyrD*, *cyrE* y *cyrF*, que en dicho orden producen enzimas PKS. Los genes *cyrG* y *cyrH* codifican para proteínas que intervienen en la formación del anillo de uracilo. A continuación, una hidroxilasa producto de *cyrI*, una sulfotransferasa producto del gen *cyrJ* y una adenilin sulfato quinasa producto del gen *cyrN* finalizan la biosíntesis de CYN. El transporte de la toxina involucraría el gen *cyrK* que codifica para un posible exportador y la regulación de la expresión posiblemente se debe al posible regulador codificado por el gen *cyrO*. El producto de los genes *cyrL* y *cyrM* del *cluster* *cyr* codifican para transposasas.

La caracterización del *cluster* *sxt* para la biosíntesis de saxitoxina (Kellmann *et al.*, 2008) involucra 35 kb que produciría 26 proteínas con 30 funciones catalíticas. El grupo de genes putativos responsables de la síntesis de saxitoxina se ha identificado (Figura 3) y se ha propuesto una ruta biosintética (Wang *et al.*, 2015, Murray *et al.*, 2011, Stucken *et al.*, 2010, Mihali *et al.*, 2009, Moustafa *et al.*, 2009, Kellmann *et al.*, 2008).

Los genomas de *C. raciborskii* secuenciados hasta el momento proceden de cepas de Australia y *Raphidiopsis brooki* de Brasil, los cuales presentan una gran homología entre sí (Sinha *et al.*, 2014, Stucken *et al.*, 2010). Cabe mencionar que esta toxina la producen otras cianobacterias, incluso eucariotas como los dinoflagelados, y que un análisis detallado del *cluster* para dicha toxina nos hace intuir un origen común y reciente (Stucken *et al.*, 2010). En la Figura 3 se muestra el *cluster* de genes de saxitoxina indicado por Kellmann *et al.* (2008) para la cepa T3 de *C. raciborskii*.

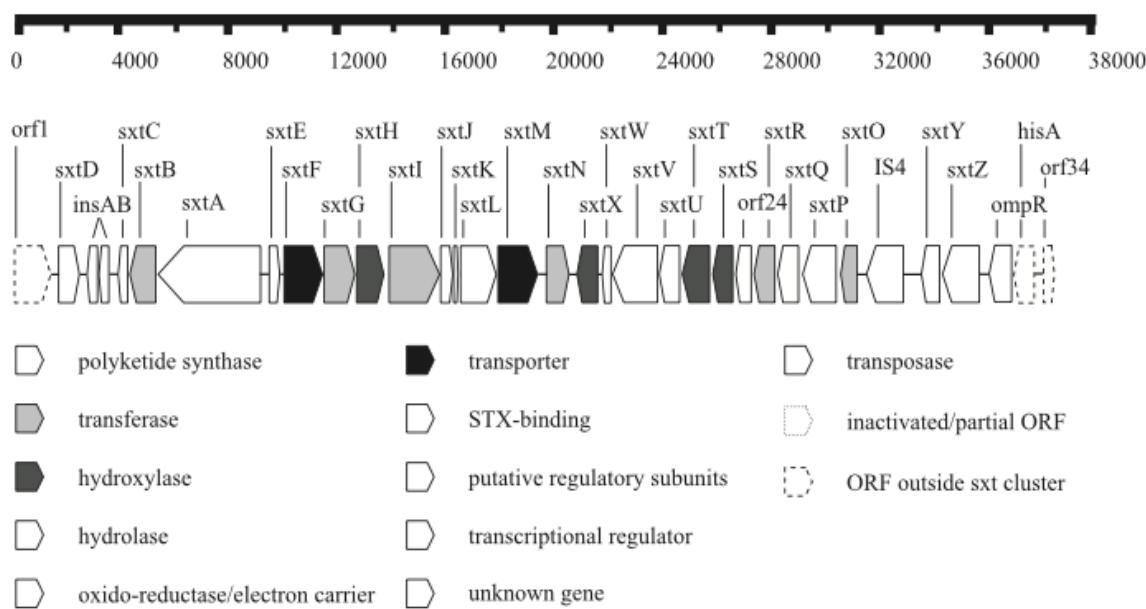


Figura 3 - Organización estructural del *cluster* génico de saxitoxina para *C. raciborskii* T3 (Kellmann *et al.*, 2008).

La biosíntesis de STX es compleja, sin embargo se han descrito los genes putativos para cada una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de SXT, la cual inicia con enzimas PKS, productos del gen *sxtA*, que realiza la metilación de un acetato y la reacción de condensación de Claisen entre propionato y arginina (Figura 4). El primer intermediario producido (A') es entonces sustrato de una enzima amidinotransferasa codificada por el gen *sxtG*, dando lugar al segundo intermediario (B') sobre el cual actúa una enzima citidina desaminasa codificada por el gen *sxtB* para dar comienzo a la formación de tres heterociclos. Para esto el intermediario resultante de la reacción anterior (C') es sustrato de una esterol desaturasa codificada por el gen *sxtD* dando el intermediario (D') sobre el que actúa una enzima multifuncional producto del gen *sxtS* que podría hidroxilar, epoxidar, desaturar y ciclar, y luego una enzima hidrogenasa producto del gen *sxtU* reduce el grupo aldehído terminal del precursor de STX (E').

intermediario (E') para dar lugar al último intermediario (F') en la ruta de biosíntesis de SXT (Figura 4). Cabe mencionar que los homólogos de *sxtI* estan presentes exclusivamente en cepas tóxicas en cuatro géneros de cianobacterias (Kellman et al., 2008). Finalmente, mediante la acción concertada de enzimas producto de los genes *sxtV*, *sxtW*, *sxtH* y *sxtT* se genera a partir del intermediario (F') la molécula de saxitoxina que es a su vez precursora de sus análogos neosaxitoxina (NEO), gonyautoxina 5 (GTX 5), GTX 2/3 y C 1/2 (Soto-Liebe et al., 2010).

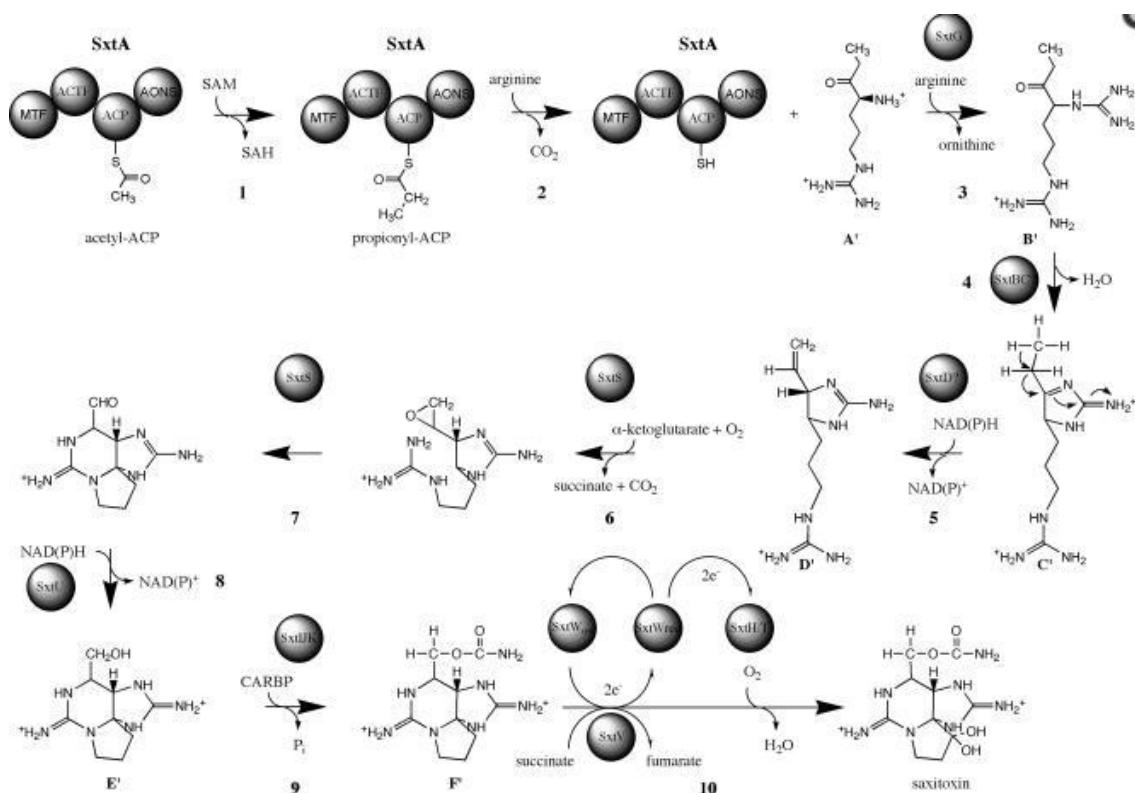


Figura 4 – Ruta de biosíntesis de STX y la posible función de los genes involucrados (Kellman et al., 2008).

¿Pueden las condiciones ambientales estimular la expresión de cianotoxinas?

Se han realizado diversos estudios intentando dilucidar qué factores regulan la expresión de cianotoxinas por las cianobacterias, y especialmente si su síntesis es influenciada por variables ambientales, sin poder arribar a resultados concluyentes. Algunos estudios proponen que la producción de cianotoxinas responde a una síntesis constitutiva en diferentes disposiciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) del medio (Willis *et al.*, 2015, Davis *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2012), mientras que otros estudios sugieren que las condiciones ambientales pueden influir (Burford *et al.*, 2014) (Chislock *et al.*, 2014, Stucken *et al.*, 2010), principalmente durante la fase inicial de crecimiento estimulado por la disponibilidad de N (Vico *et al.*, 2016).

En general, los estudios de la influencia del ambiente sobre la expresión de cianotoxinas han dado resultados contradictorios (Boopathi *et al.*, 2014). Se ha estudiado la influencia de los macronutrientes, como lo son el nitrógeno y el fósforo sobre la expresión de genes *sxt* (Vico *et al.*, 2016, Willis *et al.*, 2015, Burford *et al.*, 2014, Chislock *et al.*, 2014, Davis *et al.*, 2014, Stucken *et al.*, 2014, 2010, Pattanaik *et al.*, 2010, Saker & Neilan, 2001, Saker *et al.*, 1999, Rapala *et al.*, 1997, Lehtimaki *et al.*, 1997, 1994, Sivonen *et al.*, 1990), los micronutrientes (Utkilen & Gjolme, 1995, Lukac & Aegeyer, 1993), la radiación solar (Carneiro *et al.*, 2013, Carey *et al.*, 2012, Schwaderer *et al.*, 2011, Scheffer & Nes, 2007, Rapala *et al.*, 1997, Lehtimaki *et al.*, 1994, Utkilen & Gjolme, 1992, Sivonen *et al.*, 1990) y el crecimiento entre otros (Harland *et al.*, 2015, Davis *et al.*, 2014, Casero *et al.*, 2014, Soto-Liebe *et al.*, 2012, Sivoven & Jones, 1999). Se ha descrito que en condiciones de limitación de nitrógeno, pero con cantidades suficientes de fósforo, prosperan las cianobacterias fijadoras de

nitrógeno que son principalmente del orden Nostocales, ya que son la mayoría de las especies del orden son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Sukenik *et al.*, 2012). Estudios que concluyen que no existiría influencia del ambiente en la expresión resaltan que la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de esta toxina en *C. raciborskii* no estarían regulados a nivel transcripcional (Stucken *et al.*, 2010).

Dado que los estudios realizados hasta el momento no han obtenido resultados concluyentes en conocer si los factores ambientales ejercen influencia en la expresión de cianotoxinas y de qué manera lo hacen, y que existe un notorio incremento de floraciones potencialmente tóxicas en cuerpos de agua uruguayos, se hacen necesarios más estudios sobre el comportamiento de las cepas de *C. raciborskii* de nuestro país. En particular, los estudios que combinan la ecofisiología con la expresión génica brindan nuevas perspectivas para profundizar en el conocimiento de las respuestas de estos organismos a los cambios ambientales y su persistencia en el ecosistema. La disponibilidad de nitrógeno y fósforo influye directamente la fisiología de las cianobacterias tóxicas, y por lo tanto, afecta su capacidad de producir metabolitos como respuesta al estrés nutricional, cuando los nutrientes escasean, o cuando se desencadena el crecimiento exponencial cuando su concentración aumenta. Por este motivo es importante dilucidar el rol de ambos nutrientes en la producción de cianotoxinas.

HIPOTESIS

Se ha sugerido que a pesar de que la molécula de STX contiene 7 átomos de N, la producción de la toxina no estaría vinculada directamente a la disponibilidad y calidad de ese nutriente sino a la tasa de crecimiento de la población (Vico *et al.*, 2016, Stucken *et al.*, 2014, Moinsander *et al.*, 2008).

En base a los antecedentes, la hipótesis de este trabajo propone que la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de STX en *C. raciborskii* no estarían regulados directamente por la disponibilidad de nutrientes.

