



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Identificação molecular e criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) isoladas de águas continentais brasileiras

Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi

Brasília – DF
Fevereiro de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Identificação molecular e criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) isoladas de águas continentais brasileiras

Orientador: Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Tocantins,
como parte das exigências do curso de
pós-graduação em Biotecnologia, para
obtenção do título de “Mestre”.

Brasília – DF
Fevereiro/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, sob orientação do professor e pesquisador Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, com o título “Identificação molecular e criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) isoladas de águas continentais brasileiras”. Apoio financeiro da CAPES. Defendida em 23 de fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Embrapa Agroenergia & Universidade Federal do Tocantins
(Orientador)

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Embrapa Agroenergia & Universidade Federal do Tocantins
(Examinador)

Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Embrapa Agroenergia
(Examinador externo)

Prof^a. Dr^a. Betânia Ferraz Quirino
Embrapa Agroenergia
(Examinador externo)

BRASÍLIA – DF
FEVEREIRO DE 2015

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos que possuem estrutura celular eucariótica e podem apresentar-se em formas coloniais ou livres. Estes organismos vem sendo amplamente estudados para aplicação em biorremediação e em biorrefinarias. Seu potencial biotecnológico destaca-se na produção de biocombustíveis e bioprodutos, por apresentarem características como alta taxa de crescimento e alta capacidade de armazenamento de substâncias de reserva, como lipídios e amido. Coleções de recursos genéticos e programas de melhoramento, tem como pré-requisito a identificação e manutenção a longo prazo dos organismos depositados nesta coleção. Desta forma, dois marcadores moleculares, o gene cloroplastídeo *rbcL* e a região ITS2 do DNA ribossômico nuclear, foram utilizados como *barcodes* de DNA para identificação das cepas microalgais coletadas de águas continentais brasileiras, depositadas na Coleção de Microrganismos Aplicados à Agroenergia da Embrapa. Para manutenção dos recursos genéticos desta coleção em estado metabólico inativo, aplicou-se o método de criopreservação aliado a estratégia de resfriamento lento, utilizando os compostos químicos metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes crioprotetores. Os resultados demonstraram que ambos os marcadores possuem variabilidade semelhante. A região ITS2 apresentou *primers* com maior universalidade, enquanto o gene *rbcL* um maior poder de discriminação de espécies e um banco de dados com curadoria taxonômica. Os resultados observados nos testes de criopreservação demonstraram que é possível utilizar este método para manutenção de microalgas continentais brasileiras em estado metabólico inativo, utilizando DMSO em concentração de 10% como agente crioprotetor.

Palavras-chaves: microalgas, algas verdes, chlorophyta, identificação molecular, marcador molecular, *rbcL*, ITS2, *barcode* de DNA, criopreservação.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic unicellular organisms that have eukaryotic cell structure and occur in colonial or free forms. These organisms have been widely studied in the application of bioremediation and as biorefineries. Their biotechnological potential stands out in the production of biofuels and bioproducts, because they have features like high growth rate and high storage capacity of reserve substances, such as lipids and starch. Collections of genetic resources and breeding programs have as a prerequisite the identification and long-term maintenance of the organisms of this collection. Thus, two molecular markers, the chloroplastid gene *rbcL* and the ITS2 region of the nuclear ribosomal DNA were used as DNA barcodes for identification of microalgal strains collected from Brazilian continental waters, deposited in Embrapa's Collection of Microorganisms Applied to Agroenergy. For long-term maintenance of the genetic resources in this collection, we applied the method of cryopreservation combined with a slow cooling strategy, using the chemical compounds methanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectants agents. Results showed that both markers have a similar variability. The ITS2 region has presented primers with a higher universality, while the *rbcL* gene a higher discrimination power and a taxonomic curated database. The results obtained in cryopreservation tests have shown that it is possible to use this method for maintenance of Brazilian continental microalgae in a metabolic inactive state, using DMSO in a 10% concentration as a cryoprotectant agent.

Keywords: microalgae, green algae, chlorophyta, molecular identification, molecular marker, *rbcL*, ITS2, DNA barcode, cryopreservation.

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a toda minha família, em especial meus pais, Mohamed Hadi e Elenice Hadi, pelo apoio, amor, carinho e os enormes esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A Universidade Federal do Tocantins (UFT) pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

A todos os professores da UFT, em especial ao professor Dr. Gessiel Newton Scheidt e ao professor Sidnei Emilio Bordignon Jr., pelos ensinamentos, conselhos e momentos de agradável companhia.

A Embrapa Agroenergia e toda sua equipe, pela oportunidade de realização deste trabalho e sua confiança em mim depositada.

Ao professor e pesquisador Dr. Félix Gonçalves de Siqueira, e meu orientador, professor e pesquisador Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, pela oportunidade e paciência, por compartilharem seus conhecimentos e pela honra de trabalhar ao lado dos senhores.

A Taísa Godoy Gomes, por todo o companheirismo, amor e aventuras que compartilhamos nos últimos anos.

A Ana Thereza Rodrigues, Ilmara Rodrigues e Silvio Cezar Rodrigues, por me acolherem como parte da família, pela verdadeira amizade, as incontáveis ajudas e os ótimos momentos juntos.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que me apoiaram e acreditaram, serão sempre lembrados com grande apreço.

“Inteligência é a capacidade de se
adaptar à mudança.”

