

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”, CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
DEPARTAMENTUL DE BIOLOGIE MOLECULARĂ ȘI  
BIOTEHNOLOGIE**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**FILOGENIA ȘI BIODIVERSITATEA  
MOLECULARĂ A HIDROGENAZELOR  
BIDIRECȚIONALE LA CIANOBACTERII**

**- rezumat -**

**Conducător științific**

**Prof. dr. Nicolae Dragoș**

**Doctorand**

**Mihai Mitulețu**

**Cluj-Napoca**

**2013**

## Cuprins

<b>INTRODUCERE</b> .....	3
<b>OBIECTIVELE STUDIULUI</b> .....	4
<b>A. CONSIDERAȚII GENERALE</b> .....	5
<b>CAP. I BIODIVERSITATEA CIANOBACTERIILOR</b> .....	5
Filogenia moleculară a cianobacteriilor pe baza analizei comparative a unor gene conservate .....	5
Filogenia cianobacteriilor pe baza genei ARNr 16S și a fragmentului ITS (Internal Transcribed Spacer) .....	5
Filogenia cianobacteriilor pe baza genei cpcBA și a fragmentului IGS (Intergenic Spacer) .....	6
<b>CAP. II. BIODIVERSITATEA HIDROGENAZELOR CIANOBACTERIENE</b> .....	6
II.1 NiFe – hidrogenazele .....	6
II.2 Hidrogenazele cianobacteriene .....	6
Hidrogenaza unidirecțională .....	7
Hidrogenaza bidirecțională .....	7
II.3. Filogenia hidrogenazelor cianobacteriene.....	8
<b>B. MATERIALE ȘI METODE</b> .....	8
<b>CAP. III TULPINI ȘI MEDII NUTRITIVE DE CREȘTERE</b> .....	8
<b>CAP. IV. METODE DE MICROSCOPIE OPTICĂ ȘI ELECTRONICĂ</b> .....	10
<b>CAP. V METODE MOLECULARE UTILIZATE ÎN STUDIUL TULPINILOR CIANOBACTERIENE</b> .....	11
<b>C. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b> .....	12
<b>CAP. VI ANALIZA FILOGENETICĂ A TULPINILOR AICB PE BAZA MARKERILOR GENETICI SELECTAȚI</b> .....	12
Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Nostocales .....	12
Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Chroococcales .....	16
Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Oscillatoriales .....	21
<b>CAP. VII ULTRASTRUCTURA, TAXONOMIA ȘI FILOGENIA MOLECULARĂ A TULPINII AICB 1012 <i>Coelomoron pusillum</i> (Van Goor) Komárek</b> .....	25
<b>CAP. VIII REGLAREA TRANSCRIȚIONALĂ A HIDROGENAZEI BIDIRECȚIONALE SUB INFLUENȚA LUMINII ȘI OXIGENULUI LA TULPINI CIANOBACTERIENE DIN ORDINUL NOSTOCALES</b> .....	33
Efectul luminii asupra expresiei genelor <i>hox</i> în condiții de anaerobioză .....	33
Efectul reversibil al luminii asupra reglării transcripționale a hidrogenazei bidirecționale.....	34
<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....	35
<b>Bibliografie selectivă</b> .....	36

## INTRODUCERE

Cianobacteriile reprezintă unul dintre cele mai mari și mai importante grupuri de bacterii de pe Terra capabile să facă fotosinteză oxigenică folosind apa ca și donator de electroni. Deasemenea ele pot fi întâlnite în aproape toate nișele ecologice de la apă dulce la apă sărată, în medii terestre sau în condiții extreme (Whitton și Potts, 2000).

Cunoștințele despre acest grup s-au îmbogățit mult din momentul în care primele genomuri cianobacteriene au fost disponibile (în 1996 genomul de la *Synechocystis* sp PCC 6803 a fost publicat). De atunci numeroase genomuri au fost secvențate ajungându-se astăzi la un număr de 93 de genomuri cianobacteriene total secvențate (Cyanobase- 39 genomuri; CyanoGEBA database – 54 genomuri (Shih și colab., 2012).

La cianobacterii, ca și la orice bacterii diazotrofe, reducerea  $N_2$  la  $NH_3$  este însoțită de producerea de hidrogen molecular. Hidrogenul produs de nitrogenază este rapid consumat de o hidrogenază unidirecțională, o enzimă care a fost găsită în aproape toate cianobacteriile fixatoare de  $N_2$  analizate cu o singură excepție: *Synechococcus* sp. BG 043511 (Ludwig și colab., 2006). În plus, aceste tulpini mai pot conține o hidrogenază bidirecțională, o enzimă care este prezentă și la cianobacteriile care nu fixează  $N_2$  (Tamagnini și colab., 2002).

În contextul actual al reducerii substanțiale a rezervelor de combustibili fosili, se caută tot mai mult alternative viabile pentru satisfacerea necesarului energetic al planetei. Una dintre aceste alternative pare să fie și producerea de hidrogen cu ajutorul microorganismelor fotosintetizatoare, în special cianobacteriile. De aceea numeroase cercetări actuale se axează pe studiul hidrogenazelor cianobacteriene și în special studiul hidrogenazelor bidirecționale.

Pentru o cât mai bună înțelegere, hidrogenazele bidirecționale necesită a fi studiate extensiv, un rol important în acest demers avându-l și investigarea biodiversității și filogeniei lor prin metode moleculare. În același timp, filogenia acestor enzime trebuie să fie completată și susținută de un studiu filogenetic al organismelor la care acestea sunt prezente.

Gradul de originalitate pe plan național și internațional al acestei lucrări reiese din mai multe aspecte. În primul rând, prin cele 70 de tulpini cianobacteriene investigate,

izolate din material biologic colectat din diverse zone ale Transilvaniei, acest studiu reprezintă o valorificare a colecției AICB a Institutului de Cercetări Biologice Cluj Napoca unică în țara noastră prin numărul și diversitatea microorganismelor fotosintetizante.

Pe plan internațional, caracterul de noutate al tezei este reliefat printr-o primă abordare comparativă a filogeniei genei *hoxH* cu filogenia cianobacteriilor de la care aceasta provine. Deasemenea este sugerat pentru prima dată un posibil transfer lateral de informație genetică la hidrogenaze bidirecționale cianobacteriene. Un alt aspect de noutate îl reprezintă o primă caracterizare din punct de vedere morfologic, ultrastructural și filogenetic a speciei *Coelomoron pusillum* AICB 1012 în cadrul acestei teze.

## **OBIECTIVELE STUDIULUI**

- Analiza filogenetică pe baza markerului nuclear ADNr 16S-ITS, cu scopul de a stabili relațiile filogenetice între tulpinile AICB studiate.
- Analiza filogenetică pe baza markerului locusul ficocianinic (PC-IGS), cu scopul de a evidenția și confirma relațiile filogenetice între tulpinile AICB stabilite pe baza markerului nuclear ADNr 16S-ITS.
- Identificarea și secvențarea tulpinilor AICB care prezintă hidrogenază bidirecțională.
- Analiza filogenetică pe baza subunității mari a hidrogenazei bidirecționale (*hoxH*) a tulpinilor AICB, comparativ cu filogenia organismelor (16S-ITS și PC-IGS) de la care aceste hidrogenaze provin.
- Caracterizarea în premieră din punct de vedere morfologic, ultrastructural și filogenetic a tulpinii AICB 1012 *Coelomoron pusillum*.
- Analiza expresiei genelor *hox* la tulpini cianobacteriene filamentoase în condiții de anaerobioză și la concentrații atmosferice ale oxigenului în prezența și absența luminii.

## **A. CONSIDERAȚII GENERALE**

### **CAP. I BIODIVERSITATEA CIANOBACTERIILOR**

Cianobacteriile sunt adevărați “ingineri” ai ecosistemelor cu o istorie evolutivă care se întinde pe cel puțin 1.5 posibil 2.7 miliarde de ani (Blank, 2004). Cianobacteriile aparțin supraregnului Eubacteria, și împreună cu Archaea formează marele grup al organismelor procariote. Dintre procariote, cianobacteriile sunt singurele capabile de fotosinteză oxigenică (cunoscute anterior ca „alge albastre-verzi”, sau „cianofite”).

Cianobacteriile ocupă cele mai diverse habitate: apele dulci și cele marine, zonele terestre, chiar și zonele cele mai neospitaliere cum sunt polii, deșerturile, și izvoarele fierbinți.

#### **Filogenia moleculară a cianobacteriilor pe baza analizei comparative a unor gene conservate**

##### Filogenia cianobacteriilor pe baza genei ARNr 16S și a fragmentului ITS (Internal Transcribed Spacer)

Analiza comparativă a secvențelor ARN din subunitățile ribosomale mici joacă un rol central în identificarea și taxonomia cianobacteriană, chiar și în ziua de azi, în perioada genomicii.

Introducerea genelor pentru ARNr 16S în studiile de filogenie a dus la revoluționarea acestora și, în final, la reorganizarea viului în 3 supraregnuri de sine stătătoare: Archaea, Bacteria și Eukarya (Woese, 1987; Ludwig și colab., 1993).

Deși avantajele acestui marker sunt bine cunoscute, cu referire atât la conținutul de informații, cât și la complexitatea bazei de date de secvențe, este în mod universal acceptată ideea că ARNr 16S reflectă doar în linii mari istoria evolutivă. Markerii filogenetici adiționali trebuie să fie luați în considerare pentru o filogenie mai detaliată.

Acest inconvenient poate fi depășit prin examinarea unor regiuni intergenice ale operonului care manifestă un grad de divergență superior genei pentru ARNr 16S, așa cum este ITS (“16S rRNA-23S rRNA Internal Transcribed Spacer”).

### Filogenia cianobacteriilor pe baza genei cpcBA și a fragmentului IGS (Intergenic Spacer)

Ca marker filogenetic la cianobacterii se utilizează o porțiune din operonul pentru locusul ficocianinic mai exact IGS (Intergenic Spacer) flancat de cele două subunități pentru ficobiline cpcB și cpcA.

IGS la fel ca ITS prezintă o variabilitate mare de structură și poate discrimina cianobacteriile la nivel de specie sau chiar de tulpină. În același timp, regiunile cpcB și cpcA prezintă un înalt grad de conservare la cianobacterii, astfel încât împreună cu IGS pot oferi o bună analiză filogenetică (Neilan și colab. 1995).

## **CAP. II. BIODIVERSITATEA HIDROGENAZELOR CIANOBACTERIENE**

Hidrogenazele sunt enzime care catalizează oxidarea reversibilă a hidrogenului molecular conform reacției:



În funcție de metalul conținut la nivelul situsului activ ele se clasifică în: NiFe hidrogenaze, FeFe hidrogenaze (Vignais și colab., 2001) și hidrogenaze care nu conțin grupări de FeS (Shima și colab. 2004).

### II.1 NiFe – hidrogenazele

Cea mai numeroasă și mai bine studiată clasă de hidrogenaze sunt [NiFe] - hidrogenazele din supraregnul Bacteria. Enzima este formată dintr-un  $\alpha\beta$  heterodimer, cu subunitatea mare (subunitatea  $\alpha$ ) care conține situsul bimetalic activ și subunitatea mică (subunitatea  $\beta$ ) care conține grupările de FeS (Volbeda și colab., 1995; Higuchi și colab., 1997; Higuchi și colab., 1999).

### II.2 Hidrogenazele cianobacteriene

Cianobacteriile pot avea două tipuri de NiFe hidrogenaze: o hidrogenază unidirecțională întâlnită la tulpinile fixatoare de azot și o hidrogenază bidirecțională prezentă atât la tulpinile fixatoare de azot cât și la cele care nu fixează azotul.

➤ Hidrogenaza unidirecțională

Hidrogenaza unidirecțională (codificată de genele *hupSL*) catalizează consumul  $H_2$ , produs în timpul fixării de  $N_2$ . Hidrogenazele unidirecționale cianobacteriene se întâlnesc exclusiv la tulpinile fixatoare de  $N_2$  și sunt formate din două subunități: o subunitate mare, care conține și situsul activ (HupL) și o subunitate mică, cu rol în transferul de electroni (Hup S) (Tamagnini și colab. 2007).

Funcția principală a hidrogenazei unidirecționale este aceea de a reutiliza  $H_2$ /electronii produși prin activitatea nitrogenazei. Această reciclare ar avea cel puțin trei funcții benefice pentru organism (Schutz și colab., 2004):

1. asigură ATP, minimizând pierderea de energie;
2. înlătură oxigenul din apropierea nitrogenazei, protejând-o astfel de inactivare;
3. asigură echivalenți reducători (electroni) pentru diferite funcții celulare.

➤ Hidrogenaza bidirecțională

Hidrogenazele bidirecționale cianobacteriene pot fi solubile sau ușor legate de membrană și pot fi prezente atât în tulpinile fixatoare de azot cât și în cele care nu fixează azotul (Tamagnini și colab., 2000,2002).

Hidrogenaza bidirecțională este compusă din cinci subunități, codificate de genele *hox* (*hydrogen oxidation genes*), în care *HoxEFU* este diaforaza, iar *HoxYH* hidrogenaza (Schmitz și colab., 1995; Appel și Schultz, 1996; Sheremetieva și colab., 2002; Schmitz și colab., 2002).

Din punct de vedere fiziologic, funcția enzimei nu este pe deplin clarificată. S-a sugerat că enzima ar acționa ca o valvă de electroni în timpul fotosintezei la *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Appel și colab., 2000). S-a propus deasemenea că enzima are rol în fermentație, funcționând ca mediator în eliberarea excesului de putere reducătoare în condiții anaerobe (Stal și Moezelaar, 1997; Troshina și colab., 2002). Mai mult, s-a sugerat că hidrogenaza bidirecțională ar putea face parte din complexul respirator I (Appel și Schulz, 1996; Schmitz și Bothe, 1996). Totuși datorită abseței sale de la unele tulpini cianobacteriene (Tamagnini și colab., 1997, 2000; Schutz și colab.,

2004; Ludwig și colab., 2006) se pare că hidrogenaza bidirecțională, nu joacă un rol esențial în supraviețuirea celulelor în care este prezentă.