PREDICCIONES

- 1) Dado que tanto el N como el P son esenciales e imponen restricciones e incluso limitan el crecimiento de las cianobacterias, proponemos que la transcripción de genes *sxt* será mayor en condiciones en las que existe suficiencia de ambos nutrientes para sostener el crecimiento de la población (+N+P).
- 2) En virtud de las diferencias ecológicas y geográficas de las cepas productoras de STX y CYN, los patrones de expresión en presencia y/o ausencia de N y P en ambos casos serán diferentes, reflejando los distintos roles ecológicos de las toxinas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en la transcripción de genes del *cluster sxt* y el *cluster cyr* por cepas uruguayas de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la función y posible regulación por factores ambientales del producto del gen *sxtl* de *C. raciborskii* mediante análisis bioinformáticos.
2. Diseñar *primers* específicos para genes de saxitoxina y cylindrospermopsina, así como el gen para el ARNr 16S de *C. raciborskii*.
3. Poner a punto los *primers* anteriormente diseñados en reacciones de PCR.
4. Detectar y cuantificar la presencia de *sxtl* y *cyrA* en cepas de *C. raciborskii* productoras de saxitoxina y cylindrospermopsina, respectivamente.
5. Conocer la expresión de los genes evaluados en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno y fósforo.

MATERIALES Y METODOS

Análisis *in silico* del cluster *sxt*

Para el estudio de la función y posible regulación del gen *sxtl* en este trabajo nos basamos en una secuencia que corresponde al *cluster* de saxitoxina completo de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (DQ787200.1 del GenBank). Se analizaron los productos de los distintos genes del *cluster sxt* y se empleó la función Protein blast del NCBI para buscar motivos conservados que pudieran determinar una función predicha, la pertenencia a Superfamilias proteicas y la función del representante más conocido de esa familia de proteínas, con énfasis en el gen *sxtl*.

Aislamientos y condiciones de cultivo de *C. raciborskii*

Las cepas uruguayas de *C. raciborskii* utilizadas en este estudio fueron colectadas en enero del 2009 en la Laguna Blanca (34° 53' S, 54° 20' W): aislamiento MVCC14; y en el Lago Javier (34° 51' S, 56° 02' W), aislamiento MVCC19; ambas productoras de STX (Piccini *et al.*, 2013, 2011). También se estudiaron las cepas CCMP1973 de EEUU (Florida) productora de STX y CYP011K de Australia productora de CYN (Hoff-Rissetti *et al.*, 2013). Las cepas nativas fueron aisladas y mantenidas en el cepario de cianobacterias de la Sección Limnología, Facultad de Ciencias.

Las distintas cepas fueron incubadas en botellas conteniendo 200 ml de medio BG11 modificado de Stainer *et al.* (1971) a 26 °C y con un fotoperíodo de luz:oscuridad 16:8 hs. de 60 µmol de fotones m-2 s-1. Los cultivos fueron aireados con burbujeo continuo de aire prefiltrado y humedecido con agua Milli-Q estéril. Las cepas se cultivaron en

cuatro condiciones nutricionales (tratamientos) de deficiencia o suficiencia por Nitrógeno (N), limitación o suficiencia por Fósforo (P) o ambos nutrientes: +N+P, +N-P, -N+P y -N-P, modificando la composición del medio de cultivo BG11. Las concentraciones de estos nutrientes empleadas en el medio de cultivo para el crecimiento de las distintas cepas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1 – Concentración de nutrientes aportados en el medio de cultivo BG11 para los tratamientos de crecimiento de las distintas cepas.

Condiciones nutricionales	Concentración de nitrato como NaNO_3 (mM)	Concentración de fosfato como K_2HPO_4 (μM)
+N+P	17.6	230
+N-P	17.6	10
-N+P	-----	230
-N-P	-----	10

Se evaluó el crecimiento de los cultivos midiendo la turbidez por densidad óptica a 750 nm (espectrofotómetro Thermo Evolution 60), clorofila a y ficocianina por fluorescencia (Aquafluor Turner Designs). Cabe destacar que los cultivos obtenidos se denominan monoespecíficos pero no axénicos, lo cual significa que se desarrolla una única especie de productores primarios (en este caso *C. raciborskii*) pero existen también poblaciones de bacterias heterótrofas principalmente asociadas a la vaina de mucílago que presenta este especie.

Diseño de primers

Se desarrollaron *primers* específicos para los genes *sxtI* (O-carbamiltransferasa involucrada en la síntesis de STX) y para el gen *cyrA* (amidinotransferasa de la ruta biosintética de CYN) también llamados “*aoaA*” por haberse descrito primeramente en *Aphanizomenon* (Tabla 2). Para el diseño de *primers* específicos se realizó una búsqueda de las secuencias nucleotídicas de los genes de interés en el GenBank. Las secuencias se alinearon con el software ClustalX para identificar aquellas partes de las secuencias que estuvieran altamente conservadas. Los *primers* se diseñaron con el software Primer3. Se seleccionaron aquellos que cumplieron con las condiciones necesarias para su aplicación en qPCR-TR, como por ejemplo prevenir amplificación inespecífica, que sus extremos 5’ y 3’ no formen estructuras secundarias, horquillas y homo u heterodímeros, mediante el software OligoAnalyzer de www.idtdna.com.

La especificidad de los *primers* para los genes evaluados se verificó empleando cepas control y secuenciación los productos de PCR (Macrogen Inc. <http://www.macrogen.com/eng/index/>). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el software BioEdit versión 7.1.11 y se utilizó la función “Nucleotide blast” del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para su identificación. Como gen de referencia para el qPCR-TR se emplearon primers para el gen ARNr 16S de cianobacterias, 740F (Hugenholtz *et al.*, 1998) y 809R (Jungblut *et al.*, 2005).

Tabla 2 - Listado de *primers* diseñados y utilizados para el estudio de las muestras.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)	%GC	Tamaño esperado (pb)	Referencia
sxtl1R	CAA ATT CCC GCA GTC ACT CA	55,5	20	50	113	Este trabajo
sxtl1F	CAA CCA GTT CGT GCC TCA AA	55,9	20	50		Este trabajo
sxtl2 R	TGC AGT GGG AGC AGC TTT AG	56,5	20	55	71	Este trabajo
sxtl2 F	GAT CGC CTG CTG TTG AAG TG	56,5	20	55		Este trabajo
aoaA1 R	CCG CTT CAT GAG TTG CTA GA	54,7	20	50	80	Este trabajo
aoaA1 F	GAA CCG CCA AAC TCA AAG AC	54,4	20	50		Este trabajo
aoaA2 R	CTG GAA TGC TGC GCC TAA AC	56,9	20	55	72	Este trabajo
aoaA2 F	TCC ATC GGA CAC TCC CAG AA	56,8	20	55		Este trabajo
740 F	GGCYRWA ^W TGACACTSAGGG	58,6	22	54,5	70	Hugenholtz et al., 1998
809 R	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA	66,9	24	66,7		Jungblut et al., 2005

Lisis celular de cultivos de *C. raciborskii*

El ADN y el ARN de los aislamientos de *C. raciborskii* se extrajeron de acuerdo a un protocolo de Wu et al. (2000) modificado (Piccini et al., 2011). Para el lisado celular se emplearon 50 ml de cultivo fresco de cianobacterias de cada aislamiento. Se centrifugaron a 6000 g por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron las células en 2 ml de buffer contenido Tris 100 mM, EDTA (pH 8) 50 mM y NaCl 100 mM. Luego de incubar 10 min a temperatura ambiente se agregó Sarkosyl a una concentración final de 0.1% y se incubó 60 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 8000 g por 10 min y se lavaron los pellets con 2 ml de buffer TES (50 mM Tris, 5 mM EDTA (pH 8) y 50 mM NaCl. A continuación, las muestras se resuspendieron en buffer

TE conteniendo lisozima a una concentración final de 0,5 mg ml⁻¹ y se las incubó durante 30 min a 37 °C. Se añadió SDS a una concentración final de 1 % y luego de agitar bien y se incubó 10 min a 37 °C. Para finalizar la lisis, se agregó proteinasa K a una concentración final de 50 µg ml⁻¹ y se incubó durante 60 min a 55 °C para ARN y 90 min a 50 °C para ADN. Adicionalmente se ensayaron otros métodos de lisis celular: sonificación, alta temperatura y microondas, los cuales se detallan en Anexos junto con los resultados.

Extracción y purificación de ADN

Para la extracción de ADN, al lisado anterior se le agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló con cuidado y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa se colectó y transfirió a un tubo nuevo para repetir 3 veces la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2/3 volúmenes de NaCl 5M y luego con un volumen de isopropanol y se centrifugó para sedimentar el ADN. Se descartó el sobrenadante y se agregó etanol 70 % frío. Se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 180 µl TE. El ADN obtenido se evaluó mediante gel de agarosa 0,9 % en TBE 0,5 X (110 V 20 min) con 1 Kb DNA ladder (Fermentas) como marcador de tamaño molecular (MP) y mediante espectrofotometría en Nanodrop. El gel fue revelado con bromuro de etidio (1 ug ml/l), dando ADN de buena calidad e íntegro. El ADN se conservó a -20 °C.

Extracción y purificación de ARNm

Se puso a punto el método de extracción de ARN a partir de la lisis química de un cultivo, descripta anteriormente. Las muestras de lisado se centrifugaron a 8000 g 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se procesó a partir del paso 2 del kit AxyPrep Multisource Total RNA MiniprepKit (Axygen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ARN de las muestras se resuspendió en 80 μ l de buffer TE y se determinó su concentración mediante espectrofotometría en Nanodrop y por electroforesis en gel de agarosa 0,9 % en TBE 0,5 X (110 V 20 min) revelado con bromuro de etidio. Una vez verificada su pureza el ARN fue inmediatamente sometido a retrotranscripción (ver más adelante RT-PCR).

PCR de fragmentos de *sxtI* y *cyrA*

Con el fin de confirmar la presencia de genes involucrados en la síntesis de STX y CYN en las cepas en estudio se realizaron amplificaciones de PCR a tiempo final empleando el ADN obtenido y los primers *sxt* y *aoa*, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 25 μ l conteniendo 1,16 X de buffer PCR, 1 U de Taq, 0,15 mM de cada dNTP, 1,75 mM de MgCl₂, 0,6 μ M de cada cebador, 0,44 μ M de seroalbúmina bovina (BSA) y 2 μ l de ADN. Las condiciones de PCR consistieron en un paso inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 20 seg. a 52 °C y 1 min a 72 °C. La extensión final fue de 7 min a 72 °C. Se evaluó la amplificación del PCR mediante gel de agarosa 0,9 % en buffer TBE 0,5 X por 20 min a 110 V con 100 pb DNA ladder (Fermentas) como marcador de tamaño molecular. El gel fue revelado con bromuro de etidio.

Retrotranscripción y generación de ADN copia (RT-PCR)

El ARN obtenido a partir de las muestras se utilizó como material de partida para la producción de ADN copia (ADNc) con el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). El ADNc se evaluó mediante Nanodrop y gel de agarosa 0,9 % TBE 0,5 X (110 V 20 min) con 1Kb DNA ladder como marcador de tamaño molecular. El gel fue revelado con bromuro de etidio. El ADNc obtenido se conservó a -20 °C.

PCR cuantitativo Tiempo Real (qPCR-TR)

La qPCR-TR se puso a punto para cada juego de primers diseñado utilizando el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Para el estudio de expresión se seleccionaron los siguientes pares de primers: sxt1, aoa1 y 740/809 (0,3 μ M de c/u en reacción) y se utilizaron 2 μ l de la dilución 1/10 de los ADNc en un volumen final de 20 μ l. Las muestras fueron analizadas por triplicado. Las condiciones de ciclado empleadas fueron las recomendadas por el fabricante del kit con una temperatura de annealing de 52 °C. Al finalizar se realizó una curva de melting para verificar la especificidad y la eficiencia de la reacción. Los equipos de qPCR-TR utilizados fueron el Rotor Gene 6000 (Corbett Research) y el Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). Se realizaron adicionalmente algunos ensayos a partir de ADN para conocer la sensibilidad de ésta metodología los cuales se describen en Anexos.

Cálculos de cuantificación relativa

La cuantificación relativa de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de las toxinas CYN y STX se basa en los niveles de expresión del ARNm de los genes *cyrA* y *sxt1* respectivamente vs. el ARNr 16S como gen de referencia. La expresión

relativa corrección de eficiencias de amplificación de los juegos de primers se calculó según el modelo propuesto por Pfaffl, MW (2001, 2004) como:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E \text{ target})^{\Delta Ct \text{ target}} (Ct \text{ control} - Ct \text{ muestra})}{(E \text{ ref})^{\Delta Ct \text{ ref}} (Ct \text{ control} - Ct \text{ muestra})}$$

Donde E target es la eficiencia de amplificación de los primers sxt1 y aoa1, y E ref es la eficiencia de amplificación de los primers para el 16S. La eficiencia para cada gen se calcula como $[10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$ y la pendiente se determinó haciendo un pool de ADNc de las muestras, de manera de acumular todos los impactos, positivos y negativos en la cinética de la PCR. A partir de dicho pool se realiza una curva de calibración que actúa como molde de amplificación de los genes de estudio y del gen de referencia en la PCR – TR. La amplificación por PCR – TR permite visualizar la curva de amplificación basada en la medición del cambio de concentración del producto generado como incrementos en la fluorescencia. Estos cambios se miden empleando un parámetro denominado Ct (ciclo umbral) que corresponde al número de ciclos en el cual la señal de fluorescencia cruza el valor umbral. En este trabajo se estudió la expresión de los genes sxtl en distintas condiciones de cultivo en las cepas capaces de expresar la toxina utilizando como control la condición +N+P. De igual forma se realizó el estudio de expresión para cyrA.