### II.3. Filogenia hidrogenazelor cianobacteriene

Studiile filogenetice bazate pe secvențe de aminoacizi ale hidrogenazelor, au demonstrat clar caracterul monofiletic al grupului cianobacteriilor dar relațiile în interiorul grupului au fost slab rezolvate (Ludwig și colab., 2006). Aceste rezultate sugerează nevoia unor studii ulterioare care să clarifice relațiile filogenetice în interiorul acestui grup de organisme.

## B. MATERIALE ȘI METODE

### CAP. III TULPINI ȘI MEDII NUTRITIVE DE CREȘTERE

Materialul biologic care a făcut obiectul acestui studiu a constat din 70 de tulpini cianobacteriene, depozitate în Colecția de Alge și Cianobacterii (AICB) a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca (tab. 1). Acestea au fost colectate din algoflora Transilvaniei (jud. Cluj, Bihor Mureș,), cu o singură excepție: AICB 51 a fost colectată dintr-un bazin acvatic din Egipt. Toate aceste tulpini sunt păstrate în eprubete cu mediu de creștere BG11 sau Z (tulpinile de *Arthrospira*) lichid.

**Tabel nr. 1**

Cele 70 de tulpini cianobacteriene studiate, locul de proveniență și mediul de cultivare

Nr. crt	Tulpina	Specia	Proveniența	Mediu de creștere
1	AICB 808	<i>Anabaena eliptica</i>	Suatu, Cluj	BG 11
2	AICB 93	<i>Anabaena oscillatorioides</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11 fără azot
3	AICB 563	<i>Anabaena oscillatorioides</i>	Valea Ierii, Cluj	BG 11 fără azot
4	AICB 742	<i>Anabaena</i> sp.	Ciurila, Cluj	BG 11 fără azot
5	AICB 841	<i>Anabaena</i> sp.	Apahida, Cluj	BG 11
6	AICB 707	<i>Anabaena</i> sp.	Catina, Cluj	BG 11 fără azot
7	AICB 708	<i>Anabaena</i> sp.	Catina, Cluj	BG 11 fără azot
8	AICB 717	<i>Anabaenopsis</i> sp.	Ciurila, Cluj	BG 11 fără azot
9	AICB 740	<i>Anabaenopsis</i> sp.	Ciurila, Cluj	BG 11 fără azot
10	AICB 709	<i>Aphanizomenon elenkinii</i>	Ciurila, Cluj	BG 11 fără azot
11	AICB 743	<i>Aphanizomenon elenkinii</i>	Gheorgheni, Cluj	BG 11 fără azot
12	AICB 716	<i>Calothrix</i> sp.	Turda, Cluj	BG 11
13	AICB 39	<i>Cylindrospermum alatosporum</i>	Geaca, Cluj	BG 11 fără azot



14	AICB 820	<i>Fremyella diplosiphon</i>	UT(SF3)	BG 11
15	AICB 718	<i>Gloeotrichia ecinulata</i>	Turda, Cluj	BG 11
16	AICB 285	<i>Nostoc sp.</i>	Martinești, Cluj	BG 11 fără azot
17	AICB 420	<i>Nodularia harveyana</i>	Fânațele Cluj, Cluj	BG 11 fără azot
18	AICB 421	<i>Nostoc linckia</i>	Turda, Cluj	BG 11
19	AICB 44	<i>Nostoc palludosum</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
20	AICB 362	<i>Nostoc punctiforme</i>	Martinești, Cluj	BG 11
21	AICB 386	<i>Tolypothrix tenuis</i>	Fânațele Cluj, Cluj	BG 11
22	AICB 514	<i>Tolypothrix tenuis</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
23	AICB 34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Radvani, Bihor	BG 11
24	AICB 35	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Catina, Cluj	BG 11
25	AICB 36	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Geaca, Cluj	BG 11
26	AICB 618	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Pond, Taga Mare, Cluj	BG 11
27	AICB 619	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
28	AICB 620	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
29	AICB 679	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zau de Campie, Mures	BG 11
30	AICB 680	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zau de Campie, Mures	BG 11
31	AICB 681	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Fishpond, Cefa, Bihor	BG 11
32	AICB 682	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zau de Campie, Mures	BG 11
33	AICB 689	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Madaras, Bihor	BG 11
34	AICB 695	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zau de Campie, Mures	BG 11
35	AICB 697	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zau de Campie, Mures	BG 11
36	AICB 702	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Mihes, Mures	BG 11
37	AICB 747	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
38	AICB 748	<i>Microcystis sp.</i>	Lacu, Cluj	BG 11
39	AICB 822	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
40	AICB 823	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
41	AICB 826	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
42	AICB 827	<i>Microcystis sp.</i>	Scutard, Cluj	BG 11
43	AICB 832	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
44	AICB 833	<i>Microcystis sp.</i>	Geaca, Cluj	BG 11
45	AICB 51	<i>Synechocystis sp.</i>	Egipt	Z
46	AICB 61	<i>Gloeocapsa turgida</i>	Băile Felix, Bihor	BG 11
47	AICB 62	<i>Synechocystis minuscula</i>	Băile Felix, Bihor	BG 11
48	AICB 1012	<i>Coelomoron sp.</i>	Zau de Câmpie, Mureș	BG 11
49	AICB 1013	<i>Gloeocapsa sp.</i>	Tăureni, Mureș	BG 11
50	AICB 1014	<i>Merismopedia sp.</i>	Lacul Mic, Mureș	BG 11
51	AICB 1015	<i>Merismopedia sp.</i>	Lacul Mic, Mureș	BG 11

52	AICB 1016	<i>Synechococcus</i> sp.	Apahida, Cluj	Z
53	AICB 95	<i>Phormidium formosum</i>	Cefa, Bihor	BG 11
54	AICB 97	<i>Oscillatoria lachneri</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
55	AICB 254	<i>Oscillatoria boryana</i>	Dej, Cluj	BG 11
56	AICB 343	<i>Phormidium fragile</i>	Cluj Napoca, Cluj	BG 11
57	AICB 382	<i>Oscillatoria lemmermannii</i>	Turda, Cluj	BG 11
58	AICB 384	<i>Phormidium formosum</i>	Turda, Cluj	BG 11
59	AICB 404	<i>Phormidium formosum</i>	Geaca, Cluj	BG 11
60	AICB 450	<i>Arthrospira jennnerii</i>	Hoteni, Maramureș	BG 11
61	AICB 545	<i>Oscillatoria limnetica</i>	Turda, Cluj	BG 11
62	AICB 597	<i>Phormidium bijugatum</i>	Cătina, Cluj	BG 11
63	AICB 605	<i>Arthrospira fusiformis</i>	Apahida, Cluj	Z
64	AICB 627	<i>Arthrospira fusiformis</i>	Apahida, Cluj	Z
65	AICB 668	<i>Arthrospira fusiformis</i>	Apahida, Cluj	Z
66	AICB 641	<i>Oscillatoria amphibia</i>	Apahida, Cluj	D/2
67	AICB 670	<i>Arthrospira fusiformis</i>	Apahida, Cluj	Z
68	AICB 683	<i>Oscillatoria geminata</i>	Miheșul de Câmpie, Mureș	BG 11
69	AICB 728	<i>Lyngbya</i> sp.	Turda, Cluj	BG 11
70	AICB 1054	<i>Arthrospira jennnerii</i>	Mogoșa, Maramureș	BG 11

#### CAP IV. METODE DE MICROSCOPIE OPTICĂ ȘI ELECTRONICĂ

În ceea ce privește microscopia optică, protocolul de lucru a presupus observarea directă a tulpinilor la un microscop optic Olympus BX-41 și fotografierea digitală și efectuarea măsurătorilor necesare identificării (dimensiuni ale celulelor și coloniilor, etc).

Pentru observarea în SEM, eșantioanele de suspensie algală au fost analizate cu ajutorul unui microscop electronic cu baleiaj tip Jeol JSM 5510LV, la o tensiune de accelerare de 10 kV și cu un spot mărimea 5. Investigațiile TEM au permis obținerea unor secțiuni ultrafine utilizând un microscop TEM Jeol JEM 1010.

## CAP. V METODELE MOLECULARE UTILIZATE ÎN STUDIUL TULPINILOR CIANOBACTERIENE

Pentru analiza filogenetică pe baza markerilor ADNr 16S-ITS, PC-IGS și *hoxH* au fost urmați următorii pași: obținerea secvențelor de ADNr 16S-ITS, PC-IGS și *hoxH* a presupus extracția de ADN genomic, folosind kituri comerciale cu ajutorul cărora am obținut un grad ridicat de puritate. Folosind amorse specifice sau degenerate (pentru unele secvențe *hoxH*) am efectuat reacția PCR standard. Fragmentele obținute au fost izolate din gelul de agaroză și au fost direct secvențate sau clonate în prealabil în vectori de clonare (pJET1.2/blunt). Secvențarea s-a realizat folosind analizorul genetic Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Fragmentele genice obținute au fost asamblate folosind programul *Vector NTI Advanced v. 9.0*. Validarea secvențelor s-a efectuat folosind opțiunea blastn (BLAST-NCBI). Pentru alinierea multiplă a secvențelor obținute au fost extrase din baza de date GenBank (NCBI) secvențe ADNr 16S-ITS, PC-IGS și *hoxH*. Pentru aliniere a fost folosit programul *Mega 5.1*.

Pentru construirea arborilor filogenetici pe baza secvențelor ADNr 16S-ITS, PC-IGS și *hoxH* obținute în urma secvențării am folosit două metode distincte: fenetică (de distanță) (metoda „Evoluției Minime”) și cladistică (metoda „Maximum Likelihood”).

Pentru analiza expresiei genelor *hox* a fost extras ARN total cu ajutorul unui protocol clasic adaptat după McGinn și colab. (2003). Soluția de ARN total obținută a fost supusă digestiei cu ADNază comercială iar sinteza ADNc s-a realizat dasemenea cu ajutorul unui kit comercial. Folosind amorse specifice am efectuat reacția de qRT-PCR.

Datele obținute au fost analizate cu ajutorul soft-urilor 7000 System SDS Software 1.2.3. (Applied Biosystems), Microsoft Office Excel și Origin 8.6. Conform metodei  $2^{-\Delta\Delta CT}$  valorile Cq ale genelor de interes au fost dublu normalizate (Schmittgen și Livak, 2008).

## C. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### CAP.VI ANALIZA FILOGENETICĂ A TULPINILOR AICB PE BAZA MARKERILOR GENETICI SELECTAȚI

#### ➤ Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Nostocales

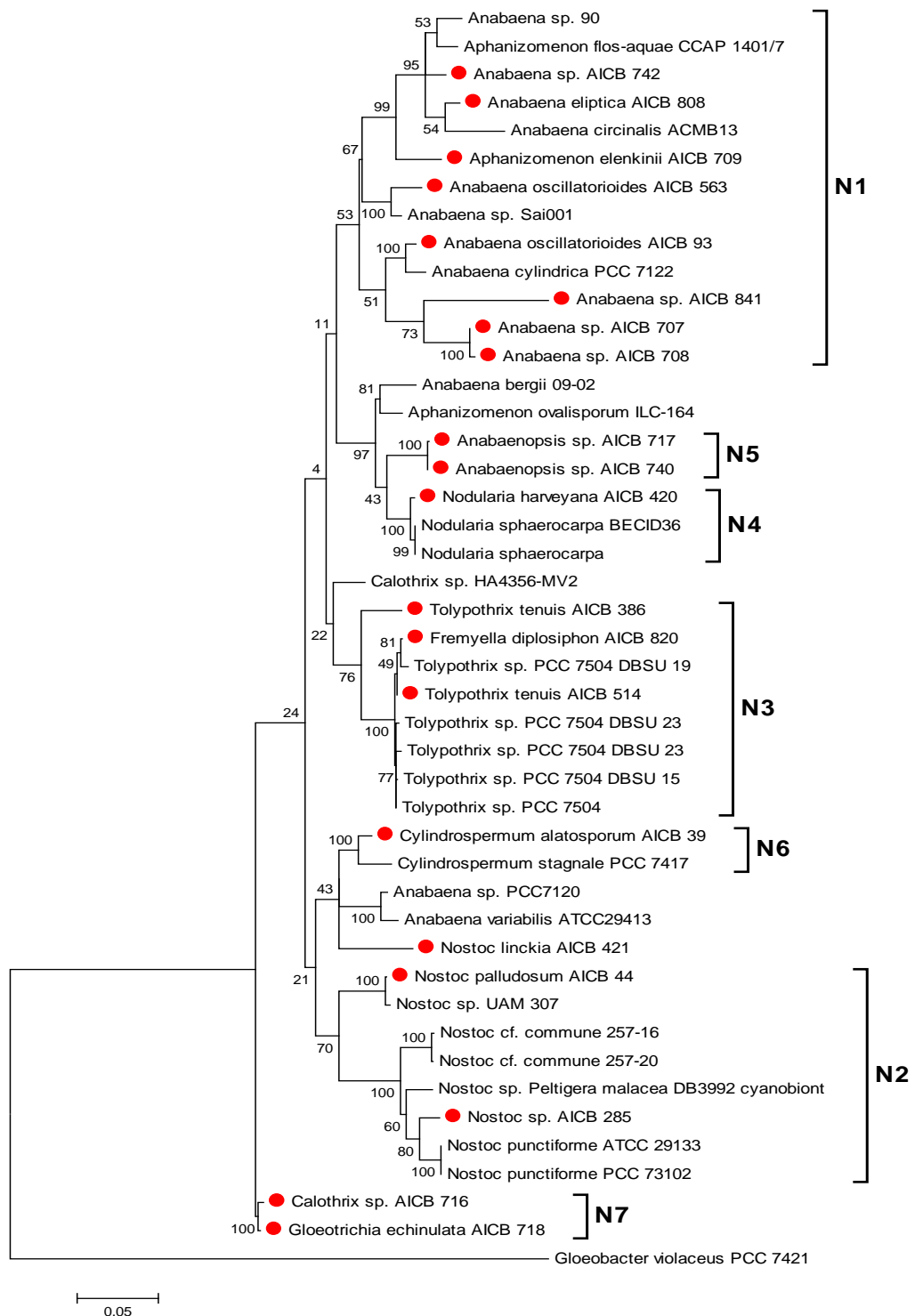
22 tulpini aparținând colecției AICB din Ordinul Nostocales au fost investigate din punct de vedere al secvenței și filogeniei genei pentru ARNr 16S-ITS (fig.1), al locusului ficocianinic (fig.2) și genei pentru hidrogenaza bidirecțională *hoxH* (fig.3).