Estudio de expresión del gen sxtl por cuantificación relativa en MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 y del gen cyrA en CYP011k

Se estudió la expresión del gen sxtl en distintas condiciones de cultivo en las cepas capaces de expresarla: las cepas MVCC14 Y MVCC19 (originarias de Uruguay) y la

cepa CCMP1973 (originaria de EEUU). Para esto se tomaron muestras de las cepas productoras MVCC14, MVCC19 y CCMP1973, que se mantenían en cuatro condiciones distintas de cultivo variando la disponibilidad de nitrógeno y fósforo. Las muestras crecidas en medio rico en N y P (+N+P) se emplearon como control.

Adicionalmente se realizó una prueba empleando un cultivo de *C. raciborskii* con las características descriptas anteriormente con la salvedad de que en los ensayos se detectó la presencia de protozoarios (flagelados) descritos como depredadores de cianobacterias. Dicho experimento y sus resultados se detallan en Anexos.

RESULTADOS

Análisis del *cluster sxt*

El cluster génico de *sxt* de *C. raciborskii* T3 contiene genes putativos de su biosíntesis que codifican 26 proteínas implicadas en la biosíntesis, regulación y exportación de la toxina. Se analizó en el GenBank el cluster génico completo de *sxt* de *C. raciborskii* T3 (DQ787200.1). La Tabla 3 resume la información obtenida en el GenBank a un listado de genes del cluster *sxt* con la correspondiente proteína predicha para el dominio Bacteria, el número de aminoácidos que posee y, si tienen dominios conservados en la secuencia aminoacídica que la hagan pertenecer a una Superfamilia proteica, se menciona la Superfamilia a la que pertenecen, lo que nos permite dilucidar su función en la ruta de biosíntesis de saxitoxina.

El gen *sxtl* que sintetiza una enzima O-carbamoil transferasa es el que interviene en el penúltimo paso en la formación de saxitoxina, la cual es precursora de los análogos de saxitoxina mediante contadas reacciones posteriores. Los análogos de saxitoxina identificados hasta el momento en *C. raciborskii* T3 son neosaxitoxina (NEO), gonyautoxina 5 (GTX 5), GTX 2/3 y C 1/2 (Soto-Liebe et al., 2010).

Tabla 3 – Listado de genes del cluster *sxt* de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 junto a las proteínas predichas, el número de aminoácidos que la componen y su pertenencia a Superfamilias proteicas obtenidos del GenBank.

Gen	Proteína predicha	Número de aa	Superfamilia
<i>sxtA</i>	Tipo Poliquinasa sintasa (PKS)	1245	Aspartato aminotransferasa Tipo 1 (AAT-I) enzimas dependientes de Piridoxal fosfato
<i>sxtB</i>	Citidina desaminasa	318	Citidino deaminasa con motivo de unión al Zn
<i>sxtC</i>	Proteína hipotética	117	No
<i>sxtD</i>	Esterol desaturasa	252	FA hidroxilasa
<i>sxtE</i>	Chaperona	128	No
<i>sxtF</i>	Tipo proteínas MATE (Familia de extrusión de multidrogas y compuestos tóxicos y proteínas similares)	471	MATE
<i>sxtG</i>	Amidinotransferasa	377	Amindinotransferasa
<i>sxtH</i>	Fenilpropionato deshidrogenasa	334	SRPBCC y Proteínas de Rieske
<i>sxtI</i>	Carbamoil transferasa	612	CmcH-NodU
<i>sxtJ</i>	Proteína hipotética	147	No
<i>sxtK</i>	Proteína hipotética	54	No
<i>sxtL</i>	GDSL lipasa	432	SGNH hidrolasa
<i>sxtM</i>	Tipo proteínas MATE (Familia de extrusión de multidrogas y compuestos tóxicos y proteínas similares)	482	MATE
<i>sxtN</i>	Sulfotransferasa	276	No
<i>sxtO</i>	Adenililsulfato quinasa	200	Nucleotido quinasa
<i>sxtP</i>	Proteína putativa de unión a saxitoxina	408	VCBS
<i>sxtQ</i>	Proteína hipotética	258	No
<i>sxtR</i>	AcilCoA N Acetil transferasa	258	No
<i>sxtS</i>	Fitanoil CoA dioxigenasa	241	20G-Fe oxigenasa
<i>sxtT</i>	Fenil propionato dioxigenasa	334	SRPBCC y Proteínas de Rieske
<i>sxtU</i>	Deshidrogenasa de alcohol de cadena corta similar a clavaldehido deshidrogenasa	249	NADB-Rossman
<i>sxtV</i>	Succinato deshidrogenasa dependiente de FAD	550	NADB-Rossman y Flavoproteína Fumarato reductasa C terminal
<i>sxtW</i>	Ferredoxina	108	Tipo HCP
<i>sxtX</i>	Cefalosporina hidroxilasa	257	S-adenosil metil transferasa dependiente de metionina
<i>sxtY</i>	Regulador del consumo de fosfato	221	Con dominio PhoU
<i>sxtZ</i>	Histidina quinasa	450	Histidino quinasa A y Histidino quinasa tipo, dominio PAS

El alineamiento de la secuencia aminoacídica del producto del gen *sxtl* sugiere que pertenece a la superfamilia Cmch-NodU de carbamoiltransferasas. Esta superfamilia comprende un dominio de la proteína NodU, perteneciente a una proteína involucrada en la síntesis de los factores de nodulación mediante su actividad del tipo 6-O-Carbamoyltransferasa (ornitin-carbamoiltransferasas) en especies del género *Rhizobium* (Jabbouri et al., 1995) y un dominio de Cmch, perteneciente a una proteína involucrada en la síntesis del antibiótico Cefamicina, mediante una actividad 3-hidroximetilcefem-carbamoiltransferasa en *Nocardia lactamdurans* (Coque et al., 1995). En el caso de la proteína NodU es un factor de nodulación que poseen diversas especies de rizobios formadoras de nódulos (Heidstra and Bisseling 1996; Mergaert et al., 1997). Su síntesis está controlada por la proteína NodD, que regula la transcripción de los genes *nod* involucrados en la síntesis, modificación y transporte de factores Nod (uniéndose a una secuencia *upstream* denominada *nod box*). NodD es inducible por compuestos flavonoides exudados por la planta hospedera (Kobayashi et al., 2004). En *Rhizobium* sp., *nodU* codifica para una 6-O-carbamoiltransferasa que modifica la cadena lateral del factor Nod y contribuye a la formación del nódulo en algunas especies de plantas (Jabbouri et al., 1995). En *Nocardia lactamdurans*, el involucramiento de la O-carbamoiltransferasa Cmch en la síntesis de un antibiótico la ubica en el metabolismo secundario del organismo.

Eficiencia de la extracción de ácidos nucleicos y de la retrotranscripción

Los cultivos de partida de *C. raciborkii* sin fósforo tenían 300 µg Clorofila a /litro de cultivo y los cultivos con P tenían 600 µg Clorofila a /litro, equivalente a $2 \text{ a } 4 \times 10^6$

células por mililitro, respectivamente.

Para la extracción de ADN se partió de 10 ml de cultivo y se obtuvieron concentraciones que oscilaron entre 3,0 y 3,2 ng/μl. Para la extracción de ARN se partió de 2 ml y se obtuvieron entre 1,5 y 2,0 ng/μl de ARN. El ADNc obtenido de la retrotranscripción se lo diluyó 1/10 para utilizarlo como molde en la qPCR-TR, dando diluciones que contenían entre 150 y 250 ng/ml.

Detección de genes y ARNm involucrados en biosíntesis de CYN y STX para las cepas estudiadas

En primera instancia se evaluó el ADN de las cepas en estudio (CYP011k, CCMP1973, MVCC14 y MVCC19) con los primers sxtl para detectar la presencia del gen sxtl involucrado en la biosíntesis de STX y con los primers aoaA para detectar la presencia del gen cyrA involucrado en la biosíntesis de CYN. También se evaluó el ADNc de las cepas en estudio con los primers sxtl y los primers aoaA para detectar ARNm; la obtención de un amplicón del tamaño esperado es indicativo de expresión del gen y probablemente de la síntesis de toxina.

Mediante el análisis por PCR final como por qPCR-TR a partir de ADN y ADNc de las cepas CYP011k, MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 empleando los primers sxt se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (se esperaba amplicones de 113 pb con los primers sxtl1 y 71 pb con los primers sxtl2) (Figura 5). En el caso de la cepa CYP011k no se obtuvo el amplicón esperado con los primers sxtl1 y sxtl2 cuando se analizó el ADN y ningún amplicón cuando se analizó el ADNc. Esto nos permite concluir que, las cepas MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 de origen americano son

capaces de expresar STX y la cepa CYP011k de origen australino no es capaz de expresarlo al confirmar que carece de gel *sxtl*. En base a estos resultados se realizó el estudio de expresión del gen *sxtl* en las cepas MVCC14, MVCC19y CCMP1973.

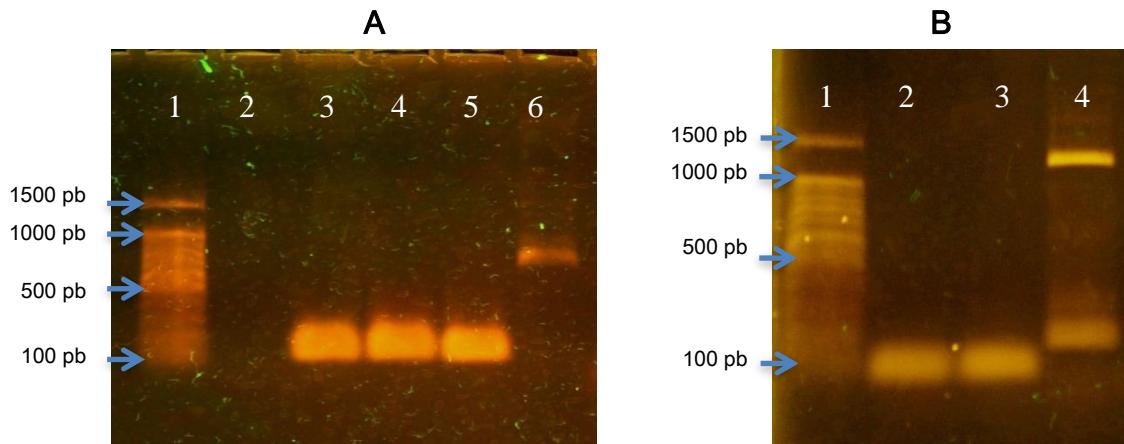


Figura 5 – Electroforesis en gel de agarosa 0,9 % de los amplicones para el gen *sxtl* a partir de ADN de las cepas estudiadas. A: con los primers *sxtl1*; carril 1: MP de 100 pb; carril 2: blanco; carril 3: MVCC14; carril 4: MVCC19; carril 5: CCMP1973; carril 6: CYP011K. B: con los primers *sxtl2*; carril 1: MP de 100 pb; carril 2: MVCC19; carril 3: CCMP1973; carril 4: CYP011K.

El mismo procedimiento que con los *primers sxtl* se realizó con los primers *aoaA* al analizar con ellos el ADN y el ADNc de las cepas CYP011k, MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 por PCR final y qPCR-TR. Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (amplicones de 80 pb con los primers *aoaA1* y 72 pb con los primers *aoaA2*) cuando se analizó el ADN de las cepas MVCC14 y CYP011k como se muestra en la Figura 6. Cuando se analizó el ADNc de ambas cepas, la única en que se obtuvo amplicón fue la cepa CYP011k. Esto podría deberse a que la cepa MVCC14 contengan parte del cluster de *cyr* pero no en su totalidad como se ha constatado en otros trabajos (Hoff-Rissetti *et al.*, 2013, Piccini *et al.*, 2011). Como se esperaba, las cepas de origen

americano no pueden producir CYN, pues se corroboró que MVCC19 y CCMP1973 no poseen el gen *aoaA* y MVCC14 no lo expresa, y la cepa CYP011k de origen australino es la única en este estudio capaz de expresar CYN. En base a estos resultados se realizó el estudio de expresión del gen *cyrA* en la cepa CYP011k.

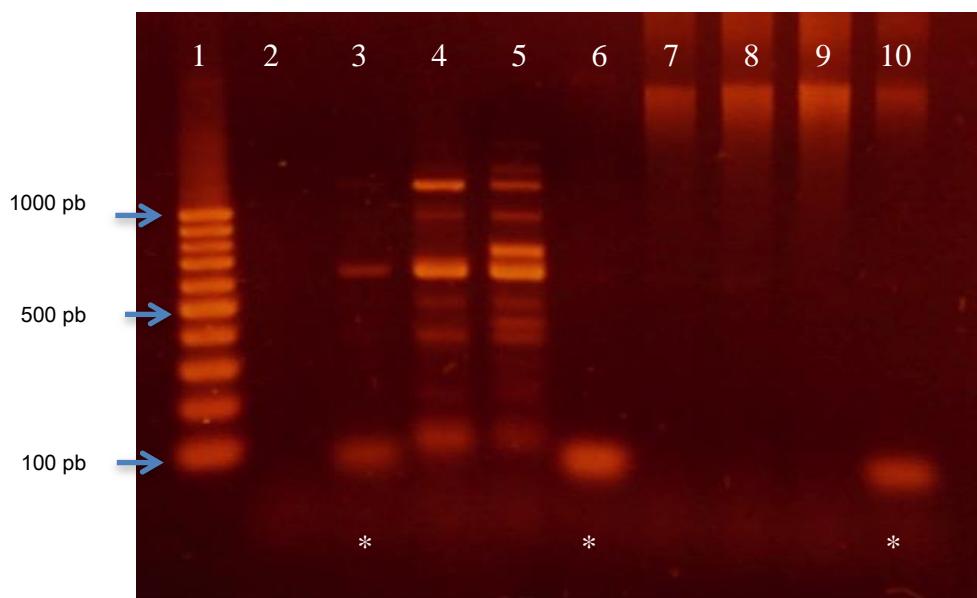


Figura 6 – Electroforesis en gel de agarosa 0,9 % de los amplicones obtenidos con el ADN y el ADNc de las cepas en estudio con los primers *aoaA1*. Carril 1: MP de 100 pb; carril 2: Blanco; carril 3: ADN MVCC14; carril 4: ADN MVCC19; carril 5: ADN CCMP1973; carril 6: CYP011K; carril 7: ADNc MVCC14; carril 8: ADNc MVCC19; carril 9: ADNc CCMP1973; carril 10: ADNc CYP011K. Se observan con * las bandas de tamaño esperado.