Filogramele obținute pentru markerii ARNr 16S-ITS (fig.1) și PC-IGS (fig.2) au fost foarte similare ceea ce susține validitatea grupurilor filogenetice propuse. Pe baza 16S-ITS (fig.1) și *cpcBA*-IGS (fig.2), genurile *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix* și *Nostoc* sunt polifiletice, rezultate susținute și de datele din literatură ceea ce indică necesitatea unei revizuirii taxonomice a acestor genuri care să țină cont atât de caracterele morfologice cât și de datele moleculare, biochimice, ecologice (abordare polifazică). Genurile *Nodularia* și *Cylindrospermum* par a fi grupuri omogene, în concordanță cu clasificarea lor pe criterii morfologice deci cu origine monofiletică.

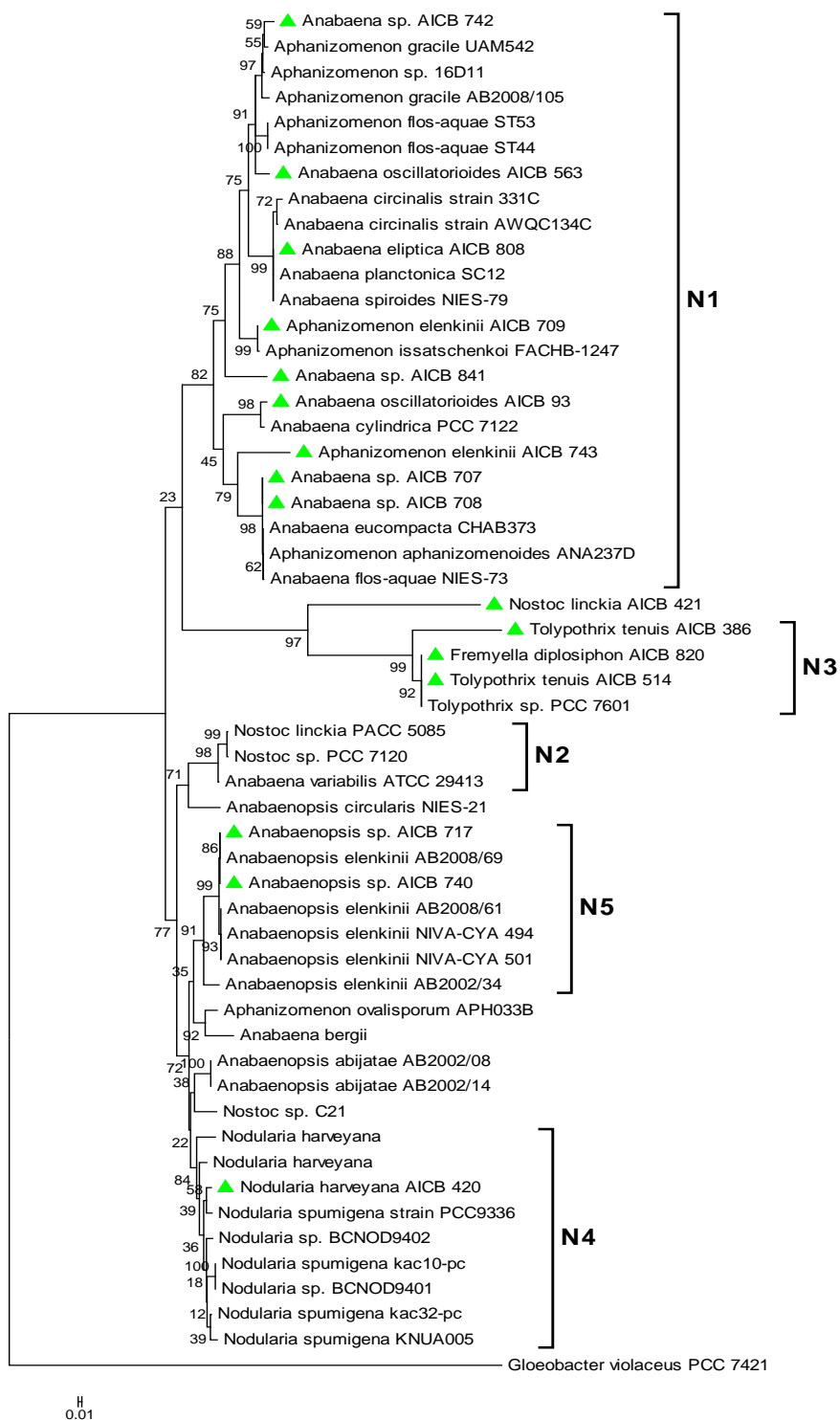
Hidrogenaza bidirecțională (*hoxH*) a putut fi detectată la 18 dintre cele 22 de tulpini din Ordinul Nostocales analizate. Lungimea secvențelor obținute a variat în intervalul 904-1278 pb (tab.2).

Arborele filogenetic generat pe baza secvențelor *hoxH* (fig.3) este foarte similar cu filogramele obținute pe baza markerilor 16S-ITS și *cpcBA*-IGS ceea ce demonstrează faptul că filogenia genei *hoxH* urmărește de obicei relațiile filogenetice dintre organismele la care aceasta este prezentă.

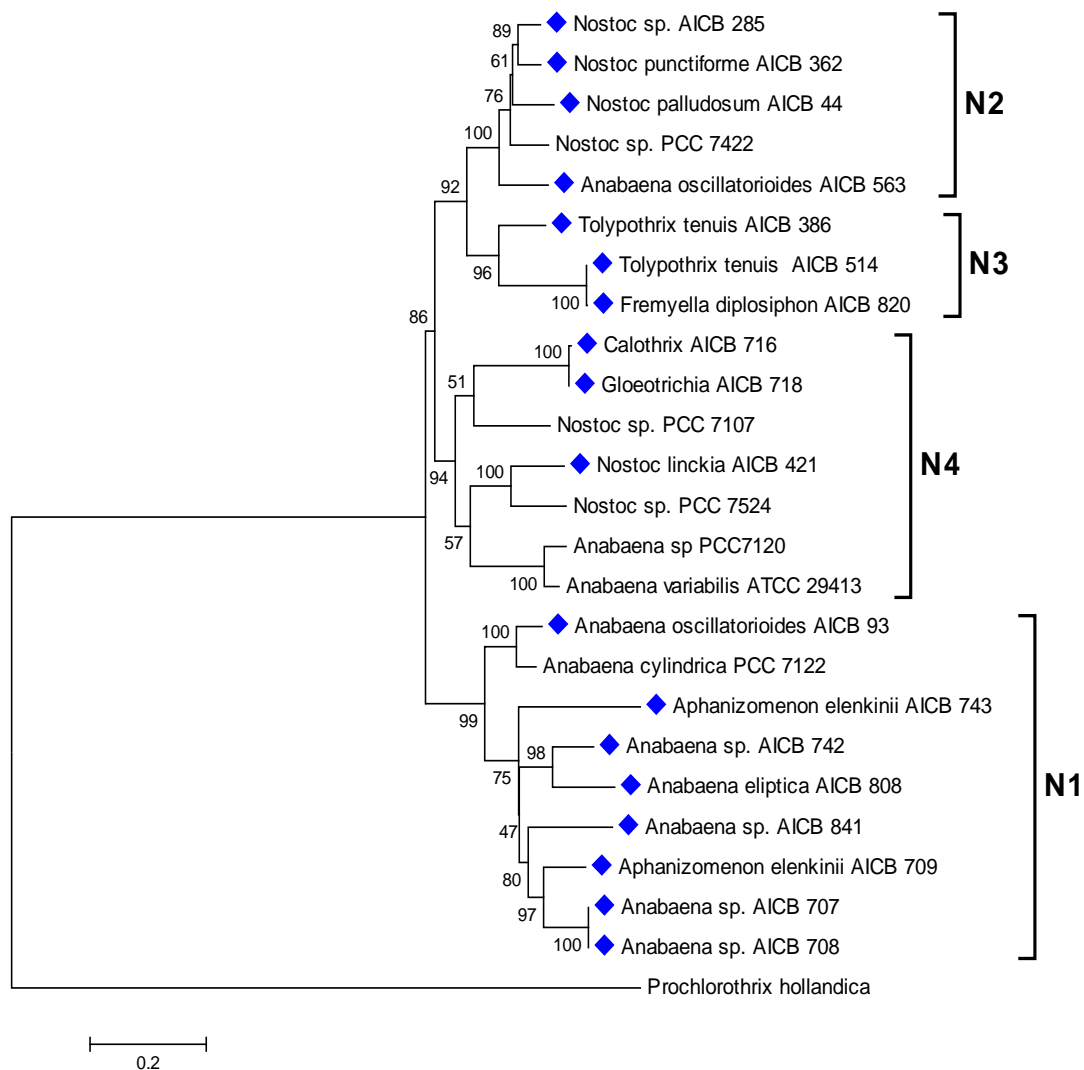
Gruparea tulpinii de *Anabaena oscillatorioides* AICB 563 cu cele de *Nostoc* este neobișnuită mai ales având în vedere faptul că după cum reiese din arborele din fig. 3 clusterelor N1 și N2 nu sunt apropiate din punct de vedere filogenetic. Această grupare sugerează faptul că între cele două genuri cianobacteriene a avut loc un transfer lateral de informație genetică.



**Fig. 1** Arbore Maximum likelihood cu tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Nostocales generat pe baza regiunii 16S-ITS. Secvențele AICB sunt marcate cu buline roșii. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicare) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența 16S-ITS de la *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.



**Fig. 2** Arbore Maximum likelihood generat pe baza regiunii PC-IGS pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Nostocales. Secvențele AICB sunt marcate cu buline roșii. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicare) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența PC-IGS de la *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.



**Fig. 3** Arbore Maximum likelihood generat pe baza genei *hoxH* pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Nostocales. Secvențele AICB sunt marcate cu romburi albastre. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicare) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența *hoxH* de la *Prochlorothrix hollandica*.

**Tabel nr. 2**

Cele 22 de tulpini cianobacteriene din grupul Nostocales studiate, prezența/absența *hoxH* și numărul de perechi de baze *hoxH* secvențate

Nr. crt	Tulpina	Specia	Prezența/absența <i>hoxH</i>	Nr. perechi de baze <i>hoxH</i>
1	AICB 808	<i>Anabaena eliptica</i>	+	921
2	AICB 93	<i>Anabaena oscillatorioides</i>	+	919
3	AICB 563	<i>Anabaena oscillatorioides</i>	+	916

4	AICB 742	<i>Anabaena</i> sp.	+	904
5	AICB 841	<i>Anabaena</i> sp.	+	914
6	AICB 707	<i>Anabaena</i> sp.	+	908
7	AICB 708	<i>Anabaena</i> sp.	+	919
8	AICB 717	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	-	-
9	AICB 740	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	-	-
10	AICB 709	<i>Aphanizomenon elenkinii</i>	+	911
11	AICB 743	<i>Aphanizomenon elenkinii</i>	+	912
12	AICB 716	<i>Calothrix</i> sp.	+	1224
13	AICB 39	<i>Cylindrospermum alatosporum</i>	-	-
14	AICB 820	<i>Fremyella diplosiphon</i>	+	912
15	AICB 718	<i>Gloeotrichia ecinulata</i>	+	1223
16	AICB 285	<i>Nostoc</i> sp.	+	912
17	AICB 420	<i>Nodularia harveyana</i>	-	-
18	AICB 421	<i>Nostoc linckia</i>	+	1278
19	AICB 44	<i>Nostoc palludosum</i>	+	1226
20	AICB 362	<i>Nostoc punctiforme</i>	+	910
21	AICB 386	<i>Tolypothrix tenuis</i>	+	911
22	AICB 514	<i>Tolypothrix tenuis</i>	+	908