Dado que se constató la expresión del gen *sxt* para la biosíntesis de STX en las cepas MVCC14, MVC19 y CCMP1973 y la expresión del gen *cyrA* para biosíntesis de CYN en la cepa CYP011k, se decide realizar el estudio de expresión de cianotoxinas en las cepas de origen uruguayo MVCC14, MVCC19 y norteamericano CCMP1973 con los

primers sxtl1 para STX y la cepa de origen australiano CYP011k con los *primers* aoaA1 para CYN.

Estudio de expresión del gen sxtl por cuantificación relativa en MVCC14, MVCC19 y CCMP1973 y del gen cyrA en CYP011k

Se estudió la expresión del gen sxtl en distintas condiciones de cultivo en las cepas capaces de expresarla: las cepas MVCC14 Y MVCC19 (originarias de Uruguay) y la cepa CCMP1973 (originaria de EEUU). Para esto se tomaron muestras de las cepas productoras MVCC14, MVCC19 y CCMP1973, que se mantenían en cuatro condiciones distintas de cultivo variando la disponibilidad de nitrógeno y fósforo. Las muestras crecidas en medio rico en N y P (+N+P) se emplearon como control. Todas las muestras se analizaron por triplicado en qPCR-TR. Las eficiencias del gen en estudio y del gen de referencia resultaron distintas entre sí; la eficiencia de los primers sxtl1 fue = 1 y la eficiencia de los primers para el 16S fue de 0,92 y las figuras de las curvas de amplificación se encuentran en Anexos.

El resultado del estudio de expresión de la cepa MVCC14 en qPCR-TR se muestra en la Figura 7 y la Figura 8; los resultados de las demás cepas se visualizaron de igual forma por qPCR-TR. Los resultados de expresión del gen sxtl para las distintas las cepas uruguayas y la cepa americana se encuentran en la Tabla 4.

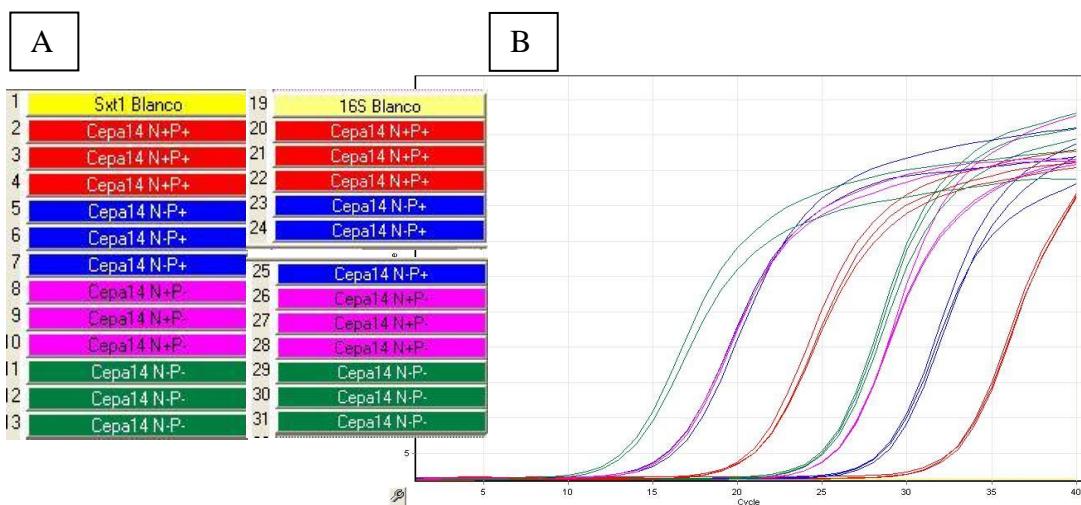


Figura 7 - Amplificación en qPCR-TR de la cepa MVCC14 en las distintas condiciones nutricionales estudiadas con primers sxt1 y 16S. A: listado de las muestras analizadas y sus réplicas con los distintos primers. B: imagen de la amplificación de las muestras analizadas en tiempo real conservando los colores de referencia de A.

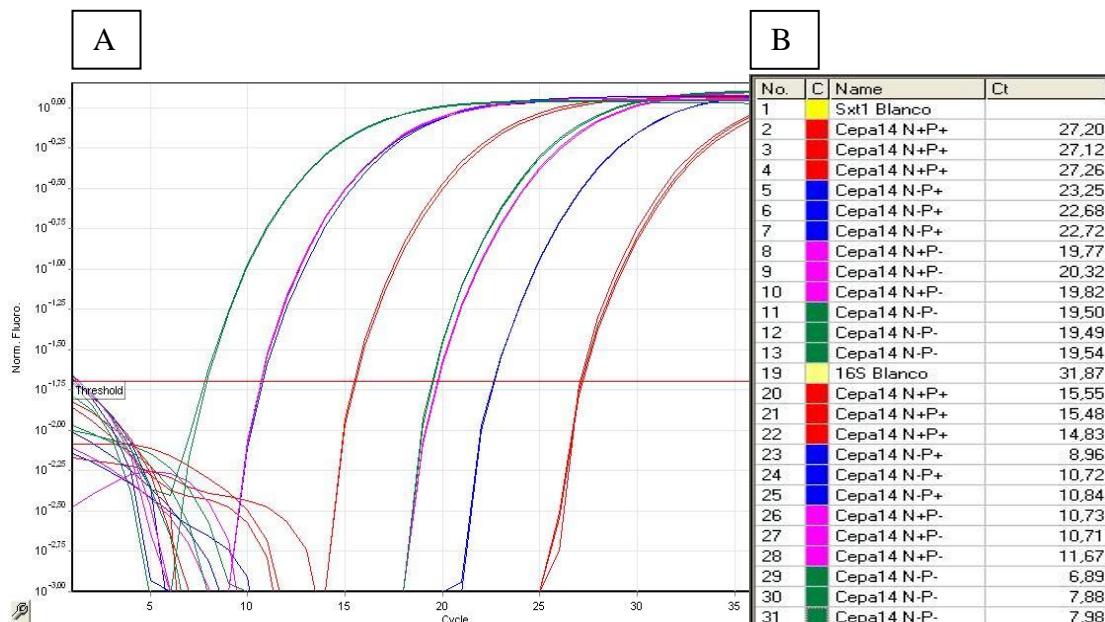


Figura 8 - Determinación de los Cts para las muestras de MVCC14 en las distintas condiciones nutricionales para el estudio de expresión de sxt1. A: Amplificación de las muestras analizadas y sus puntos de corte del valor umbral. B: representación de los puntos de la curva de calibración para determinar la eficiencia de los primers sxt1. Se conserva la asignación de colores de la Figura 8.

Tabla 4 – Resultados de expresión de sxtl para las cepas en estudio en las distintas condiciones nutricionales. En negrita se destacan las condiciones que fueron consideradas como control para cada cepa. Con letra itálica igual se agrupan las muestras que no presentan diferencias significativas en su expresión.

Muestra	Prom Ct Sxt1	Prom Ct 16S	Expresión
Cepa MVCC14 +N+P	27.19	15.29	1 a
Cepa MVCC14 –N+P	22.88	10.17	0,31 b
Cepa MVCC14 +N-P	19.97	11.04	0,26 b
Cepa MVCC14 –N-P	19.51	7.58	0,14 a
Cepa MVCC19 +N+P	24.04	9.97	1 c
Cepa MVCC19 –N+P	23.60	8.88	1,30 d
Cepa MVCC 19 +N-P	26.05	10.71	0,93 c
Cepa MVCC 19 –N-P	22.88	11.66	1,43 d
Cepa CCMP1973 +N+P	18.99	8.61	1 e
Cepa CCMP1973 –N+P	22.99	7.59	10,5 f
Cepa CCMP1973 +N-P	22.51	9.68	3,58 g
Cepa CCMP1973 –N-P	23.49	8.09	7,75 h

Dado que los datos no mostraron una distribución normal cuando se analizaron estadísticamente, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis a los datos de expresión del gen sxtl. Cuando se estudió la cepa MVCC14 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos +N+P, -N-P y por otro lado -N+P y +N-P. Para la cepa MVCC19 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos que contienen N de los que no. Sin embargo, para la cepa CCMP1973 se observaron diferencias significativas en la abundancia de transcriptos sxtl entre todos los tratamientos (Figura 9). Al analizar las diferencias en la expresión relativa de sxtl para cada cepa entre tratamientos en conjunto (Figura 10) se observó que ambas cepas de Uruguay tuvieron niveles similares de expresión relativa de sxtl en todas las condiciones nutricionales, cuando se las comparó con CCMP1973, que presentó un nivel de expresión significativamente mayor (Figura 11) y diferencias significativas entre todos

los tratamientos, si bien las tendencias observadas para MVCC19 y CCMP1973 fueron similares.

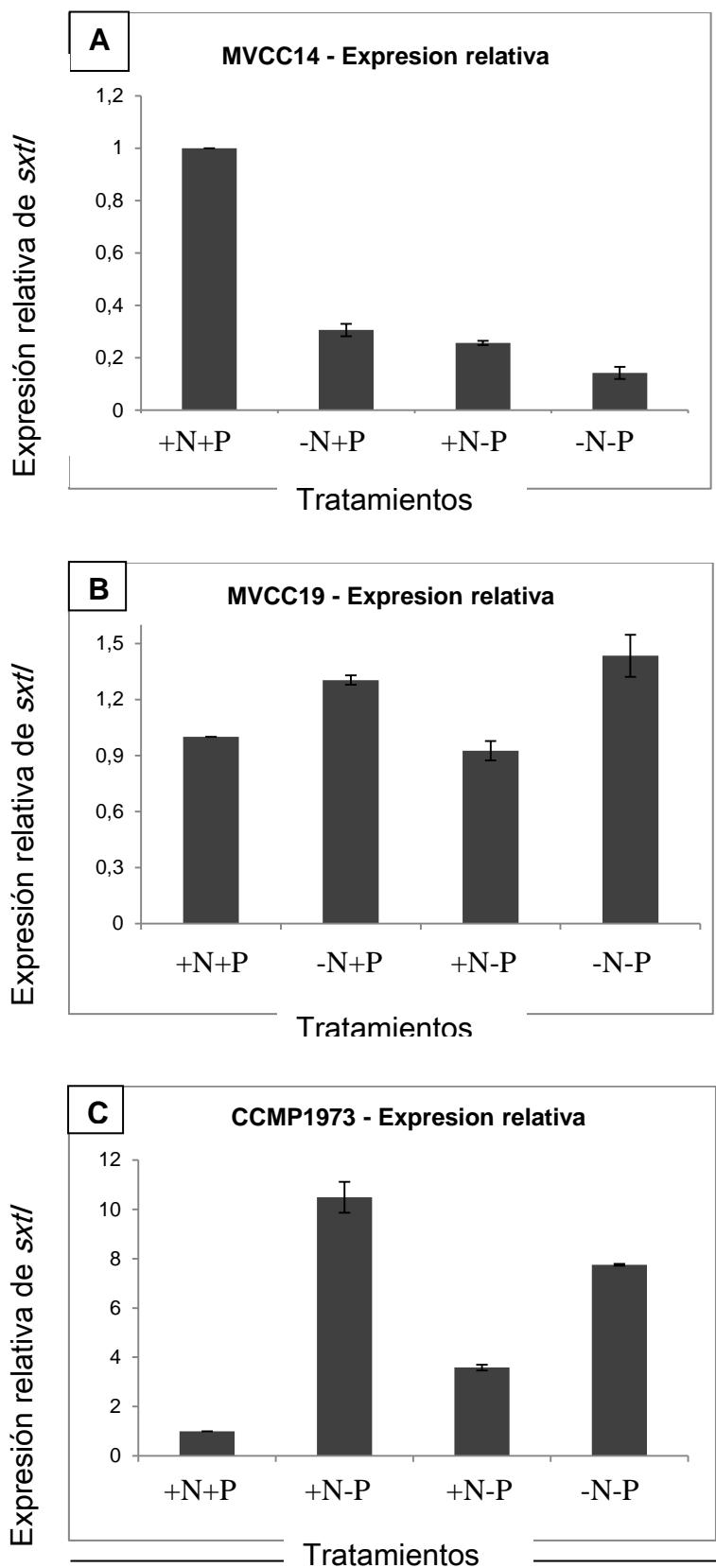


Figura 9 - Expresión de *sxtl* en los distintos tratamientos de las cepas MVCC14 (A), la cepa MVCC19 (B) y la cepa CCMP1973 (C). El tratamiento +N+P que fue utilizado como control para calcular la eficiencia tiene valor 1.

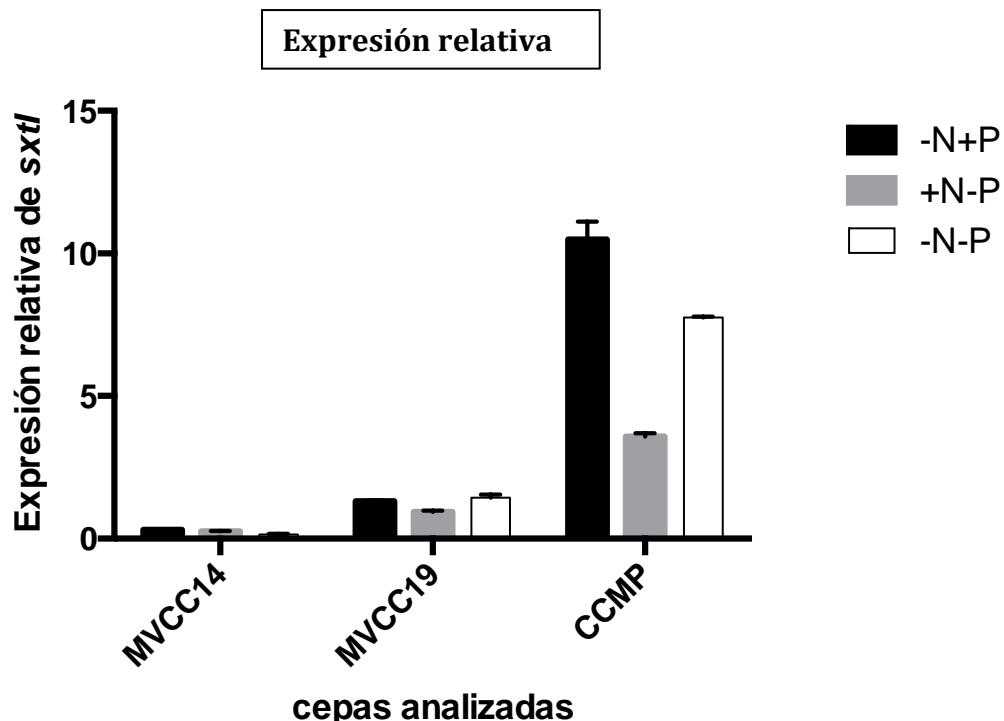


Figura 10 – Expresión relativa de *sxtl* comparada entre todas las cepas y todos los tratamientos en relación al tratamiento control +N+P.

Estudio de expresión del gen *cyrA* por cuantificación relativa en la cepa CYP011k

Se estudió la expresión del gen *cyrA* en distintas condiciones de cultivo en la cepa capaz de expresar: la cepa CYP011k (originaria de Australia). Se tomaron muestras de esta cepa crecida en medios de cultivo con distinta disponibilidad de nitrógeno y fósforo, de igual forma que se realizó para el estudio de las cepas productoras de STX. La muestra crecida en medio rico en N y P (+N+P) se empleó como control. Todas las muestras se analizaron por triplicado en qPCR-TR. La eficiencia del gen en estudio y del gen de referencia fueron distintas; la eficiencia de los primers *aoaA1* fue de 1,4 y la eficiencia de los primers para el 16S fue de 1,12. En la Tabla 5 y en la Figura 11 se muestran los resultados de expresión del gen *cyrA* obtenidos para la cepa CYP011K en las distintas condiciones nutricionales estudiadas.

Tabla 5 – Resultados de expresión del gen *cyrA* para la cepa CYP011K en las distintas condiciones nutricionales estudiadas. En negrita se muestra la condición considerada como control. Con letras itálicas distintas se indica las muestras con diferencias significativas en su expresión en relación al control.

Condición nutricional	Prom Ct <i>cyrA</i>	Prom Ct 16S	Expresión
+N+P	12,13	23,61	1 <i>a</i>
-N+P	10,96	24,01	0,65 <i>b</i>
+N-P	27,37	26,68	119 <i>c</i>
-N-P	17,88	24,36	6,36 <i>d</i>

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *cyrA* en la cepa CYP011k fue significativamente distinta entre todos los tratamientos. La expresión de *cyrA* entre tratamientos aumenta en el orden: -N+P, +N+P, -N-P y +N-P. Esto nos indica que la expresión se incrementa significativamente cuando hay deficiencia en P (-N-P), si además el medio contiene N la expresión se incrementa significativa y considerablemente (+N-P); un comportamiento diferente al observado para la expresión de *sxtl* mostrada por las cepas productoras de STX.

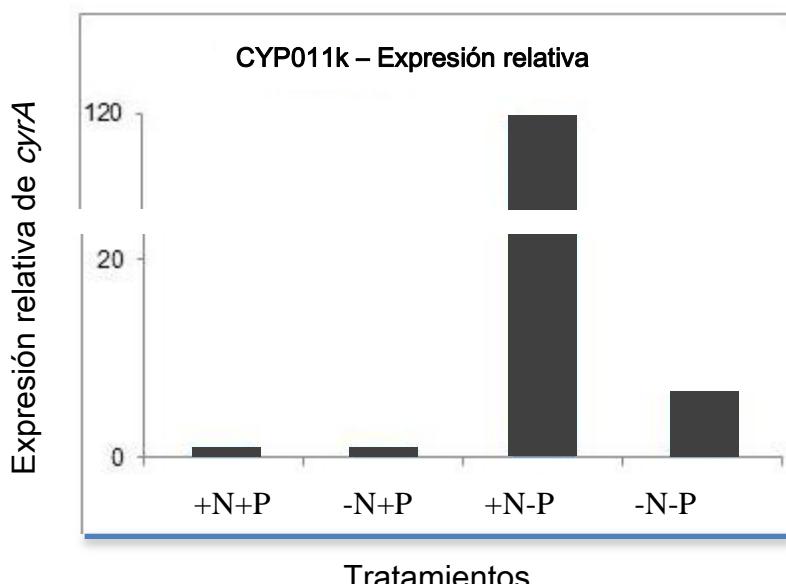


Figura 11 - Expresión de *cyrA* en los distintos tratamientos de las cepas CYP011k tomando el tratamiento +N+P como control.

DISCUSIÓN

En esta tesis se evaluó la influencia de la disponibilidad y concentración de nitrógeno y fósforo sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de toxinas en *C. raciborskii*. Dado que *C. raciborskii* que es capaz de sintetizar dos tipos de toxinas: saxitoxina o cylindrospermopsina, el conocimiento de los factores ambientales que regulan la síntesis de dichas toxinas es de vital relevancia para conocer y predecir en qué condiciones las poblaciones (y floraciones) de *C. raciborskii* serán más o menos nocivas.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, las cepas no pueden sintetizar ambas toxinas simultáneamente, sino que existen cepas con capacidad de producir saxitoxina y análogos y otras con capacidad de producir cylindrospermopsina (Carloto *et al.*, 2015, Stucken *et al.*, 2009). Se ha visto que ambos tipos de cepas pertenecen a distintas regiones geográficas, observándose un patrón de toxicidad. En el caso de las cepas aisladas de las Américas, se ha determinado que son capaces de producir saxitoxinas, mientras que cepas de Australia y Asia son productoras de cylindrospermopsina (Sinha *et al.*, 2012, Piccini *et al.*, 2011, Gugger *et al.*, 2005, Neilan *et al.*, 2003). En este trabajo, se evaluó la expresión del gen *sxtl*, involucrado en la síntesis de saxitoxinas en cepas de origen americano (MVCC14, MVCC19 y CCMP1973), así como la expresión del gen *cyrA* en una cepa de origen australiano (CYP011K).

Análisis bioinformático del gen *sxtI*

En el caso del gen perteneciente al cluster *sxt*, se seleccionó *sxtI*. Dicha elección se basó en el conocimiento del cluster, cuya descripción se basó en la amplificación y secuenciación de *sxtI*, a partir del cual se comenzó a caracterizar el cluster completo (Kellman et al., 2008). Se realizó un análisis bioinformático de *sxtI* con el fin de identificar genes homólogos cuyos productos proteicos hayan sido estudiados desde el punto de vista funcional, ya que no existe tal clase de información para *sxtI*. Cuando se comparó la secuencia de *sxtI* con la base de datos de GenBank, las proteínas que poseían homología con su secuencia pertenecieron a un factor de nodulación (NodU) y una enzima involucrada en la síntesis de antibióticos (CmcH) en rizobios y *Nocardia*, respectivamente. En ambos casos, las O-carbamoiltransferasas están involucradas en mecanismos diferentes, en el primero son fundamentales para el diálogo bacteria-hospedero (para poder efectuar la nodulación y llegar al estado de simbionte) y en el segundo está involucrada en la síntesis de un metabolito secundario. La presencia del grupo carbamoil en una variedad de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Brufani et al., 1971), tales como las cianotoxinas, es un hallazgo interesante. Se ha descrito la existencia de dos subfamilias de O-carbamoiltransferasas (a y b), cuya evolución presenta diversos procesos de duplicación y perdida selectiva de copias durante sucesivas especiaciones. Asimismo, se ha propuesto que en el dominio Bacteria ocurrieron múltiples transferencias genéticas horizontales que han dado origen al actual panorama (Labedan et al., 1999). Los datos obtenidos a partir de las enzimas relacionadas al producto del gen *sxtI* confirmaron por tanto su afiliación al grupo de las ornitín carbamoiltransferasas, aunque hasta el momento no existe información relacionada a la regulación génica de NodU o CmcH por nutrientes

directamente. Lo que sí es sabido es que el gen *nodU* pertenece al *cluster nod* en rizobios, y forma parte del operón *nodSUIJHPQ*. Además, el gen *nodU* es inducible por la isoflavaona daidzeina y depende de la transcripción de una región lejana *upstream* en el ADN (Gottfert *et al.*, 1990). Por otro lado el gen *cmcH* pertenece dentro al *cluster* génico de cefamicina C, el cual se sintetiza de forma policistrónica (Ozcengiz *et al.*, 2013). El *cluster* se expresa como 3 ARNm a partir de una región promotora bidireccional en el espacio intergénico (promotor *pcbAB*) o a partir de un promotor dentro del gen *lat* (promotor *lat*). Se sabe que *pcbAB* es reprimida por amonio en *P. chrysogenum* aunque no es así en *A. nidulans*. Por tanto, los hallazgos obtenidos mediante el análisis bioinformático indican que existe evidencia genética de que el nitrógeno puede ser regulador de la expresión génica.

Diferencias entre tratamientos: preferencias ambientales de cada cepa

Cuando se analizaron las diferencias en la expresión relativa de *sxtl* para cada cepa entre tratamientos se encontró que, globalmente, ambas cepas de Uruguay tuvieron similares niveles de expresión relativa de *sxtl* en todas las condiciones nutricionales analizadas, si bien MVCC19 mostró una expresión mayor en las condiciones donde el nitrógeno inorgánico no estaba disponible, mientras que en MVCC14 la tendencia que mostró la expresión de *sxtl* fue disminuir levemente cuando ninguno de los dos nutrientes (N y P) estaban en condiciones de alta disponibilidad. Por otro lado, la cepa de origen norteamericano (CCMP1973) presentó diferencias significativas entre todos los tratamientos, aunque es interesante destacar que las tendencias observadas para MVCC19 y CCMP1973 fueron similares, es decir una mayor expresión de *sxtl* en -N.

En paralelo a este trabajo se realizó otro estudio por Martigani (2012), empleando las cepas de *C. raciborskii* de Uruguay y las mismas condiciones de cultivo que las empleadas en esta tesis. En dicho trabajo se cuantificaron las toxinas mediante ELISA en cada condición nutricional y se observaron resultados similares a los obtenidos aquí (Tabla 6), es decir, en las condiciones que favorecen la transcripción de *sxtl* también se detectó mayor concentración de saxitoxina y análogos.

Tabla 6 – Producción de saxitoxina y análogos por *C. raciborskii* determinada por ELISA en distintas condiciones nutricionales (Martigani, 2012). En negrita se señalan las condiciones en las que MVCC19 también mostró mayores niveles de expresión de *sxtl* (deficiencia de nitrógeno disuelto).

STX (fg/cel)	-N-P	-N+P	+N-P	+N+P
MVCC14	1.55	1.82	2.95	1.09
MVCC19	8.11	3.25	0.82	0.02

En relación al nitrógeno inorgánico y la síntesis de toxinas Stucken et al. (2010) encontraron en el cluster *sxt* presente en el genoma de *Raphidiopsis brooki* D9, cepa productora de saxitoxina y análogos, cajas de unión a NtcA (NtcA-boxes), el principal regulador del metabolismo del nitrógeno. Esto llevó a pensar que el nitrógeno tendría un rol importante en la regulación de la expresión de los genes con NtcA-boxes. Sin embargo, la cuantificación de toxinas y de transcriptos de genes *sxt* reveló una transcripción constitutiva en todas las condiciones de suficiencia de nitrógeno evaluadas (Stucken et al., 2014). De manera similar, la relación entre la producción de saxitoxinas y el nitrógeno ha sido estudiada en *C. raciborskii* MVCC19 por Vico et al.

(2016), quienes encontraron que la expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de dichas toxinas no variaba en relación a la presencia de nitrógeno en el medio, sino a la tasa de crecimiento, apuntando a una expresión constitutiva del cluster. Así, podemos hipotetizar que, en *C. raciborskii*, la síntesis de STX incrementará en cualquier condición que provoque un aumento en la tasa de crecimiento. En este trabajo no contamos con las tasas de crecimiento desarrolladas por cada cepa en cada condición, por lo que no podemos contrastar esta hipótesis.