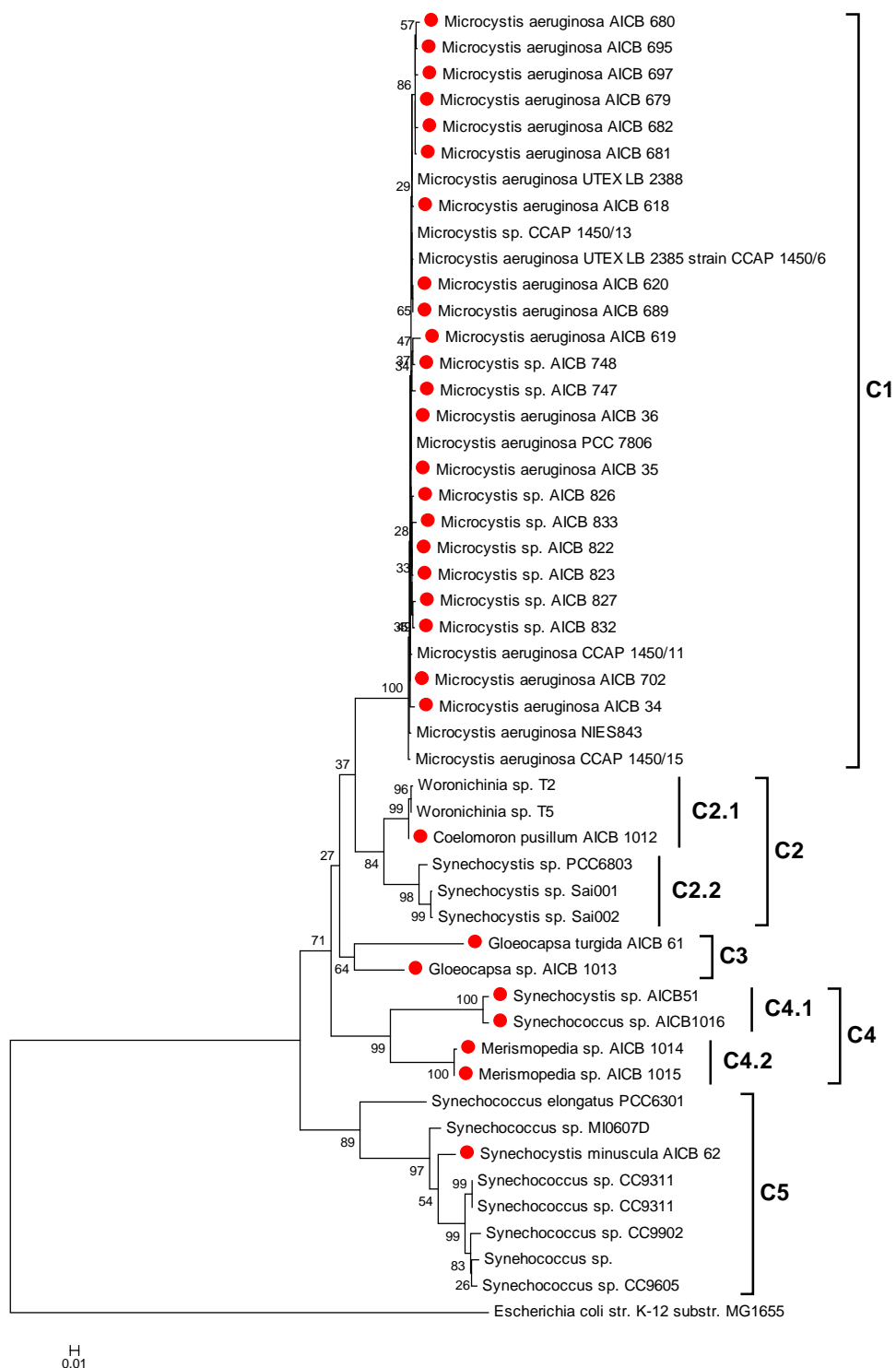
➤ Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Chroococcales

30 tulpini aparținând colecției AICB din Ordinul Chroococcales (tab.3) au fost investigate din punct de vedere al secvenței și filogeniei genei pentru ARNr 16S-ITS (fig.4), al locusului ficocianinic (fig.5) și genei pentru hidrogenaza bidirecțională *hoxH* (fig.6).

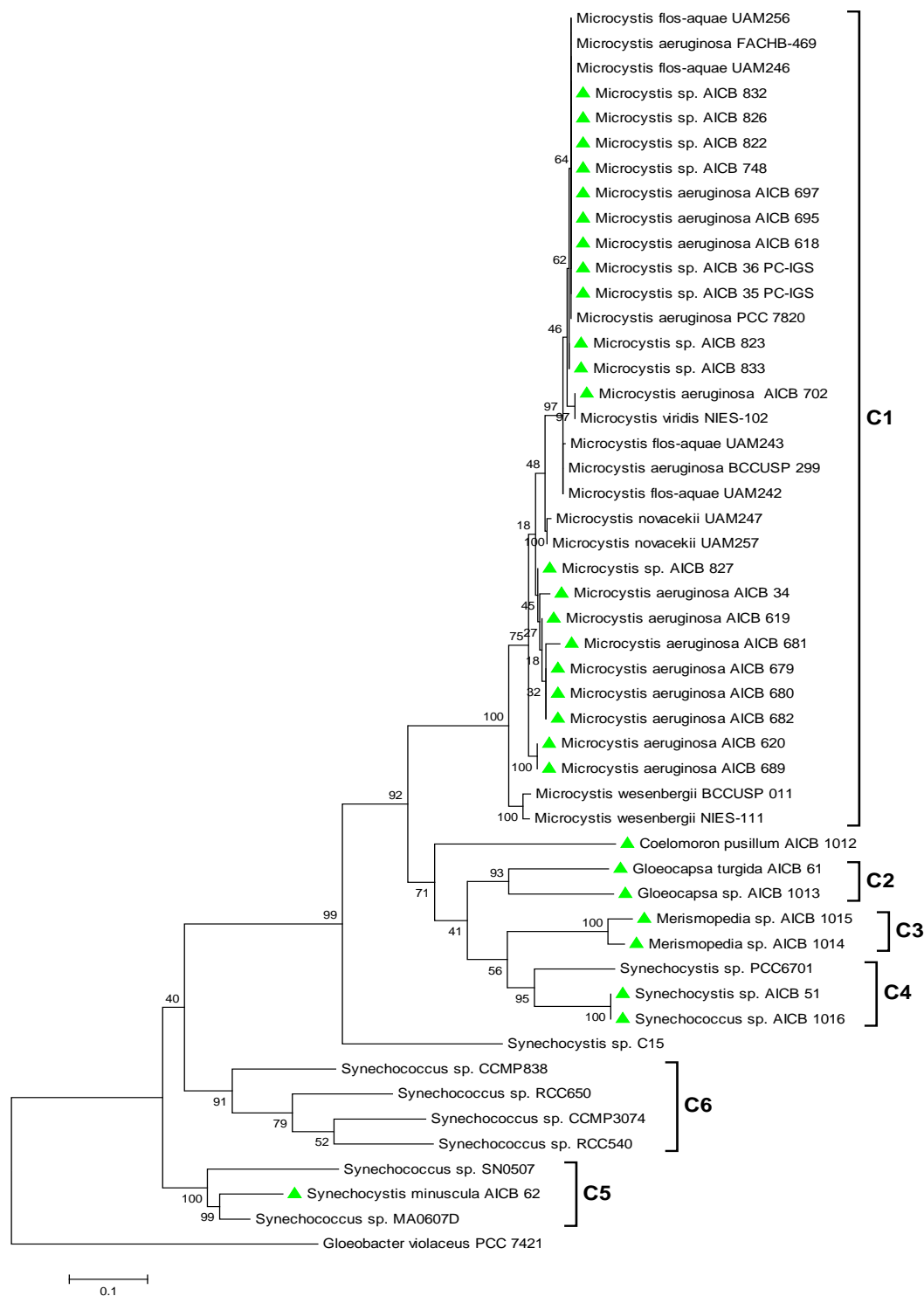
Arborii generați pe baza secvențelor 16S-ITS (fig.4) și *cpcBA*-IGS (fig.5) au prezentat o topologie foarte similară (4 sau 5 clustere), ceea ce susține validitatea grupurilor filogenetice propuse. Filogenia tulpinilor AICB din ordinul Chroococcales indică faptul că genurile *Microcystis*, *Gloeocapsa* și *Merismopedia* sunt monofiletice, așadar clasificarea lor este una naturală, susținută atât de caracterele morfologice cât și de datele moleculare. Pe baza distribuției lor heterogene, în mai multe clustere, în arborii 16S-ITS (fig.4) și *cpcBA*-IGS (fig.5), genurile *Synechocystis* și *Synechococcus* au un caracter polifiletic.

Hidrogenaza bidirecțională a putut fi detectată la un număr de 27 din cele 30 de tulpini AICB. Lipsa amplificării la tulpinile *Synechocystis* sp. AICB 51, *Gloeocapsa turgida* AICB 61 și *Synechocystis minuscula* AICB 62 sugerează absența genei *hoxH* dar

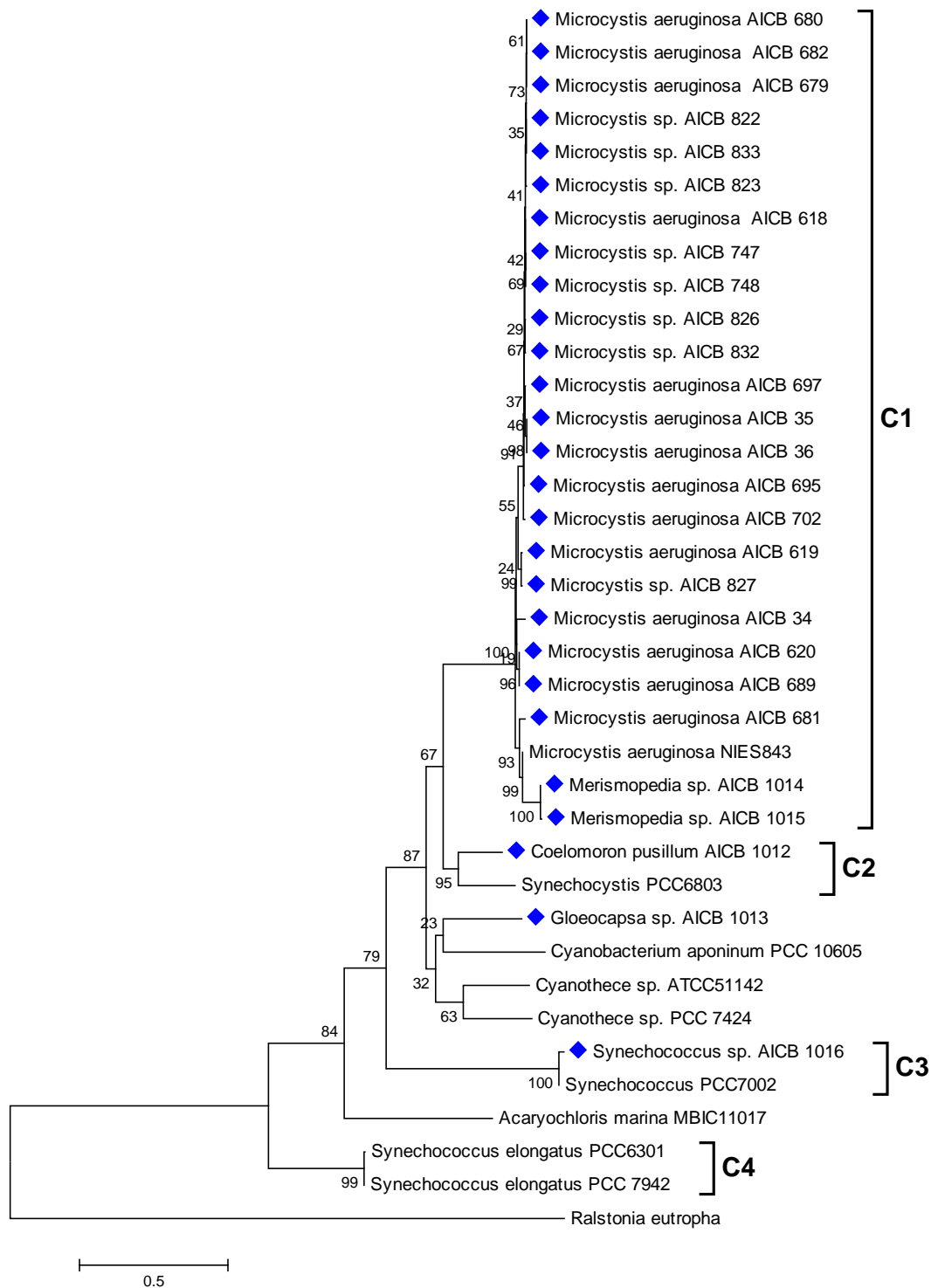




**Fig. 4** Arbore Maximum likelihood cu tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Chroococcales generat pe baza regiunii 16S-ITS. Secvențele AICB sunt marcate cu buline roșii. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicare) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența cpcBA-IGS de la *Escherichia coli* K-12.



**Fig. 5** Arbore Maximum likelihood generat pe baza regiunii PC-IGS pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Chroococcales. Secvențele AICB sunt marcate cu triunghiuri verzi. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicate) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența PC-IGS de la *Gloebacter violaceus* PCC 7421.



**Fig. 6** Arbore Maximum likelihood generat pe baza genei *hoxH* pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Chroococcales. Secvențele AICB sunt marcate cu romburi albastre. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicate) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența *hoxH* de la *Ralstonia eutropha*.

se poate datora și faptului că amorsele utilizate nu au fost cele adecvate pentru aceste tulpini. Lungimea secvențelor obținute a variat în intervalul 1125-1339 pb (tab.3).

Topologia arborelui generat pe baza secvențelor *hoxH* (fig.6) este similară cu topologia arborilor 16S-ITS și *cpcBA*-IGS. Gruparea tulpinilor de *Merismopedia* sp. AICB 1014 și AICB 1015 alături de cele de *Microcystis* (fig.6) se datorează probabil transferului lateral de informație genetică între cele două genuri cianobacteriene.