Como se mencionó anteriormente, *C. raciborskii* es una especie diazótrofa, es decir que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Por tanto, la ausencia de formas disueltas de nitrógeno en el medio no significa necesariamente que se encuentre en condiciones de deficiencia de nitrógeno y los tratamientos -N (-N+P y -N-P) quizás no fueran deficientes en dicho nutriente, sino más bien reflejen leves diferencias en la disponibilidad de nitrógeno. Asimismo, Amaral et al. (2014) mostraron que en condiciones de deficiencia de P en el medio, *C. raciborskii* MVCC19 y CCMP1973 mostraron una gran flexibilidad fisiológica, adaptándose a la disponibilidad del nutriente en escalas de tiempo de minutos. Esto sugiere que la especie posee la capacidad de optimizar su crecimiento en condiciones de fluctuación de la disponibilidad de P. En esta tesis, se encontró que la expresión de *sxtl* fue mayor en ausencia de N disuelto y cuando había fósforo disponible en el medio (-N+P), lo que hace pensar que las células poseerían la energía necesaria para mantener la maquinaria celular (incluyendo mecanismos de fijación de nitrógeno), mientras que en deficiencia de ambos nutrientes (-N-P), aunque el crecimiento es posible debido a su adaptabilidad se restringiría la síntesis del ATP necesario para los procesos metabólicos y por ende la expresión será menor que en -N+P.

Más allá de las hipótesis generadas a partir de los resultados, la evidencia obtenida hasta el momento apunta a que no existiría una regulación génica del cluster *sxt* dada por los nutrientes en sí, sino que la expresión aparenta ser constitutiva y depender de la capacidad de crecimiento de las cepas.

Se ha sugerido que la STX tiene un rol de protección extracelular para asegurar la homeostasis frente a cambios en las condiciones de salinidad. Pomati *et al.* (2004) mostraron que *C. raciborskii* T3 acumulaba neurotoxinas de manera lineal como respuesta a concentraciones crecientes de NaCl extracelular. De manera similar, Soto-Liebe *et al.* (2012) demostraron que *R. brookii* D9 era capaz de exportar la toxina en respuesta a altas concentraciones de cationes monovalentes (Na+, K+) y encontraron dos genes putativos del *cluster sxt* (*sxtF* y *sxtM*) que codifican para compuestos tipo MATE (multidrug and toxic compound extrusion). Recientemente, Ongley *et al.* (2016) analizaron el efecto de valores de salinidad bajos y mostraron que la expresión de los genes *sxtA*, *sxtF* y *sxtM* aumentaba en presencia de NaCl 10 mM (lo cual equivale a aprox. 0.58 g/L de NaCl) en relación a 0 mM, lo que evidencia la capacidad reguladora de la producción de STX. En ambos casos se trata de variaciones de escenarios dulceacuícolas de concentración de sales, remarcando nuevamente la plasticidad de esta especie para adaptarse a cambios ambientales, incluso sutiles.

Diferencias globales entre cepas - hipótesis de ecotipos de *C. raciborskii*

Cuando se evaluó la producción de transcriptos del gen *sxtI*, se encontraron diferencias entre las dos cepas aisladas de lagos de Uruguay (MVCC14 y MVCC19).

Estos resultados, conjuntamente con hallazgos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Piccini *et al.*, 2011), confirmarían la hipótesis de que ambas cepas pertenecerían a distintos ecotipos con diferentes preferencias ambientales. La existencia de ecotipos se ha descrito para varios taxones bacterianos. Existe cada vez más evidencia que indica que las poblaciones microbianas naturales estarían compuestas por varios ecotipos, constituidos por un clado de organismos que comparten características ecológicas. La diversidad genética dentro de un ecotipo dado estaría dada por fuerzas de cohesión, tales como deriva genética y/o selección periódica (Cohan, 2005). Así, se han encontrado ecotipos para algunas especies tales como la cianobacteria unicelular *Prochlorococcus* (Moore *et al.*, 1998), en bacterias del clado SAR11 (Carlson *et al.*, 2009) y para la bacteria marina *Alteromonas macleodii* (Ivars-Martinez *et al.*, 2008). En todos esos casos se encontraron diferentes ecotipos con preferencias ambientales divergentes, incluyendo diferencias en la profundidad en la que se encuentran en la columna de agua, la intensidad de luz óptima, concentración de nutrientes y fuentes de materia orgánica. Si bien aún se desconocen los mecanismos que subyacen en la prevalencia de un ecotipo sobre otro, deben involucrar adaptaciones fisiológicas (Carlson *et al.*, 2009). La dispersión mundial de *C. raciborskii* sugiere la existencia de múltiples ecotipos con diferentes fisiologías, lo cual explicaría el éxito de la especie en ambientes tan diversos. En este sentido, Saker y Neilan (2001) distinguieron diferentes ecotipos de *C. raciborskii* en base a sus tasas de crecimiento y a la producción de CYN bajo estrés por nitrógeno. Más aún, Chonudomkul *et al.* (2004) describieron ecotipos de la especie con diferente tolerancia a temperatura. Por ende, el hallazgo de diferentes respuestas de expresión de *sxt*/a la disponibilidad de nutrientes en cepas que han sido propuestas como diferentes

ecotipos sería esperable.

Por otro lado, se ha descrito que la función de la O-carbamoiltransferasa codificada por *sxtI* es catalizar la transferencia de un grupo carbamilo a un grupo hidroxilo libre del intermediario E' (el cual es el último intermediario detectable en la síntesis de STX y análogos) para producir la molécula de STX (Kellman *et al.*, 2008). Recientemente, Soto-Liebe *et al.* (2010) propusieron una extensión de la vía a partir de E' para producir GTX2 y GTX3 a partir de STX, involucrando la acción de las enzimas codificadas por *sxtN*, *sxtX* o *sxtSUL*. Por tanto, en *C. raciborskii* productoras de STX debido a la presencia del *cluster sxt*, la producción de los análogos GTX se realizaría a partir de la molécula de STX. Este hallazgo concuerda con el perfil de toxicidad que poseen ambas cepas, ambas capaces de producir tanto saxitoxina como GTX1 y GTX3 (Piccini *et al.*, 2011). Más aún, en el caso de MVCC19 se detectaron concentraciones de GTX1 y GTX2 un orden de magnitud mayores a las detectadas para MVCC14, ambas incubadas en las mismas condiciones de crecimiento (Piccini *et al.*, 2011). De manera similar, la expresión relativa de *sxtI* en MVCC19 mostró valores significativamente mayores a MVCC14 en todas las condiciones evaluadas, sugiriendo que ambos ecotipos también presentan diferencias a nivel del metabolismo de las toxinas entre ambas cepas. Dada la función del producto del gen analizado (enzima O-carbamoiltransferasa que cataliza la conversión de E' en saxitoxina) y los resultados obtenidos de los estudios de su expresión, cabría especular que en las condiciones evaluadas MVCC19 produciría mayor concentración de saxitoxina y GTX que MVCC14, fortaleciendo la hipótesis de los distintos ecotipos con diferencias metabólicas y de preferencias ambientales. Lamentablemente, en este trabajo no se pudieron analizar las concentraciones de las distintas variantes de STX y análogos ni

la relación entre éstos durante el crecimiento, ya que se requiere de otros métodos analíticos no empleados aquí. En el caso del aislamiento proveniente de América del Norte (Florida, USA), se encontró que la expresión relativa del gen *sxt*/ en la cepa CCMP1973 fue significativamente mayor en relación a las cepas uruguayas en todas las condiciones nutricionales evaluadas. Este hallazgo podría estar relacionado a la adaptación de dicho aislamiento a condiciones ambientales diferentes a las encontradas por los aislamientos de origen nativo.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y a los antecedentes analizados se concluye que la expresión de los genes *sxt* no depende del N ni del P, sino que las variaciones en su expresión se deben a la diferente actividad metabólica durante el crecimiento de la cianobacteria. Además, se evidenció la existencia de distintos ecotipos de *C. raciborskii* en relación a la expresión de *sxt* para las distintas condiciones nutricionales de N y P estudiadas, confirmando hallazgos previos basados en distintas preferencias ambientales (Piccini et al., 2011). Teniendo en cuenta que STX podría estar involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular, cabe suponer que ante distintas condiciones de salinidad las distintas cepas responderán de forma diferente.

Evaluación de la expresión del gen *cyrA* – involucrado en la síntesis de cylindrospermopsina

Cuando se analizaron las diferencias en la expresión relativa de *cyrA* para la cepa CYP011k se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Se observó un aumento en la expresión cuando los medios contenían bajo P y la

magnitud de la expresión de *cyrA* se incrementaba sustancialmente cuando además contenía N el medio (+N-P). Mihali et al. (2008) encontraron que el cluster *cyrA* presente en el genoma de *C. raciborskii* se encuentra flanqueado por los genes *hyp*, que se piensa están bajo el control del gen *ntcA*, que es un gen de regulación global de N. Esto hizo pensar en que el N y la síntesis de toxinas estarían relacionados. En base a esto se ha investigado el efecto del N en la expresión de CYN en *C. raciborskii* y otras cianobacterias productoras de esta toxina. Por ejemplo, Willis et al. (2015) observaron que al variar las concentraciones de N y P del medio de crecimiento de 3 cepas de *C. raciborskii* productoras de CYN, la concentración intracelular de la misma se mantenía constante, sugiriendo una expresión constitutiva e independiente del N o P del medio. Asimismo, estos autores encontraron que el nivel de producción de CYN variaba según la cepa. Los resultados también mostraron el mayor nivel de crecimiento en medio sin P sugiriendo que las reservas intracelulares del mismo antes de comenzar el experimento son suficientes para sustentar el crecimiento por al menos 10 días, lo cual es consistente, lo cual es consistente con su gran capacidad de almacenamiento de P pudiendo alcanzar altas concentraciones celulares en cuerpos de agua con valores en el límite de detección de P. Por otro lado, Davis et al. (2014) estudiaron la producción de CYN durante el ciclo celular y también concluyeron que la producción de CYN es constitutiva y que además la cantidad de CYN en la célula depende de la cepa. En otro estudio, Stucken et al., (2014) estudiaron la expresión de *cyr* y *sxt* y la producción de CYN y STX y sus análogos bajo distintas condiciones nutricionales de N, concluyendo que este nutriente no tendría efecto alguno ni en la expresión ni en la producción de ambas toxinas. La cuantificación de las toxinas y transcriptos reveló que la transcripción es constitutiva bajo los distintos tratamientos de

N y apoyaron la hipótesis de que la biosíntesis está directamente asociada al crecimiento celular. Aunque en Pierangelini et al. (2015) no estudiaron macronutrientes sino el efecto de distintas intensidades lumínicas y la presión parcial de CO₂ sobre *cyrA* en *C. raciborskii* y observaron que ninguno de ellos ejerce influencia en la expresión de dicho gen, concluyeron también que la cantidad global de CYN es constante y que la cantidad en la célula es fija al estar la producción de CYN acoplada a la división celular. El hecho que la cantidad de CYN en la célula sea fija y que este valor dependa de la cepa ya había sido descrito por Orr et al. (2010) y Davis et al. (2014). Adicionalmente, en Pierangelini et al. (2015) se teorizó que la ausencia de relación entre la expresión de *cyrA* y la cantidad de CYN en la célula se debe a regulación post-transcripcional de la biosíntesis de CYN. En nuestro trabajo se observó, al igual que en los trabajos mencionados anteriormente, independencia entre la síntesis de CYN y la concentración de N en el medio, hecho que sustenta que CYN se produciría constitutiva e independiente de los factores ambientales.

Como se mencionó anteriormente, existen trabajos recientes que constatan una independencia del N y del P en la producción de CYN, la cual concluyen se produce constitutivamente, por lo que los aumentos en la cantidad de toxina están relacionados al crecimiento celular. Sin embargo, Burford et al. (2014) observaron que cuando se probaron diferentes disponibilidades de N y P en el medio, la cantidad de CYN en la célula aumentaba, particularmente cuando se agregaba P al medio, en condiciones de ausencia o suficiencia de N, y que no se relacionaba con el crecimiento sino al aumento en el número de copias de genes *cyr* con respecto al 16S en poblaciones dominantes de *C. raciborskii*. Encontraron un efecto distinto de los nutrientes sobre la división celular que se refleja en las poblaciones dominantes.

otro lado, se ha reportado que en la cianobacteria *Aphanizomenon ovalisporum* (orden Nostocales) la expresión de CYN aumentaría en condiciones de insuficiencia de P e independientemente del N (Bar-Yosef et al., 2010). En base a evidencia experimental estos autores postulan que en condiciones de insuficiencia de P se activaría la producción de CYN, la que tendría un rol de estimulación de la actividad fofatasa de otros fitoplanctontes de la comunidad natural, y por lo tanto, le permitiría a la cianobacteria acceder al P de los demás de forma energéticamente menos costosa. Los hallazgos realizados en esta tesis irían en el mismo sentido, es decir que en condiciones de suficiencia del otro macronutriente (N) y deficiencia de P la toxina sería producida y liberada para obtener fosfato de los demás fitoplanctontes. Sin embargo, cabe mencionar que existe una diferencia entre *A. ovalisporum* y *C. raciborskii* en relación al metabolismo del P y es que la primera es capaz de almacenar P en forma de gránulos de polifosfato. Por tanto, el rol propuesto para la CYN en esta especie podría no tener el mismo significado ecológico que para *C. raciborskii*. Como mencionamos antes, en este trabajo no se pudieron analizar las concentraciones de CYN ni su relación durante el crecimiento, por lo que no es posible confirmar la hipótesis de Bar-Yosef et al. (2010) en relación al rol de dicha toxina.