**Tabel nr. 3**

Cele 30 de tulpini cianobacteriene din grupul Chroococcales studiate, prezența/absența *hoxH* și numărul de perechi de baze *hoxH* secvențate

Nr. crt	Tulpina	Specia	Prezența/absența <i>hoxH</i>	Nr. perechi de baze <i>hoxH</i>
1	AICB 34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1327
2	AICB 35	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1327
3	AICB 36	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1339
4	AICB 618	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1333
5	AICB 619	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1334
6	AICB 620	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1336
7	AICB 679	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1336
8	AICB 680	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1337
9	AICB 681	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1334
10	AICB 682	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1337
11	AICB 689	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1336
12	AICB 695	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1337
13	AICB 697	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1333
14	AICB 702	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	1333
15	AICB 747	<i>Microcystis</i> sp.	+	1337
16	AICB 748	<i>Microcystis</i> sp.	+	1337
17	AICB 822	<i>Microcystis</i> sp.	+	1324
18	AICB 823	<i>Microcystis</i> sp.	+	1337
19	AICB 826	<i>Microcystis</i> sp.	+	1334
20	AICB 827	<i>Microcystis</i> sp.	+	1335
21	AICB 832	<i>Microcystis</i> sp.	+	1333
22	AICB 833	<i>Microcystis</i> sp.	+	1337
23	AICB 51	<i>Synechocystis</i> sp.	-	-
24	AICB 61	<i>Gloeocapsa turgida</i>	-	-
25	AICB 62	<i>Synechocystis minuscula</i>	-	-
26	AICB 1012	<i>Coelomoron</i> sp.	+	1185
27	AICB 1013	<i>Gloeocapsa</i> sp.	+	1186
28	AICB 1014	<i>Merismopedia</i> sp.	+	1164
29	AICB 1015	<i>Merismopedia</i> sp.	+	1125
30	AICB 1016	<i>Synechococcus</i> sp.	+	1237

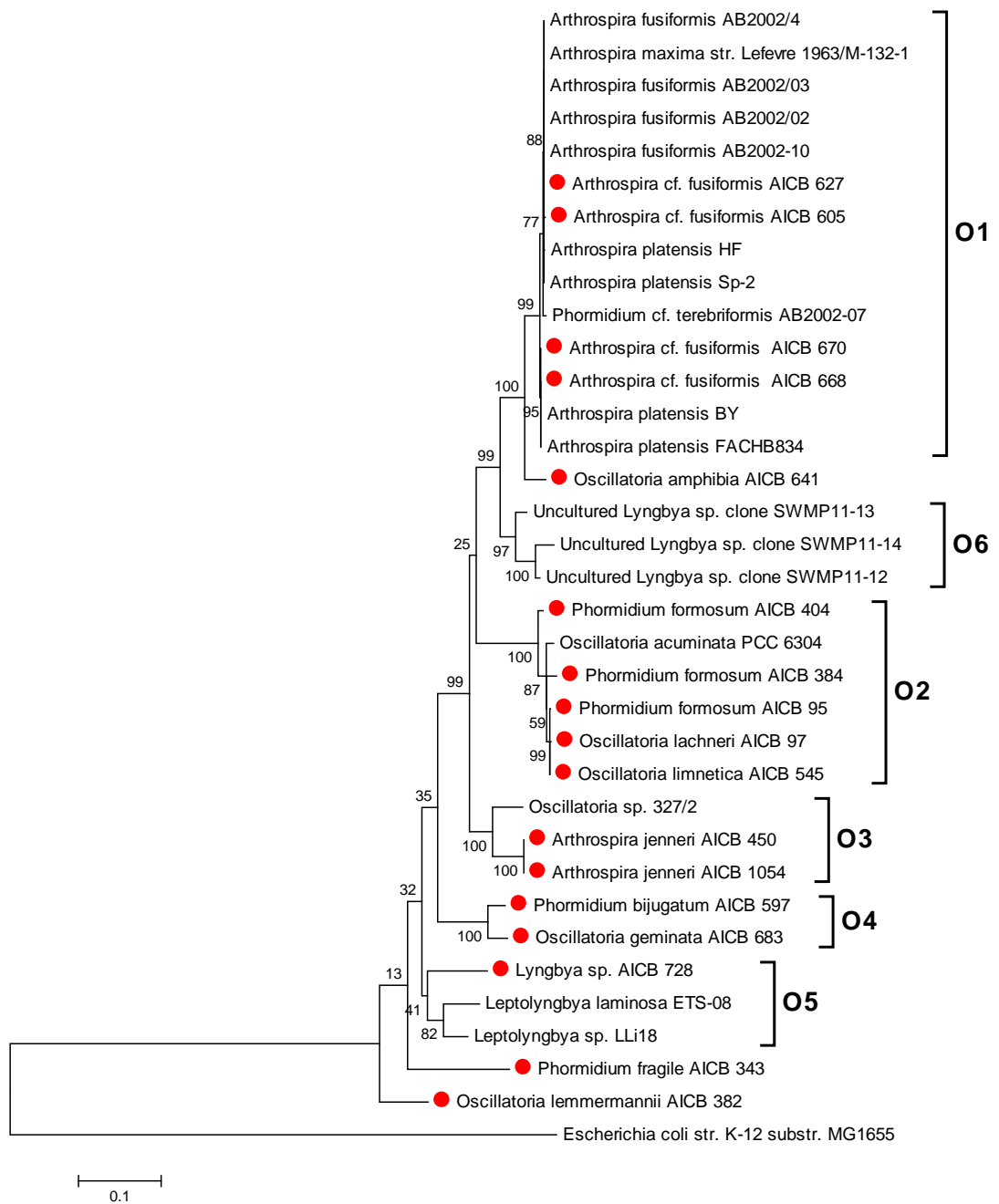
➤ Analiza filogenetică a tulpinilor din ordinul Oscillatoriales

Au fost investigate 18 tulpini aparținând colecției AICB din Ordinul Chroococcales (tab.4) din punct de vedere al secvenței și filogeniei genei pentru ARNr 16S-ITS (fig.7), al locusului ficocianinic (fig.8) și genei pentru hidrogenaza bidirecțională *hoxH* (fig.9).

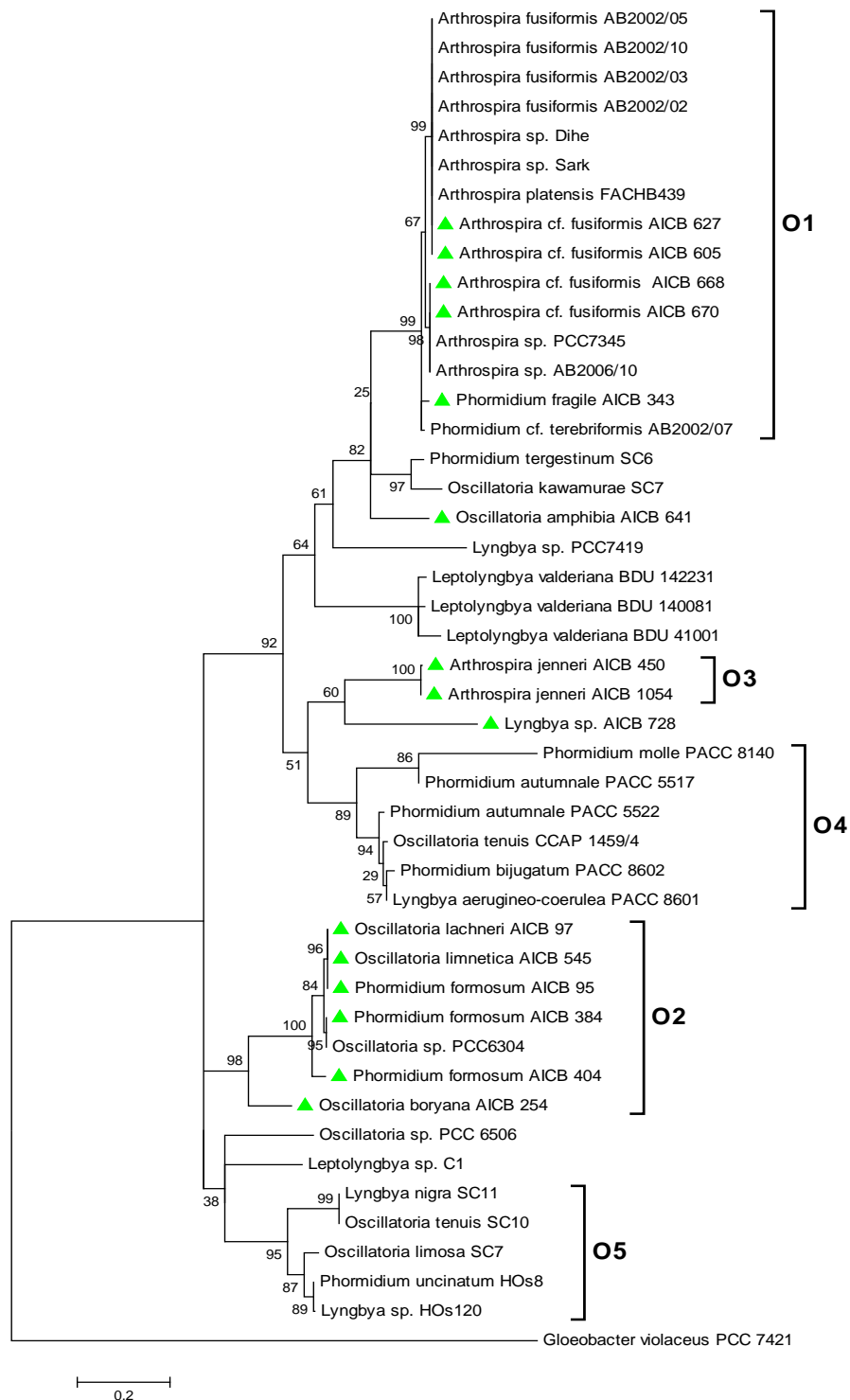
Arborii generați pe baza secvențelor 16S-ITS (fig.7) și *cpcBA*-IGS (fig.8) au prezentat o topologie foarte similară cu 5 clustere, ceea ce susține validitatea grupurilor filogenetice propuse. Distribuția heterogenă în cadrul arborilor filogenetici a tulpinilor din genurile *Phormidium*, *Oscillatoria* și *Lyngbya* (fig.7 și 8) indică caracterul, polifiletic al acestora. Genul *Arthrospira* reprezintă singurul grup omogen dintre tulpinile AICB din ordinul Oscillatoriales studiate. Putem afirma că tulpinile încadrate în acest gen sunt taxoni valizi (susținuți atât morfologic cât și molecular), cu origine monofiletică.

Prezența genei pentru hidrogenaza bidirecțională (*hoxH*) a putut fi detectată și secvențată la 16 dintre cele 18 tulpini AICB (tab.4) iar topologia arborelui *hoxH* (fig.9) este foarte similară cu topologia arborilor 16S-ITS și *cpcBA*-IGS.

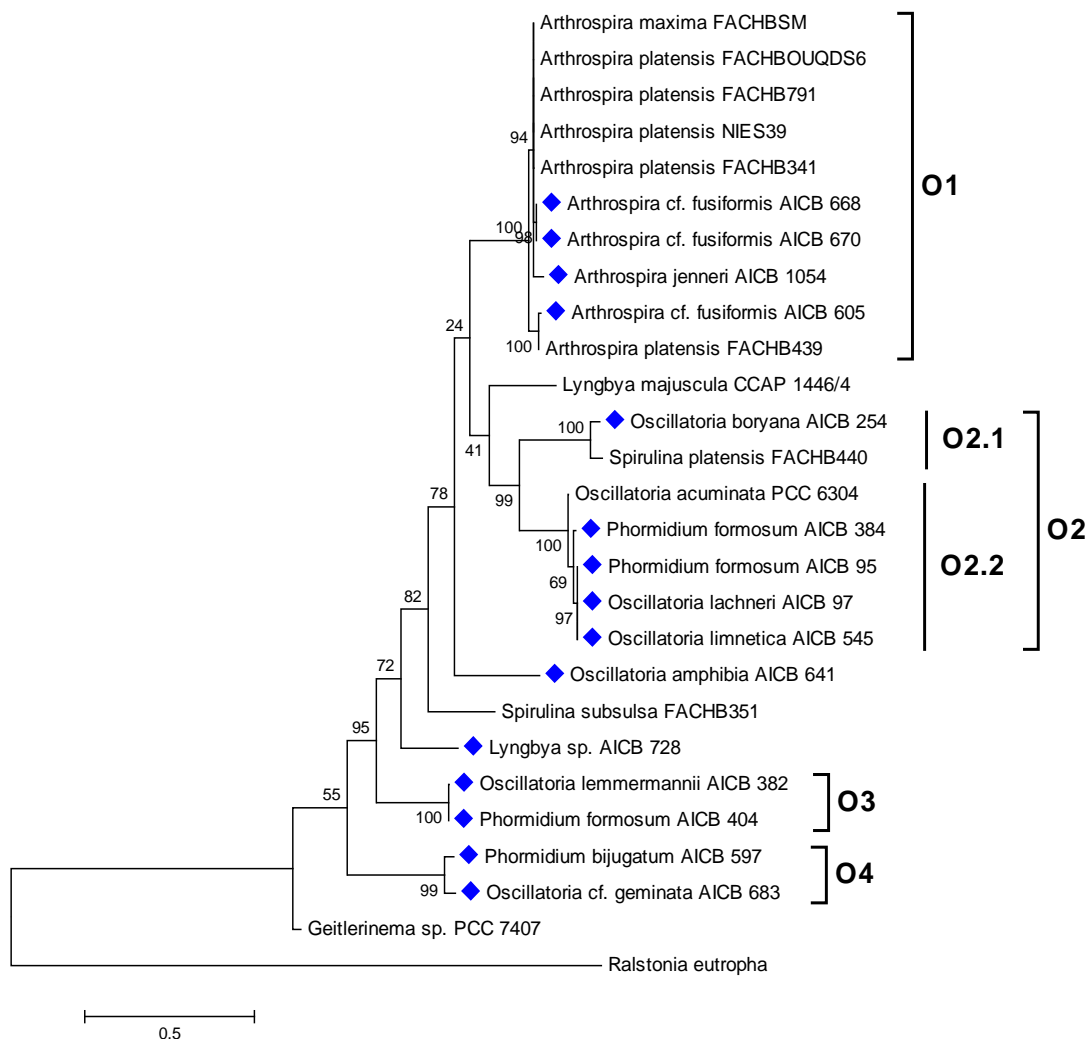
Gruparea tulpinii *Spirulina platensis* FACHB 440 cu tulpinile de *Oscillatoria* și *Phormidium* se datorează probabil transferului lateral de informație genetică și nu unei încadrări taxonomice eronate a acestei tulpini.



**Fig. 7** Arbore Maximum likelihood cu tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Oscillatoriales generat pe baza regiunii 16S-ITS. Secvențele AICB sunt marcate cu buline roșii. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicare) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența cpcBA-IGS de la *Escherichia coli* K-12.



**Fig. 8** Arbore Maximum likelihood generat pe baza regiunii PC-IGS pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Oscillatoriales. Secvențele AICB sunt marcate cu triunghiuri verzi. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicate) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența PC-IGS de la *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.