Se han citado en este trabajo variadas hipótesis y también hallazgos sobre las diferencias encontradas entre la producción de toxinas y su expresión, la posible regulación post transcripcional de las toxinas, la variedad en el número de copias génicas en distintas poblaciones, cómo distintos factores ambientales podrían causar un efecto diferencial en el crecimiento de poblaciones distintas y que existen varias estrategias de respuesta a las condiciones ambientales por distintos ecotipos. Esto hace relevante conocer en profundidad las cepas de *C. raciborskii* nativas no nativas,

dada la alta variabilidad existente dentro una propia especie que se está detectando de manera creciente en distintos ecosistemas acuáticos de Uruguay y el mundo.

Un aporte de este trabajo fue el desarrollo de *primers* para el gen *sxtl*, que si bien fueron desarrollados para el estudio de expresión, pueden ser utilizados para detección de poblaciones productoras de STX en sistemas acuáticos, lo cual tiene implicancias a nivel de la gestión y monitoreo de los mismos. Cabe destacar que la metodología desarrollada en esta tesis así como parte de los resultados fueron publicados en una revista científica internacional (Harmful Algae, Vico *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Como se planteó en la hipótesis de este trabajo, la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de STX en *C. raciborskii* no estaría regulada directamente por la disponibilidad de nutrientes en las tres cepas de origen americano. Más bien es probable que tengan expresión constitutiva. Lo mismo se observó en el caso de la transcripción de un gen implicado en la biosíntesis de CYN. Sin embargo, la predicción acerca de la mayor expresión génica en condiciones de suficiencia de ambos nutrientes no se cumplió, por el contrario, en condiciones restrictivas de crecimiento la transcripción de los genes implicados en rutas biosintéticas de toxinas aumentó.

Los patrones de expresión en presencia y/o ausencia de nitrógeno y fósforo en las cepas productoras de STX y CYN fueron diferentes como se planteó en la hipótesis de este trabajo, que sumado a las diferencias geográficas de las cepas productoras de toxinas, refuerza la idea de los roles ecológicos de las toxinas.

BIBLIOGRAFIA

Amaral, V., Bonilla, S., & Aubriot, L. (2014). Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. European Journal of Phycology, 49(1), 134-141.

Antunes, J. T., Leão, P. N., & Vasconcelos, V. M. (2015). *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. Front. Microbiol. 6: 473. doi: 10.3389/fmicb. 2015.00473.

Azevedo, S. M., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. Toxicology, 181, 441-446.

Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y., & Kaplan, A. (2010). Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplankton. Current biology, 20(17), 1557-1561.

Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., ... & Martínez de la Escalera, G. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. INNOTECH, (10), 9-22.

Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L., ... & Kruk, C. (2012). What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? FEMS Microbiology Ecology, 79(3), 594-607.

Bonilla, S., Ed. (2009). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. PHI-VII Documento Técnico N 16. Montevideo, UNESCO.

Bonilla S., Conde D., Aubriot L., Rodríguez-Gallego L., Piccini C., Meerhoff M., Rodríguez-Graña L., Calliari D., Gomez P., Machado I., Britos A. Procesos estructuradores de las comunidades biológicas 119 en lagunas costeras del Uruguay, en Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Menafra R., Rodríguez- Gallego L., Scarabino F., Conde D. (eds). 2006. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo.

Bonilla, S. & D. Conde (2000). El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las lagunas costeras de la Reserva Bañados del Este. Probides/UNESCO 31: 63-74

Boopathi, T., & Ki, J. S. (2014). Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. Toxins, 6(7), 1951-1978.

Borges, H. L. F., Branco, L. H. Z., Martins, M. D., Lima, C. S., Barbosa, P. T., Lira, G. A. S. T., ... & Molica, R. J. R. (2015). Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial

strains isolated from the northeast of Brazil. *Harmful Algae*, 43, 46-57.

Brufani, M., Cerrin, S., Fedeli, W., Musu, C., Cellai, L. and Keller- Schierlein, W.: Structure of the venturicidins A and B. *Experientia* 27 (1971) 604-606.

Burford, M.A., Davis, T.W., Orr, P.T., Sinha, R., Willis, A., Neilan, B.A., 2014. Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *FEMS microbiology ecology* 89(1), 135-148.

Carloto I; Ubirajara M; Gonçalves B., João C; & José, C. N. (2015). Prevalence of paralytic shellfish poison-producing *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Brazilian semi-arid reservoir. *Acta Limnologica Brasiliensis*, (2), 238. doi:10.1590/S2179-975X5014

Carlson, C. A., Morris, R., Parsons, R., Treusch, A. H., Giovannoni, S. J., & Vergin, K. (2009). Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *The ISME journal*, 3(3), 283-295.

Chary, V. K., de la Fuente, J. L., Liras, P., & Martin, J. F. (1997). Amy as a reporter gene for promoter activity in *Nocardia lactamdurans*: comparison of promoters of the cephamycin cluster. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 2977-2982.

Chislock, M. F., Sharp, K. L., & Wilson, A. E. (2014). *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *water research*, 49, 207-214.

Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2004). Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 345-355.

Chorus, I. (2012). Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau-Roßlau, Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).

Chorus, I., Bartram J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, Chapman & Hall.

Cohan, F. M. (2005). Periodic selection and ecological diversity in bacteria. In *Selective sweep* (pp. 78-93). Springer US.

Conley, D. J., H. W. Paerl, et al. (2009). "Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus." *Science* 323(5917): 1014-1015

- Coque, J. J., Pérez-Llarena, F. J., Enguita, F. J., Fuente, J. L., Martin, J. F., & Liras, P. (1995). Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene*, 162(1), 21-27.
- Davis, T. W., Orr, P. T., Boyer, G. L., & Burford, M. A. (2014). Investigating the production and release of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by *Cylindrospermopsis raciborskii* over a natural growth cycle. *Harmful Algae*, 31, 18-25.
- De León L & JS Yunes 2001 First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology* 16(1): 110-112
- Dittmann, E., Fewer, D. P., & Neilan, B. A. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS microbiology reviews*, 37(1), 23-43.
- Fabre et al. (2010). El Nitrógeno y la relación zona eufórica/zona mezcla explican la presencia de cianobacteria en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5(1): 112-125.
- Feola, G., Brena, B., Risso, J., Sienra, D., & Echezarreta, M. E. (2006). Programa de monitoreo de agua de playas y costa de Montevideo. Informe temporada estival, 2007.
- Ferrari, G. y Vidal, L. 2006. Fitoplancton de la zona costera uruguaya: Río de la Plata y Océano Atlántico. En: Menafra, R., Rodriguez-Gallego, L., Scarabino, F. y Conde, D. (eds.). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre. pp.45-56. ISBN: 9974-7589-2-0
- Ferrari G & S Méndez 2004 Harmful Algal Monitoring in Uruguay. Pp 144-148 In: Hall Etheridge Anderson Kleindinst Zhu & Zou (eds) *Proceeding of First Conference on Harmful Algae Management and Mitigation*, Subic Bay, Philippines. Asia Pacific Economic Corporation (Singapore): APEC Publication # 204- MR-04.2
- Ferrari G & S Méndez 2000 Reports of phytoplankton species producers of coastal water discolorations in Uruguay. *Iheringia (Série Botânica)* (54):3-18. Porto Alegre
- Gkelis, S., & Zaoutsos, N. (2014). Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: a multi-disciplinary approach. *Toxicon*, 78, 1-9.
- Göttfert, M., Hitz, S., & Hennecke, H. (1990). Identification of nodS and nodU, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum* nodYABC and nodIJ genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 3, 308-316.

- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., J-F, H., 2005. Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* Strains (Cyanobacteria) Isolated from Four Continents. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1097-1100.
- Heidstra, R., and Bisseling, T. 1996. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* 133:25-43.
- Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., Fiore, M.F., 2013. *Cylindrospermopsin* and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PloS one* 8(8), 74238.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774.
- Istvanovics, V., Shafik, H. M., & Presing, M. S. Juhos (2000). Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology*, 43(2), 257-275.
- Ivars-Martinez, E., Martin-Cuadrado, A. B., D'Auria, G., Mira, A., Ferriera, S., Johnson, J., Friedman, R. & Rodriguez-Valera, F. (2008). Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. *The ISME journal*, 2(12), 1194-1212.
- Jabbouri, S., R. Fellay, F. Talmont, P. Kamalaprija, U. Burger, B. Relić, J.C. Promé, and W.J. Broughton. 1995. Involvement of nodS in N-methylation and nodU in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J. Biol. Chem.* 270:22968-22973.
- Jaja-Chimedza, A., Saez, C., Sanchez, K., Gantar, M., & Berry, J. P. (2015). Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from *Cylindrospermopsis raciborskii*, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. *Harmful Algae*, 49, 156-161.
- Jungblut, A. D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D. R., Burns, B. P., & Neilan, B. A. (2005). Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 7(4), 519-529.
- Kellman, R., Mihali, T. K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B. A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4044-4053.
- Kobayashi, H., Y. Naciri-Graven, W.J. Broughton, and X. Perret. 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nodbox controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 51:335-347.

Kruk, C. y De León, L., 2002. Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. En: Fernández-Cirelli, A. y Chalar, G., (eds.). El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica. Buenos Aires: CYTED XVII, CETA. pp.143-155.

Martigani, F. (2012). Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora (No. 582.26 MAR). Montevideo: Facultad de Ciencias-Universidad de la República. (Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas).

Labedan, B., Boyen, A., Baetens, M., Charlier, D., Chen, P., Cunin, R., ... & Liang, Z. (1999). The evolutionary history of carbamoyltransferases: a complex set of paralogous genes was already present in the last universal common ancestor. *Journal of molecular evolution*, 49(4), 461-473.

Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baures, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international*, 59, 303-327.

Mergaert, P., Van Montagu, M., and Holsters, M. 1997c. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25:811-817.

Mihali T, Kellman R, Neilan B (2009). Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10,8.

Mihali, T. K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K. D., & Neilan, B. A. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 716-722.

Moisander, P; Paerl, H.W; et al.. (2008). Effects of inorganic nitrogen on taxa-specific cyanobacterial growth and nifH expression in a subtropical estuary. *Limnology and Oceanography* 53(6): 2519-2532.

Moore, L. R., Rocap, G., & Chisholm, S. W. (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 393(6684), 464-467.

Moustafa A, Loram JE, Hackett, JD Anderson DM Plumley FG, Bhattacharya D (2009). Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *Plos One*. 4:e5758.

Murray, S. A., Mihali, T. K., & Neilan, B. A. (2011). Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular biology and evolution*, 28(3), 1173-1182.

- Neilan, B. A., Saker, M. L., Fastner, J., Törökné, A., & Burns, B. P. (2003). Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology*, 12(1), 133-140.
- O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A., & Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313-334.
- Ongley, S. E., Pengelly, J. J., & Neilan, B. A. (2015). Elevated Na⁺ and pH influence the production and transport of saxitoxin in the cyanobacteria *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Environmental microbiology*.
- Orr, P.T., Rasmussen, J.P., Burford, M.A., Eaglesham, G.K., Lennox, A.M., 2010. Evaluation of quantitative real-time PCR to characterise spatial and temporal variations in cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju and cylindrospermopsin concentrations in three subtropical Australian reservoirs. *Harmful Algae* 9, 243–254.
- Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv Für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beiträge*, 107(4), 563-593.
- Paerl, H. W. and J. Huisman (2008). "Blooms Like It Hot." *Science* 320: 57-58.
- Pantelić, D., Svirčev, Z., Simeunović, J., Vidović, M., & Trajković, I. (2013). Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*, 91(4), 421-441.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8(5), 1650-1680.
- Perez, Del, M.C., Bonilla, S., De Leon, L., Smarda, J., Komarek, J. (1999): A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. – *Algol Study* 93: 91-101
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9), e45-e45.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S. (2011). Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10(6), 644-653.

- Piccini, C., Aubriot, L., D'Alessandro, B., Martigani, F., & Bonilla, S. (2013). Revealing Toxin Signatures in Cyanobacteria: Report of Genes Involved in Cylindrospermopsin Synthesis from Saxitoxin-Producing *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Advances in Microbiology*, 3(3), 289.
- Pierangelini, M., Sinha, R., Willis, A., Burford, M. A., Orr, P. T., Beardall, J., & Neilan, B. A. (2015). Constitutive cylindrospermopsin pool size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different light and CO₂ partial pressure conditions. *Applied and environmental microbiology*, 81(9), 3069-3076.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B. P., & Neilan, B. A. (2004). Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology*, 150(2), 455-461.
- Quiblier, C; Wood S; Echenique-Subiabre I; Heath M; Villeneuve A; & Humbert J.F. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria—ecology, toxin production and risk management. *Water research*, 47(15), 5464-5479.
- Saker, M. L. and Neilan, B. A. (2001). Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1839–1845.
- Shafik, H. M., Herodek, S., Presing, M., & VÖRÖS, L. (2001). Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband, Algological studies*, 140, 75-93.
- Shalev-Malul, G., Lieman-Hurwitz, J., Viner-Mozzini, Y., Sukenik, A., Gaathon, A., Lebendiker, M., and Kaplan, A. (2008) An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environ Microbiol* 10: 988–999.
- Schindler, D. W., R. E. Hecky, et al. (2008). "Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(32): 11254-11258.
- Sienra, D y Ferrari, G., 2006. Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo (Uruguay). En: Menafra, R., Rodriguez-Gallego, L., Scarabino, F. y Conde, D. (eds.). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre. pp.413-420. ISBN: 9974-7589-2-0
- Sinha, R., Pearson, L. A., Davis, T. W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., ... & Neilan, B. A. (2014). Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC genomics*, 15(1), 1.

- Sinha, R., Pearson, L. A., Davis, T. W., Burford, M. A., Orr, P. T., & Neilan, B. A. (2012). Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones e ls climate change responsible?. *water research*, 46(1408), e1419.
- Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(4), 201-207.
- Somma, A. 2014. El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo. Facultad de Ciencias. Tesis de Grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas.
- Soto-Liebe, K., Méndez, M. A., Fuenzalida, L., Krock, B., Cembella, A., & Vásquez, M. (2012). PSP toxin release from the cyanobacterium *Raphidiopsis brookii* D9 (Nostocales) can be induced by sodium and potassium ions. *Toxicon*, 60(7), 1324-1334.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M., 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56(8), 1350-1361.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35, 171-205.
- Stewart, I., & Falconer, I. R. (2008). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins. In *Oceans and human health: risks and remedies from the seas*, 271-296.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vásquez, M., Glockner, G., 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: Comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 5(2), e9235.
- Stucken, K., Murillo, A. A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J. J., Méndez, M. A., Vásquez, M. (2009) Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 37–48.
- Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A., & Quesada, A. (2012). Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to Subtropical and Temperate Freshwater Lakes–Physiological, Regional, and Global Driving Forces. *Frontiers in Microbiology*, 3, 86.
- Tundisi, J. G., Matsumura-Tundisi, T., Tundisi, J. E. M., Blanco, F. P., Abe, D. S., Contri Campanelli, L., ... & Lima, C. P. P. (2015). A bloom of cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in UHE Carlos Botelho (Lobo/Broa) reservoir: a consequence of global change?. *Brazilian Journal of Biology*, 75(2), 507-508.

- Vico, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., Piccini, C. (2016) 11 Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogues in *Cylindrospermopsis raciborskii*. Aceptado para su publicación en Harmful Algae.
- Vidal, L. and Kruk C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3: 142-151.
- Vidal L., Bonilla S., Rodriguez-Gallego L., Conde D., Martínez-López M. 2007. Biomass of autotrophic picoplankton in subtropical coastal lagoons: Is it relevant? Limnetica 26: 441-452.
- Wang, D. Z., Zhang, S. F., Zhang, Y., & Lin, L. (2015). Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. Journal of proteomics.
- Wiese, M., D'agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. Marine drugs 8(7), 2185-2211.
- Willis, A., Adams, M.P., Chuang, A.W., Orr, P.T., O'Brien, K.R., Burford, M.A., 2015. Constitutive toxin production under various nitrogen and phosphorus regimes of three ecotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* ((Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju). Harmful Algae 47, 27-34.
- Wimmer, K. M., Strangman, W. K., & Wright, J. L. (2014). 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetyl cylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. Harmful Algae, 37, 203-206.
- Wood, S. A., Pochon, X., Luttringer-Plu, L., Vant, B. N., & Hamilton, D. P. (2014). Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. Harmful Algae, 39, 64-74.
- Wu, Z., Zeng, B., Li, R., & Song, L. (2012). Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. Harmful Algae, 15, 53-58.
- Wu, X., Zarka, A., & Boussiba, S. (2000). A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. Plant Molecular Biology Reporter, 18(4), 385-392.

ANEXOS

Curvas de amplificación para los *primers* *sxt1* y *16S* para determinar la determinación de eficiencias.

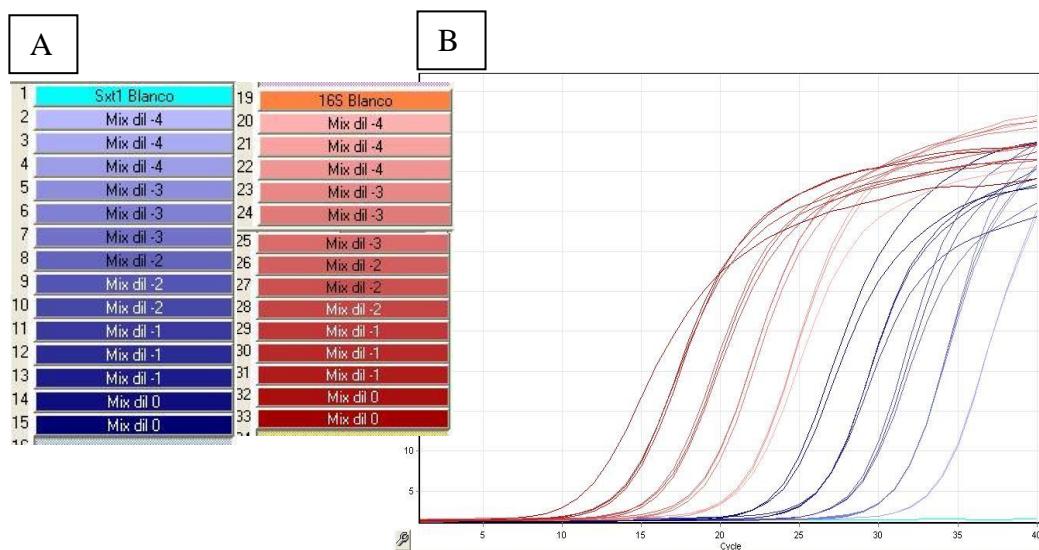


Figura 12 - Amplificación en qPCR-TR de la curva de calibración a partir de una mezcla de ADNc con los *primers* *sxt1* y *16S* para determinar las eficiencias. A: listado de las diluciones de la curva de calibración analizadas y sus réplicas con los distintos *primers*. B: imagen de la amplificación de las diluciones analizadas en tiempo real conservando los colores de referencia de A.

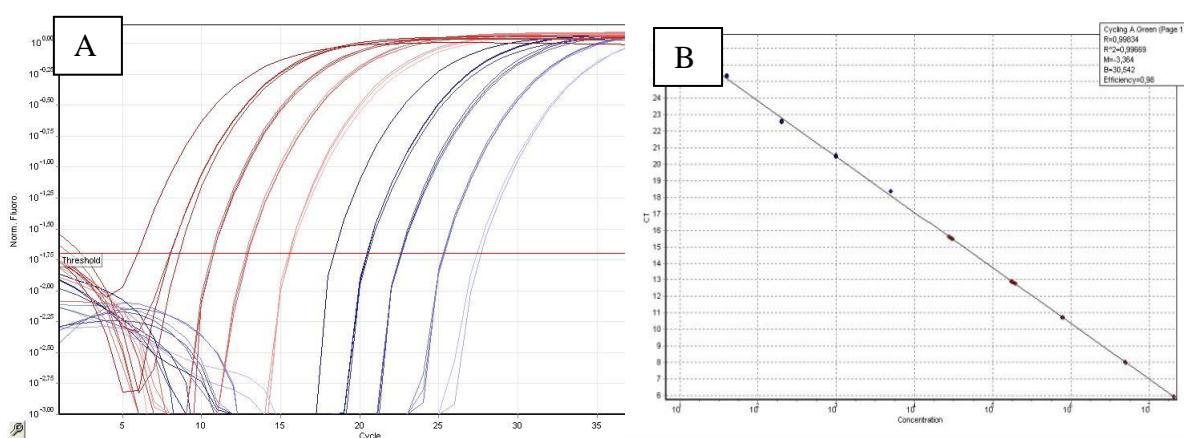


Figura 13 - Determinación de los Cts de la curva de calibración anterior. A: Amplificación de las distintas diluciones de la curva y sus puntos de corte del valor umbral. B: representación de los puntos de la curva de calibración para determinar la eficiencia de los *primers* *sxt1*. Se conserva la asignación de colores de la Figura 12.

Ensayos de otros métodos de lisado de cultivos de *C. raciborskii*

Buscando optimizar recursos se evaluaron otros métodos de lisis para los cultivos de cianobacterias incubando la muestra en baño húmedo, microondas y sonicador. Los distintos tratamientos se ensayaron en cultivos frescos de $2,7 \times 10^7$ filamentos / ml de la cepa MVCC14 y se detallan a continuación:

- Tratamiento 1: Se tomaron 500 μ l de cultivo de cianobacterias. Se centrifugó a 10 mil rpm por 20 min. Se descartó 450 μ l del sobrenadante, se le dio un spin y se incubó en baño seco a 94 oC por 15 min e inmediatamente se lo colocó en baño de hielo. Se centrifugó a 10 mil rpm por 10 min.
- Tratamiento 2: Se tomaron 500 μ l de cultivos de cianobacterias. Se los incubó en microondas a 900 W por 2 min y medio.
- Tratamiento 3: Se tomaron 500 μ l de cultivo de cianobacterias. Se lo trató con sonicador a 20 mil KHz por 5 seg. a máxima potencia para el tip.

Los lisados resultantes de los distintos tratamientos fueron evaluados por duplicado mediante PCR en Tiempo Real con los *primers* sxt1 con el lisado (dil. 0) y una dilución 1/10 mismo (dil. -1) como molde y utilizando 0,02 de Threshold. Los valores obtenidos de Ct se encuentran en la Figura 14, destacándose el Tratamiento 3 correspondiente al sonicador.

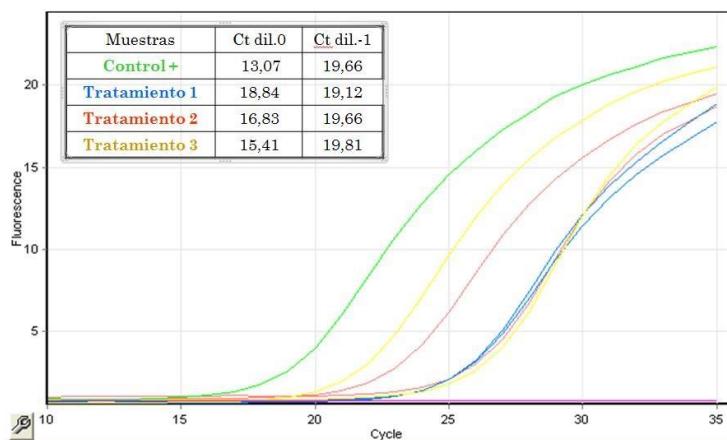


Figura 14 – Imagen que muestra la amplificación a tiempo real de las muestras con los distintos tratamientos de lisado con una tabla que presenta los valores de Ct. Siendo dil. 0 el lisado y dil. -1 la dilución 1/10 del mismo.

Evaluación la sensibilidad de detección de la qPCR-TR

Se realizó un ensayo para conocer la sensibilidad o el poder alcanzado con la técnica de qPCR-TR para detectar el gen de *sxtl* con los *primers* *sxt1*. Para esto se partió de una muestra de 1,6 ng / μ l de ADN de *C. raciborskii* con el que se realizó una curva de diluciones seriadas de 6 puntos. La dilución de concentración más baja en amplificar correspondió a la muestra que contenía 1,6 pg / μ l, por lo que se alcanzó detectar 3,2 pg de ADN a un Ct de 18.

Estudios preliminares sobre la influencia de la presencia de predadores sobre la expresión de SXT.

Estudios preliminares sobre la influencia de la presencia de predadores sobre la expresión de STX

Se estudió también la expresión de *sxt1* de las cepas americanas en distintas disponibilidades de N y P cuyos cultivos contienen predadores (ciliados). Las muestras ricas en N y P (+N+P) se emplearon como control. Todas las muestras se analizaron por triplicado en PCR tiempo real. Las eficiencias del gen en estudio y del gen de referencia resultaron distintas entre sí; la eficiencia de los primers *sxt1* es de 0,86 y la eficiencia de los *primers* para 16S es de 0,74. Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 – Resultados de expresión de *sxt1* para las cepas en estudio en las distintas condiciones nutricionales en presencia de predadores. En negrita se muestran las condiciones que fueron consideradas como control.

Muestra	Prom Ct <i>Sxt1</i>	Prom Ct 16S	Expresión relativa
Cepa MVCC14 +N+P	22.30	16.77	1
Cepa MVCC14 –N+P	24.95	14.12	3.31
Cepa MVCC14 +N-P	20.95	11.27	4.27
Cepa MVCC14-N-P	22.14	9.73	8.14
Cepa MVCC19 +N+P	28.85	15.75	1
Cepa MVCC19 –N+P	26.97	15.64	0.78
Cepa MVCC19+N-P	25.33	13.57	1.13
Cepa MVCC19-N-P	23.26	13.84	0.76
Cepa CCMP1973 +N+P	28.20	15.55	1
Cepa CCMP1973 –N+P	27.72	23.42	0.09
Cepa CCMP1973 +N-P	23.44	17.35	0.28

Cepa CCMP1973 -N-P	22.57	19.49	0.13
--------------------	-------	-------	------

Los resultados de este estudio muestran una tendencia distinta entre las tres cepas en estudio en cuanto a la expresión de *sxtl* cuando varía la disponibilidad de nutrientes en el ambiente (Tabla 7). Al igual que en el estudio sin predadores, la cepa MVCC14 aumentó su expresión al escasear el N y P en el cultivo, pero este aumento fue de mayor magnitud. La cepa MVCC19 tuvo pequeñas variaciones en la expresión y se la consideró de expresión constante. Para la CCMP1973 se observó una disminución significativa en la expresión cuando el medio de cultivo carecía de N o P.

En una primera instancia, el efecto de los depredadores es mucho mayor sobre la expresión de saxitoxina que con respecto a los nutrientes. Sin embargo, se deberían realizar análisis con cultivos controlados para poder sacar mayores conclusiones acerca de estos últimos resultados y la posible funcionalidad de esta cianotoxina.