**Fig. 9** Arbore Maximum likelihood generat pe baza genei *hoxH* pentru tulpinile AICB și tulpini preluate din GenBank din grupul Oscillatoriales. Secvențele AICB sunt marcate cu romburi albastre. Cluster-ele propuse sunt indicate în partea dreaptă. Valorile bootstrap (500 replicate) sunt indicate la nivelul nodurilor. Outgroup-ul folosit a fost secvența *hoxH* de la *Ralstonia eutropha*.

**Tabel nr. 4**

Cele 18 de tulpini cianobacteriene din grupul Oscillatoriales studiate, prezența/absența *hoxH* și numărul de perechi de baze *hoxH* secvențate

Nr. crt	Tulpina	Specia	Prezența/absența <i>hoxH</i>	Nr. perechi de baze <i>hoxH</i>
1	AICB 95	<i>Phormidium formosum</i>	+	901
2	AICB 97	<i>Oscillatoria lachneri</i>	+	903
3	AICB 254	<i>Oscillatoria boryana</i>	+	907



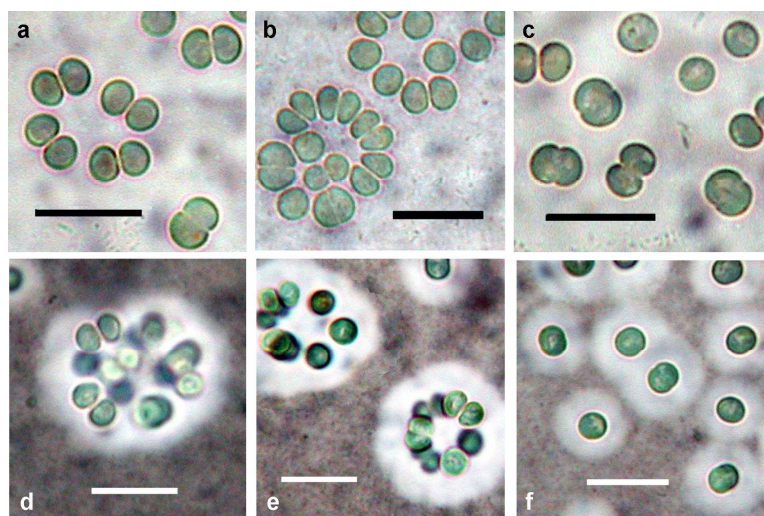
4	AICB 343	<i>Phormidium fragile</i>	-	-
5	AICB 382	<i>Oscillatoria lemmermannii</i>	+	895
6	AICB 384	<i>Phormidium formosum</i>	+	902
7	AICB 404	<i>Phormidium formosum</i>	+	1006
8	AICB 450	<i>Arthrospira jenneriei</i>	-	-
9	AICB 545	<i>Oscillatoria limnetica</i>	+	891
10	AICB 597	<i>Phormidium bijugatum</i>	+	1196
11	AICB 605	<i>Arthrospira fusiformis</i>	+	1207
12	AICB 627	<i>Arthrospira fusiformis</i>	+	1190
13	AICB 668	<i>Arthrospira fusiformis</i>	+	1201
14	AICB 641	<i>Oscillatoria amphibia</i>	+	1188
15	AICB 670	<i>Arthrospira fusiformis</i>	+	1201
16	AICB 683	<i>Oscillatoria geminata</i>	+	1202
17	AICB 728	<i>Lyngbya</i> sp.	+	880
18	AICB 1054	<i>Arthrospira jenneriei</i>	+	1285

## **CAP. VII ULTRASTRUCTURA, TAXONOMIA ȘI FILOGENIA MOLECULARĂ A TULPINII AICB 1012 *Coelomoron pusillum* (Van Goor) Komárek**

Tulpina *Coelomoron pusillum* AICB 1012 este una cu organizare colonială, coloniile fiind formate din mici aglomerări celulare (fig. 10 a-b, d-e). Fotografiera preparatelor „colorate” cu tuș (fig.10 d-f) a evidențiat existența unei matrici/mase mugilaginoase aparent nestructurată, în care sunt înglobate coloniile.

În tab. 5 am prezentat principalele caractere diagnostice evidențiate de noi și variabilitatea acestora, comparativ cu caracterele comunicate în alte 2 lucrări.

Observațiile efectuate în microscopie electronică de transmisie (TEM), (metoda colorației negative) au evidențiat faptul că celulele tulpinii AICB 1012 sunt înconjurate de pili de tip cianobacterian (fig. 11 a-c)



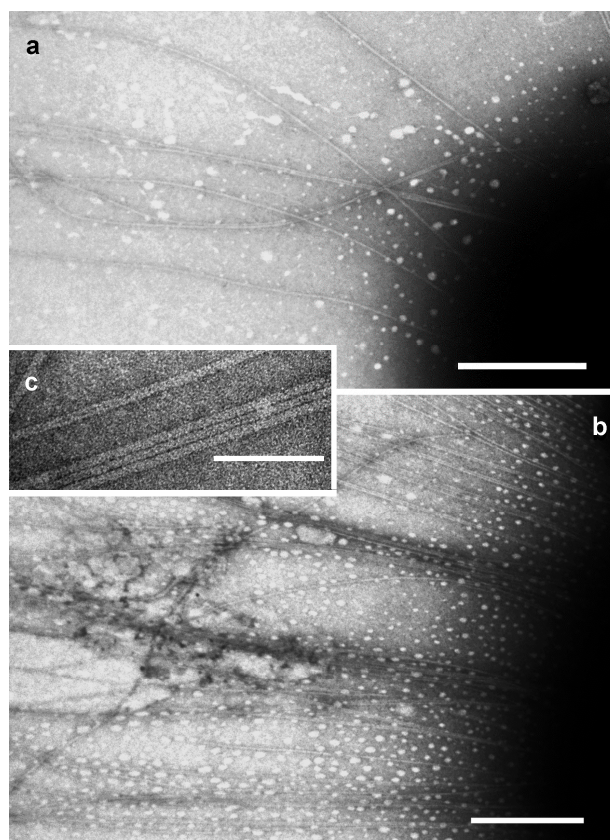
**Fig. 10 (a-f).** *Coelomoron pusillum* AICB 1012 – microscopie optică. Învelișul mucilaginos al coloniilor a fost evidențiat cu tuș (d-f). Coloniile sunt alcătuite dintr-un număr redus de celule, uneori chiar două (f). Au fost observate frecvent celule singulare (c, f), fiecare cu propriul înveliș de mucilagiu (f). Învelișul mucilaginos este slab vizibil fără „colorarea” cu tuș (a-c). În colonii, celulele sunt aranjate periferic, partea centrală a mucilagiului fiind frecvent neocupată de celule (a, e). Bara = 10  $\mu\text{m}$ .

**Tabelul nr. 5**

Caracterele morfologice ale tulpinii *C. pusillum*, observabile în microscopia optică, prezentate comparativ cu cele identificate de alți autori.

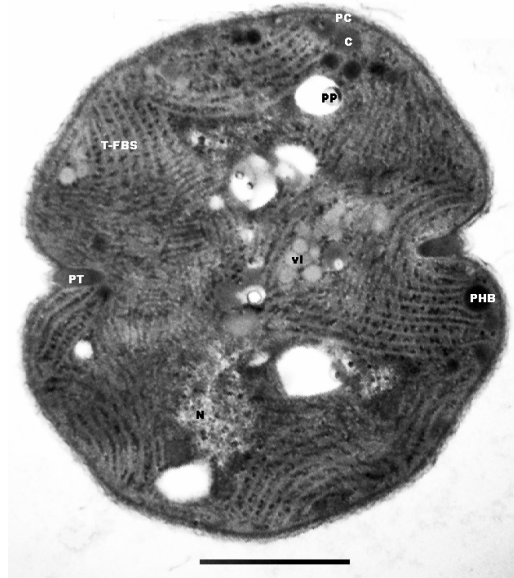
Caracterul morfologic	Komárek și Anagnostidis, 1999	McGregor și colab., 2007	AICB 1012
<b>Forma coloniei</b>	$\pm$ sferică, neregulat ovală	$\pm$ sferică, neregulat ovală	$\pm$ sferică, neregulat ovală
<b>Colonii simple sau compuse</b>	simple, uneori compuse	adesea compuse	simple
<b>Diametrul coloniilor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	15-20-(30)	12,0 – 30,0	14,6 – 27,7 (incl. mucilagiul) 10,1-20,9 (fără mucilagiu)
<b>Forma celulelor</b>	Ovale, obovoide, albastre-verzi, palide	larg ovale sau obovoide, albastre-verzi, palide	sferice sau subsferice, ovale, cele tinere obovoide; albastre-gri, palide, ușor maronii
<b>Dimensiunile celulelor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	2,2-4,5 x 1,8-4	2,2-4,5(-5,5) x 1,8-4,0	3,1-5,4; celulele tinere alungite
<b>Aerotopi</b>	fără aerotopi	fără aerotopi	fără aerotopi

<b>Dispunerea celulelor în colonie</b>	radiară, aranjate la periferie, ușor distanțate și separate unele de altele	aranjare radiară, la periferie; ușor distanțate și desprinse unele de altele	ordonată, la periferia coloniei; celule ușor distanțate
<b>Număr celulelor/colonie</b>	10-30, uneori 2-4	10-30, uneori 2-4	4-15, frecvent 8-9, multe celule solitare
<b>Morfologia mucilagiului</b>	incolor, fluid, poate fi identificat doar după colorare; protuberanțe slab vizibile care radiază din centrul coloniei	incolor, fluid; fire de mucilagiu care radiază din centrul coloniei, dificil de observat.	incolor, identificabil doar cu tuș, aparent nestructurat
<b>Dimensiunile mucilagiului (μm)</b>	cca. 2,5, extins la exteriorul stratului de celule	1,2-2,5	2,25 – 3,4

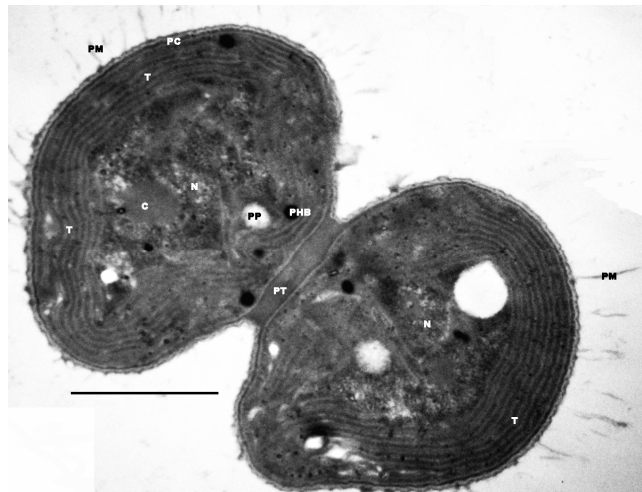


**Fig. 11 (a-c).** *Coelomorom pusillum* AICB 1012. Microfotografiile ale pililor de tip cianobacterian, observați în microscopia electronică de transmisie (TEM) prin colorarea negativă a suspensiilor celulare nefixate. Pili iradiază de pe suprafața celulei și depășesc de câteva ori dimensiunea acestora. Pili pot forma fascicule prin asociere (c). Bara = 500 nm (fig. 5 a-b), respectiv 100 nm (fig. 5 c).

Organizarea generală a unei celule de *C. pusillum* este prezentată în fig. 12-13.

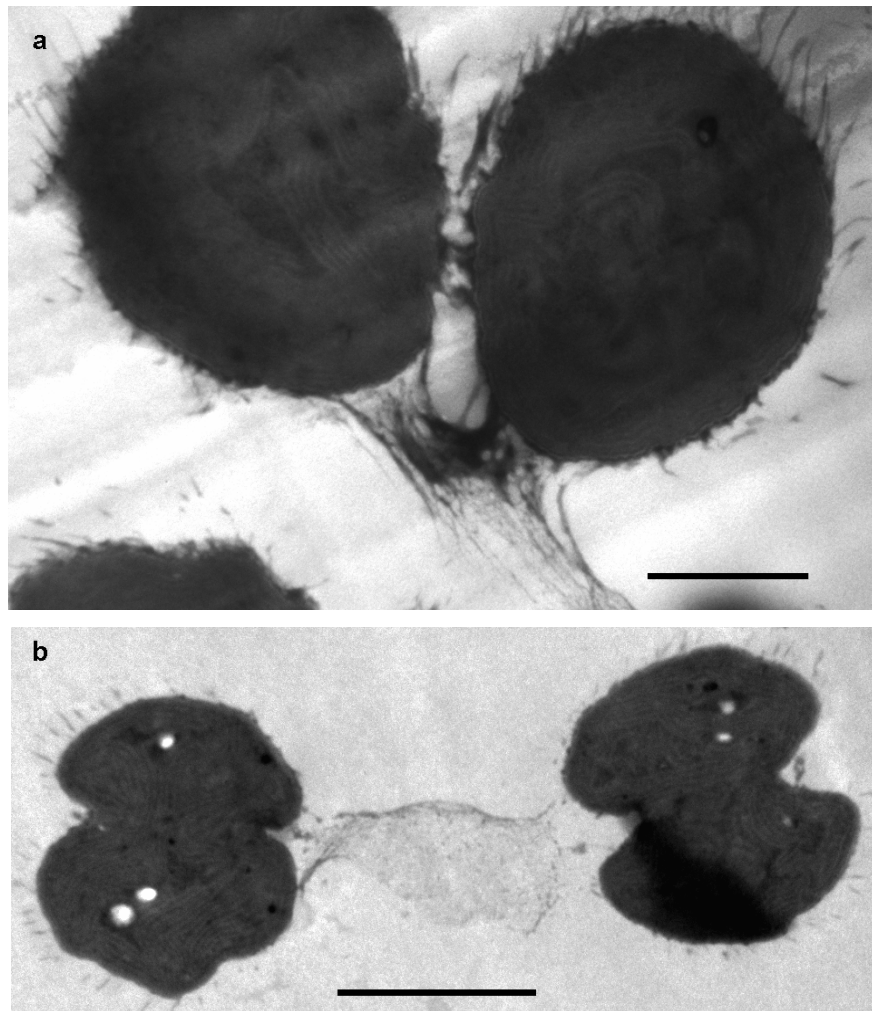


**Fig. 12.** Secțiune longitudinală printr-o celulă de *Coelomonon pusillum* AICB 1012 în curs de diviziune. Tilacoidele sunt dispuse periferic (parietal), cu ficobilisomii atașați în șiruri regulate (T-FBS). Partea centrală a celulelor este ocupată de nucleoid (N). Peretele transversal (PT) în curs de formare a fost secționat simetric. În citoplasmă au fost identificate următoarele structuri: peretele celular parental (PC), granule de polihidroxitirac (PHB), carboxisomi (C) și structuri de tip vezicular („vesicle-like” – vl). Bara=1μm.

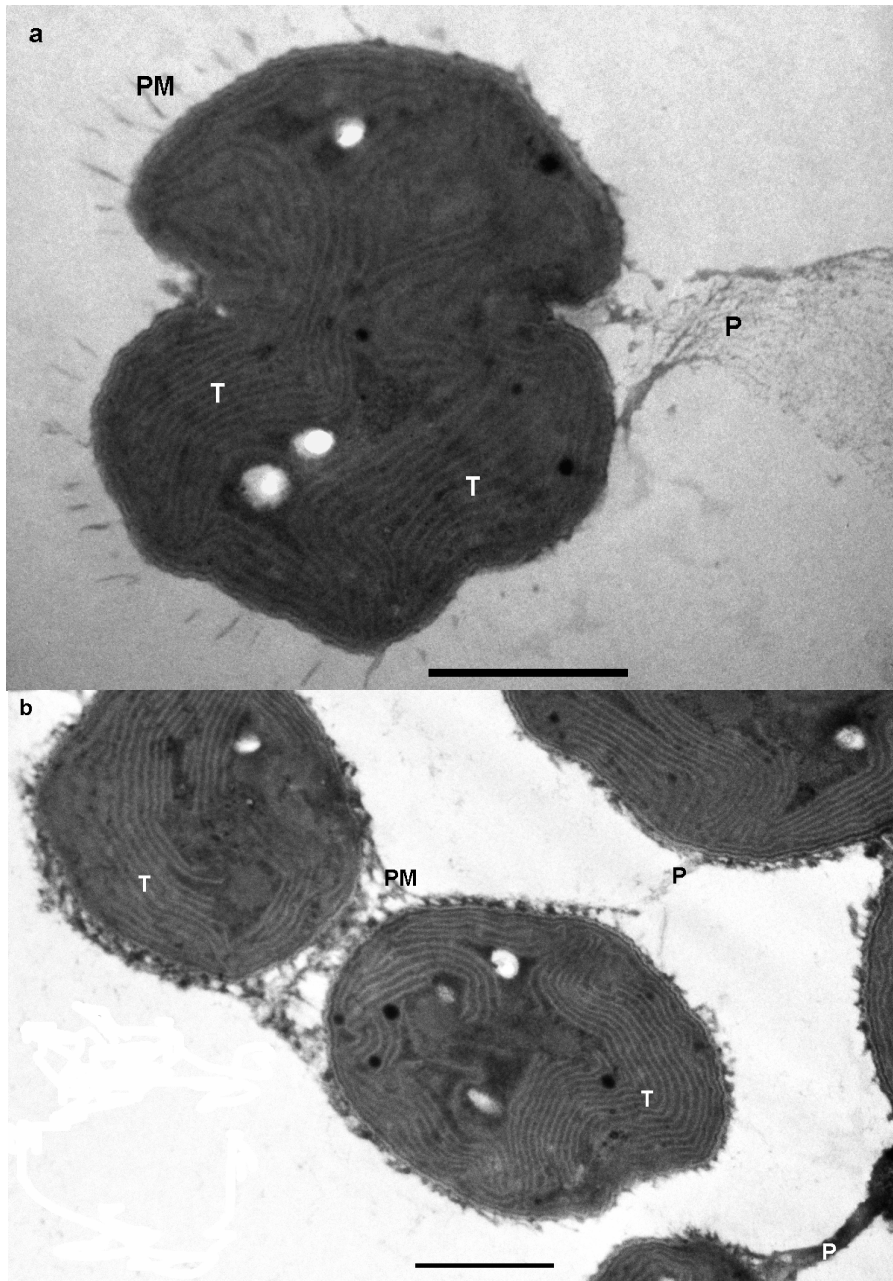


**Fig. 13.** Secțiune longitudinală printr-o celulă de *Coelomonon pusillum* AICB 1012 în curs de diviziune. Se pot observa aceleași structuri ca cele deja evidențiate în fig. 7. Deosebiri față de figura precedentă constau în evidențierea a numeroase prelungiri mucilaginoase filiforme (PM) dispuse mai mult sau mai puțin regulat pe întreaga circumferință a celulei, evidențierea traiectului paralel cu peretele celular al tilacoidelor (T) și structura peretelui celular cu stratul peptidoglicanic extrem de dezvoltat (gros) la nivelul peretelui transversal (PT) care separă celulele fiice. Bara=1μm.

În secțiunile noastre am observat în interiorul coloniilor prezența unor formațiuni mucilaginose pedunculare (fig.14, 15) care conectează și mențin celulele în colonie, precum și numeroase prelungiri nestructurate, probabil mucilaginose, distribuite discret dar uniform pe toată suprafața celulelor (fig.16 b). Examinarea atentă a permis deasemenea evidențierea unor pori care străbat (perforează) peretele celular (fig.17). Existența porilor dar și distribuția lor uniform pe toată circumferința celulei (fig. 17 a) sau preferențial în imediata apropiere a peretelui transversal (fig.17 b), explică formarea prelungirilor mucilaginose precum și a pedunculilor mucilagiноși.

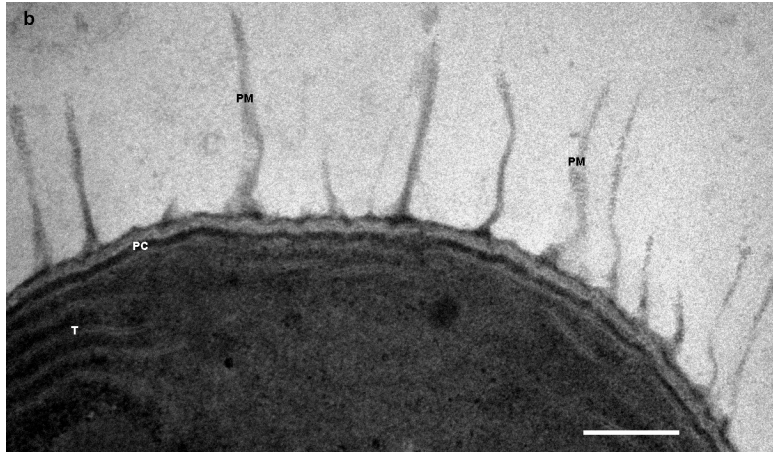


**Fig. 14 (a-b).** *C. pusillum* AICB 1012 în TEM. În ambele figuri sunt evidențiați pedunculii mucilagiноși care susțin celulele și le ordonează în cadrul coloniei. Mucilagiul este nestructurat (a, b) și aparent dicotomic (a), fiecare celulă fiind susținută de o ramificație pedunculară (a). Planul fisiunii binare al celulelor este paralel cu cel peduncular (b). Barele: a=1 $\mu$ m, b=2  $\mu$ m.

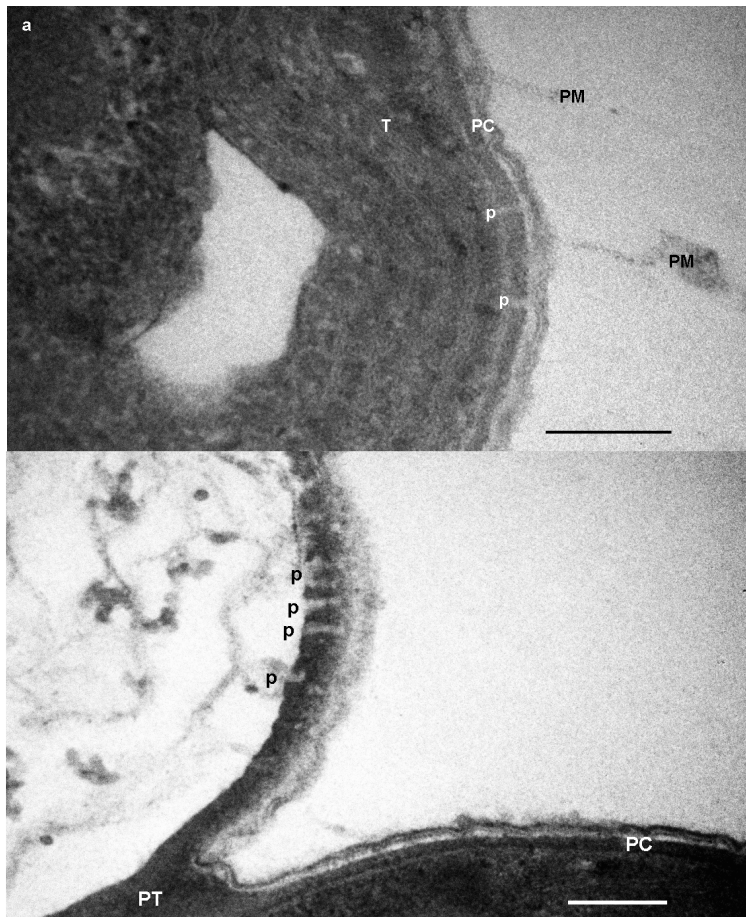


**Fig. 15 (a-b).** *C. pusillum* AICB 1012 în TEM. În 11a este prezentată o celulă în curs de diviziune, cu prelungiri mucilaginoase răspândite pe toată circumferința și cu un peduncul mucilaginos ancorat la nivelul zonei de formare a peretelui transversal. În fig. 11b se evidențiază puntea pe care o formează prelungirile mucilaginoase între 2 celule adiacente după ce fisiunea binară a avut loc. Notațiile sunt cele folosite în figurile anterioare. Barele=1  $\mu\text{m}$ .



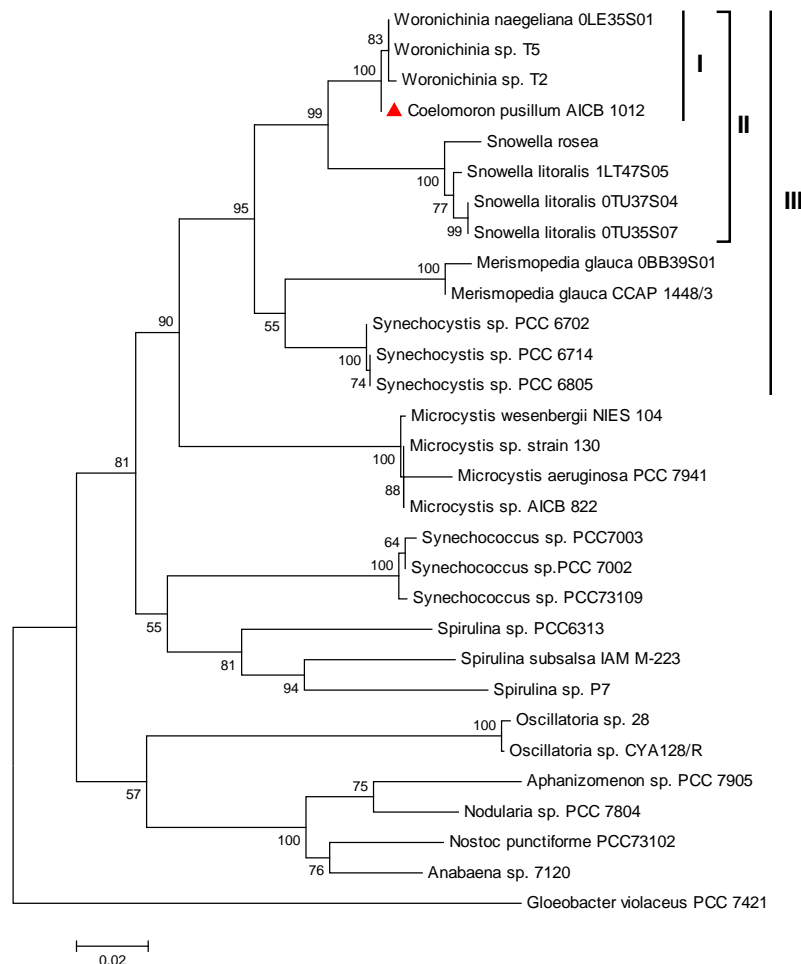


**Fig. 16.** *C. pusillum* AICB 1012 în TEM. Detaliu al prelungirilor mucilaginoase. Notății ca în figurile anterioare. Barele: a=500nm, b=200nm



**Fig. 17 (a-b).** *C. pusillum* AICB 1012 în TEM. Fig.12a – Peretele celular cianobacterian este străbatut de pori (p) care, aparent, par implicați în externalizarea/secreția mucilagiului. Porii pot fi bine observați la nivelul stratului peptidoglicanic. Frecvența porilor este aparent mai mare în zona de formare (proximitatea) a peretelui celular transversal (fig.12b), după cum se poate observa în secțiunea tangențial-oblică de la acest nivel. Barele = 200 nm.

Arborii rezultați prin aplicarea a trei metode diferite au fost foarte similari, ceea ce sugerează faptul că probabil ceea ce putem observa sunt într-adevăr relațiile filogenetice corecte dintre tulpina de *Coelomoron pusillum* AICB1012 studiată și celelalte tulpini cianobacteriene. Gruparea acesteia cu tulpini din genurile *Woronichinia* și *Snowella* este în acord cu clasificarea făcută de Komarek și Anagnostidis (1999) după codul botanic de nomenclatură încadrându-se în subfamilia Gomphosphaerioideae (fig. 18 grupul II). Putem constata astfel că încadrarea făcută tulpinii *Coelomoron pusillum* AICB 1012 pe baze morfologice este ferm susținută și de datele de filogenie moleculară.



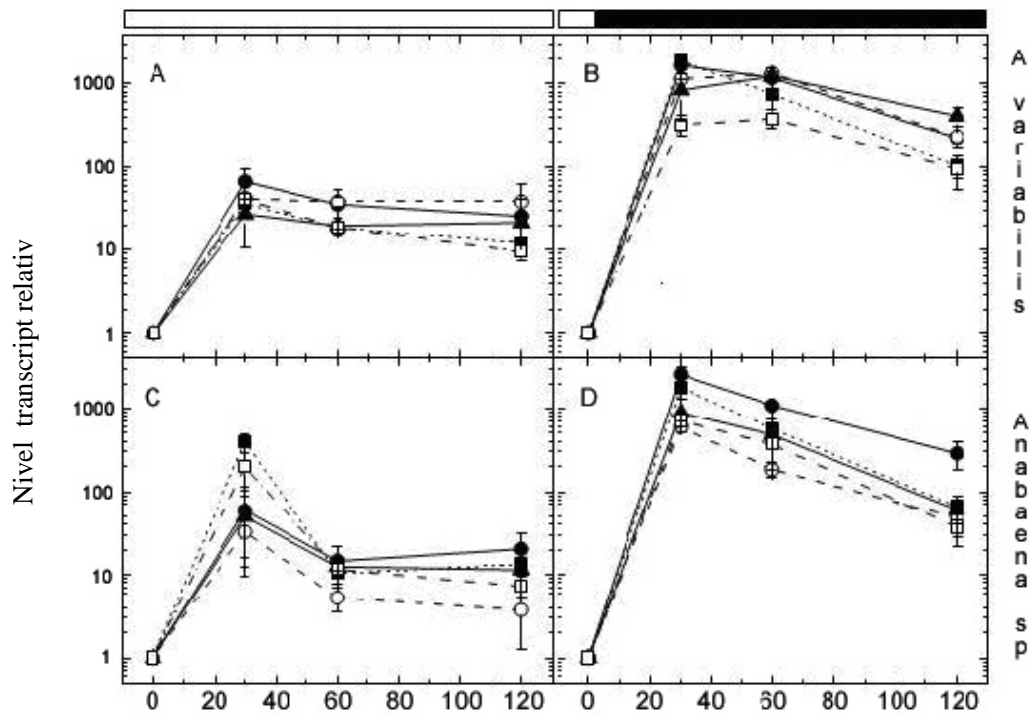
**Fig. 18** Arbore Maximum Likelihood (ML) obținut pe baza secvențelor 16S care arată relațiile filogenetice dintre tulpina studiată, *Coelomoron pusillum* AICB 1012 și tulpini din ordinele Chroococcales, Nostocales și Oscillarioales. La noduri sunt reprezentate valorile de bootstrap pentru 1000 de replicare. Outgroup-ul folosit este reprezentat de secvența 16S de la cianobacteria *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.



## CAP.VIII REGLAREA TRANSCRIȚIONALĂ A HIDROGENAZEI BIDIREȚIONALE SUB INFLUENȚA LUMINII ȘI OXIGENULUI LA TULPINI CIANOBACTERIENE DIN ORDINUL NOSTOCALES

### ➤ Efectul luminii asupra expresiei genelor *hox* în condiții de anaerobioză

Genele *hox* au prezentat cea mai ridicată inducție în prima probă prelevată în timpul incubăției anaerobe care a fost luată la 30 de minute după ce concentrația de oxigen dizolvat din mediul de cultură a scăzut sub  $1\mu\text{M}$ : *hoxE*  $70\pm 25$  ori la *Anabaena variabilis* ATCC 29413 și *hoxY* și *hoxH* de  $400\pm 100$  și  $200\pm 80$  la *Anabaena* sp. PCC7120 (fig.19 A și C).



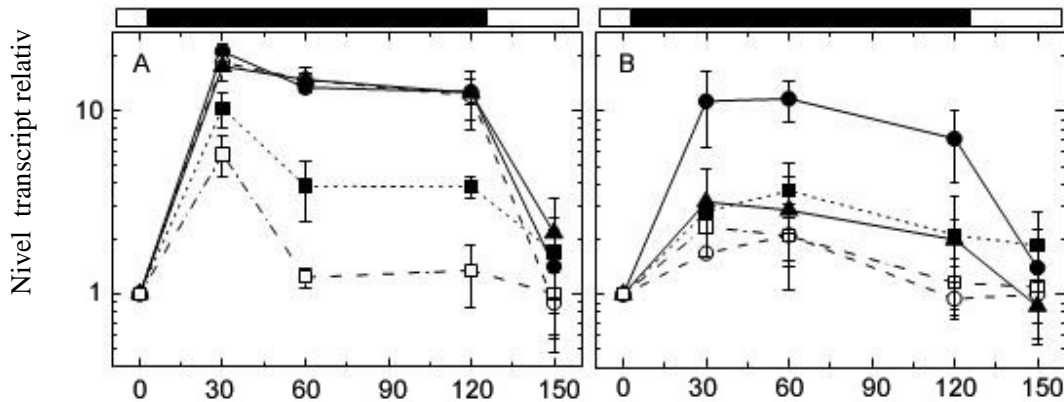
**Fig. 19** Efectul luminii asupra inducției genelor *hox* în anaerobioză. Concentrația de oxigen din mediul de cultură de la *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (A și B) și *Anabaena* sp. PCC7120 (C și D) a fost sub  $1\mu\text{M}$  pe durata celor 2 ore la lumină (A și C) sau întuneric (B și D). Nivelurile de expresie de la genele *hoxE* (cerc plin), *hoxF* (cerc gol), *hoxU* (triunghi plin), *hoxY* (patrat plin) și *hoxH* (pătrat gol) sunt prezentate după normalizarea la valorile lor inițiale adică 1. Barele de eroare corespund deviației standard derivată din trei experimente independente. Barele de culoare albă și neagră reprezintă perioadele de lumină respectiv întuneric.

În cazul creșterii celulelor cianobacteriene în anaerobioză și întuneric, la momentul 30 minute se poate observa o creștere a cantității de transcript *hox* acumulat cu trei ordine de magnitudine față de condițiile normale de creștere (fig.19 B și D).

➤ Efectul reversibil al luminii asupra reglării transcripționale a hidrogenazei bidirecționale

La *Anabaena variabilis* pe perioada celor 2 ore de incubare la întuneric genele *hoxE*, *hoxF*, *hoxU* care codifică subunitatea diaforazică au avut un nivel relativ de expresie ridicat, în timp ce genele *hoxY* și *hoxH* care codifică subunitatea catalitică a hidrogenazei au avut un nivel de expresie considerabil mai redus (fig.20 A).

În cazul tulpinii de *Anabaena* sp. PCC7120, genele *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* și *hoxH* au fost induse moderat față de gena *hoxE*. Efectul reversibil al întunericului a fost mai evident în cazul genelor *hoxE* și *hoxU* comparativ cu celelalte gene *hox* de la *Anabaena* sp. PCC 7120 (fig.20 B).



**Fig. 20** Inducția la întuneric a genelor *hox* în culturi aerobe. În perioada de incubare la întuneric celulele de *A. variabilis* (A) și *Anabaena* sp.(B) au fost ținute la o concentrație atmosferică de oxigen suplimentat cu 2% CO<sub>2</sub>. Nivelurile de expresie de la genele *hoxE* (cerc plin), *hoxF* (cerc gol), *hoxU* (triunghi plin), *hoxY* (patrat plin) și *hoxH* (pătrat gol) sunt prezentate după normalizarea la valorile lor inițiale adică 1. Barele de eroare corespund deviației standard derivată din trei experimente independente. Barele de culoare albă și neagră reprezintă perioadele de lumină respectiv întuneric.

## CONCLUZII GENERALE

- Arborii generați pe baza secvențelor 16S-ITS și cpcBA-IGS au prezentat o topologie foarte similară, ceea ce susține validitatea grupurilor filogenetice propuse și confirmă capacitatea acestor markeri moleculari de a discrimina chiar până la nivel de tulpină diferitele specii precum și validitatea utilizării lor în studii filogenetice la cianobacterii.
- Hidrogenaza bidirecțională a putut fi detectată și secvențată la un număr de 60 (85.7%) din cele 70 de tulpini AICB utilizate. Lipsa amplificării la cele 10 (14.3%) tulpini AICB sugerează absența genei *hoxH* ceea ce este în perfect acord cu studiile anterioare asupra distribuției *hoxH*.
- Topologia arborilor generați pe baza secvențelor *hoxH* este similară cu topologia arborilor 16S-ITS și cpcBA-IGS ceea ce indică faptul că filogenia genei *hoxH* la cianobacterii este similară cu filogenia organismelor de la care acestea provin.
- Cu ajutorul filogeniei moleculare am reușit în lucrarea de față să semnalăm pentru prima dată în literatură prezența transferului genetic lateral la hidrogenazele bidirecționale cianobacteriene. Acest fenomen a putut fi evidențiat în 4 cazuri pentru tulpinile AICB: *Anabaena oscillatorioides* AICB 563 și *Nostoc*; *Merismopedia* sp. AICB 1014, 1015 și *Microcystis* sau *Spirulina platensis* FACHB 440 și *Oscillatoria* cât și între tulpini aparținând unor ordine diferite: *Coelomoron pusillum* AICB 1012 (Chroococcales) și *Oscillatoria amphibia* AICB 641 (Oscillatoriales).
- La nivelul genului *Coelomoron* (tulpina AICB 1012) a fost efectuat, în premieră, un studiu ultrastructural și filogenetic avansat cu evidențierea fimbriilor cianobacteriene, a prelungirilor mucilaginoase și a pedunculilor mucilaginoși.
- Formarea pedunculilor și ramificarea acestora la tulpina AICB 1012 a fost explicată, de asemenea în premieră, prin evidențierea dispunerii preferențiale și simetrice a porilor la nivelul peretelui trasversal prin care se realizează diviziunea binară a celulei.
- Pe baza inducției în aerobioză la întuneric a genelor *hox* la tulpinile de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 și *Anabaena* sp. PCC 7120 putem afirma faptul că

hidrogenaza bidirecțională pare a fi implicată în procesul de respirație aerobă la aceste cianobacterii.

### **Bibliografie selectivă**

- Appel, J., Schultz, R., (1996), Sequence analysis of an operon of NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NADP(H)<sup>-</sup> dehydrogenase (complex I), *Biochim Biophys Acta*, 1298:141-147.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmuller, K., Schultz, R., (2000), The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis sp.* PCC 6803 works like an electron valve during photosynthesis, *Arch Microbiol*, 173:333-338.
- Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N., Yagi, T., (1999), Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H<sub>2</sub>, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution, *Structure*, 7:549-556.
- Higuchi, Y., Toujou, F., Tsukamoto, K., Yagi, T., (2000), The presence of a SO molecule in [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki as detected by mass spectrometry, *J. Inorg. Biochem.*, 80:205-211.
- Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N., (1997), Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis, *Structure*, 5:1671-1680.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K.H. (1993), Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATPSynthase β-Subunit genes, *Antonie van Leeuwenhoek*, 64:285–305.
- Ludwig, M., Schulz-Friedrich, R., Appel, J., (2006), Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: implications for the phylogenetic origin of cyanobacterial and algal hydrogenases, *J Mol Evol*, 63:758–768.

- Neilan, B. A., Jacobs, D., Goodman, A. E., (1995), Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus, *Appl. Environ. Microbiol*, 61:3875–3883.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., Bothe, H., (1995), Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria, *Eur J. Biochem*, 233:266-276.
- Schmitz, O., Bothe, H., (1996), The diaphorase subunit *HoxU* of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften*, 83:525-527.
- Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S., Happe, T., (2002), *HoxE* - a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex ( *HoxEFUYH*) of cyanobacteria, *Biochim Biophys Acta*, 1554: 66-74.
- Schutz, K., Happe, T., Troshina, O., Lindblad, P., Leitao, E., Oliveira, P., Tamagnini, P., (2004), Cyanobacterial H<sub>2</sub> production - a comparative analysis, *Planta*, 218:350-359.
- Sheremetieva, M.E., Troshina, O.Y., Serebryakova, L.T., Lindblad, P., (2002), Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions, *FEMS Microbiol Lett*, 214:229–233.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K.W., Han, C.S., Rubin, E.M., Eisen, J.A., Woyke, T., Gugger, M., Kerfeld, C.A., (2013), Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing, *PNAS*, 110(3):1053–1058.
- Stal, L.J., Moezelaar, R., (1997), Fermentation in cyanobacteria, *FEMS Microbiol Rev*, 21:179–211.
- Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R., Lindblad, P., (1997), Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme, *Appl Environ Microbiol*, 63: 1801–1807.

- Tamagnini, P., Costa, J-L., Almeida, L., Oliveira, M-J., Salema, R., Lindblad, P., (2000), Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach, *Curr Microbiol*, 40:356–361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., Lindblad, P., (2002), Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria, *Microbiol Mol Biol Rev*, 66:1-20.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira., D., Pinto, F., Harris, D.J., Heidorn, T., Lindblad, P., (2007), Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications, *FEMS Microbiol Rev*, 31:692-720.
- Troshina, O., Serebryakova, L.T., Sheremetieva, M.E., Lindblad, P., (2002), Production of H<sub>2</sub> by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation, *Int J Hydrogen Energy*, 27:1283–1289.
- Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., Fontecilla-Champs, J.C., (1995), Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature*, 373:580-587.
- Whitton, B.A., Potts, M., (2000), Introduction to the cyanobacteria. In: Whitton, B.A., Potts, M., (eds.), *The ecology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.1-11.
- Woese, C.R., (1987), Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, 51:221–271.

## **Cuvinte cheie**

Cianobacterii; colecția AICB; hidrogenaze bidirecționale; ARNr 16S-ITS; locus ficocianinic; filogenie moleculară; real-time PCR.