Stephen Hawking

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura secundária da região nuclear ITS2 (nu ITS2 rRNA), ancorada pelo final do rRNA 5.8S (seta a) e pelo início do rRNA 28S (seta b).24
- Figura 2.** Demonstração da disposição do DNA ribossômico eucariótico, com as regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2), as regiões intergênicas (IGS) e a localização aproximada dos sítios de anelamento dos primers utilizados neste estudo (indicados pelas setas). 31
- Figura 3.** Sítios de anelamento no gene *rbcL* de todos os primers utilizados neste estudo. As setas de cor azul indicam os primers forward, e as de cor laranja os primers reverse. 32
- Figura 4.** Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador ITS2 obtidas de 47 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados GenBank foram incluídos. 48
- Figura 5.** Árvore filogenética construída por meio do método Profile Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo Jukes Cantor, referente a sequência de nucleotídeos e estrutura secundária da região ITS2, das 42 cepas anotadas pelo ITS2Database. Os acessos de maior pontuação utilizados como modelo para predição das estruturas de cada cepa foram incluídos. 50
- Figura 6.** Árvore filogenética construída através do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador *rbcL* obtidas de 49 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados GenBank foram incluídos. 57
- Figura 7.** Árvore filogenética construída através do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador *rbcL* obtidas de 49 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados BOLD foram incluídos. 58
- Figura 8.** Demonstração gráfica comparando a viabilidade observada em 44 cepas de microalgas, após criopreservação em ultrafreezer -80°C durante 47 dias, com DMSO 10% ou metanol 10% como agentes crioprotetores. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e características de todos os primers utilizados neste estudo.	33
Tabela 2. Percentual de sucesso de amplificação e sequenciamento de todos os pares de primers testados.	40
Tabela 3. Resultados obtidos com as sequências da região nuclear ITS2, amplificada em 47 cepas, e do gene cloroplastídeo <i>rbcL</i> , amplificado em 49 cepas.....	42
Tabela 4. Identificação das 47 cepas amplificadas com o par de primers para a região ITS2 (Fw_ITS2/Rv_ITS2), em comparação ao banco de dados GenBank. E em comparação ao banco de dados ITS2Database com as 43 cepas que tiveram a região ITS2 anotada por este sistema.....	44
Tabela 5. Identificação das 49 cepas amplificadas com os dois pares de primers para o gene <i>rbcL</i> (Fw_ <i>rbcL</i> _192/Rv_ <i>rbcL</i> _657; Fw_ <i>rbcL</i> _375/Rv_ <i>rbcL</i> _1089), em comparação aos bancos de dados GenBank e BOLD.	53
Tabela 6. Porcentagem de recuperação de células após criopreservação utilizando DMSO 10% e Metanol 10%, em comparação ao crescimento controle das 44 cepas de microalgas (LBA#1 a LBA#44).	62
Tabela 7. Incongruências observadas na identificação com os dois marcadores e seus bancos de dados.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

µm – Micrômetro

µL – Microlitro

BBM – Bold's Basal Medium

BG-11 – Blue Green Medium

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BOLD – Barcode of Life Data Systems

BSA – Bovine Serum Albumin – Albumina do Soro Bovino

CBOL – Consortium for the Barcode of Life

CO₂ – Dióxido de Carbono

COI – Citocromo C Oxidase Subunidade 1

CTAB – cetil-trimetilamônio

D2/D3 – região do LSU

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Deoxynucleotide Triphosphate – Dexosinucleotídeo Trifosfato

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fw – Forward

gDNA – genomic DNA – DNA genômico

HCl – Ácido Clorídrico

ha – Hectares

IGS – Intergenic Spacer – Região Espaçadora Intergênica

ITS – Internal Transcribed Spacer – Região Espaçadora Interna

LBA – Laboratório de Biotecnologia e Algas

LSU – Large Ribosomal Subunit

matK – Maturase K

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NCBI – National Center of Biotechnology Information

nu ITS2 rRNA – Nuclear Internal Transcribed Spacer 2 ribosomal RNA

pb – Pares de Bases

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PVP – Polyvinylpyrrolidone – Polivinilpirrolidona

rbcl – RuBisCO Large Subunit

RCF – Relative Centrifugal Force – Força Centrífuga Relativa

rDNA – Ribosomal Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico
Ribossômico

RNA – Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico

rRNA – Ribosomal Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico Ribossômico

RuBisCO - Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase

Rv – Reverse

SB – Sodium Boric Acid – Ácido Bórico de Sódio

Taq – *Thermus aquaticus*

Tris – Tris Hydroxymethyl Aminomethane - Tris Hidroximetil Aminometano
ton – Toneladas

tufA – Elongation factor Tu

UPA – Universal amplicon

V – Volts

SUMÁRIO

I. REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 Introdução.....	15
1.2 O Potencial Biotecnológico das microalgas.....	16
1.3 As algas verdes (Chlorophyta)	18
1.4 Prospecção e melhoramento de microalgas no Brasil	19
1.5 Identificação molecular de microalgas	21
1.6 Criopreservação de microalgas.....	25
II. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos	28
III. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Cepas e condições de cultivo	29
3.2 Extração de DNA	29
3.3 Amplificação por PCR da região ITS2 e do gene <i>rbcl</i>.....	30
3.4 Quantificação do DNA e eletroforese.....	34
3.5 Sequenciamento e análise dos dados.....	34
3.6 Identificação molecular	35
3.7 Criopreservação	36
IV. RESULTADOS.....	39
4.1 Identificação por meio do marcador ITS2.....	39
4.2 Identificação por meio do marcador <i>rbcl</i>.....	51
4.3 Criopreservação	59
V. DISCUSSÃO	63
VI. CONCLUSÃO	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Introdução

Atualmente, a geração de energia utilizando combustíveis fósseis é considerada insustentável, não apenas por ser um recurso limitado, como também pelos efeitos negativos ao meio ambiente (Demirbas & Demirbas, 2011). Nos últimos anos, a demanda por energias renováveis tem crescido consideravelmente por todo o mundo. O Brasil possui 43% de sua matriz energética baseada em recursos renováveis, e é um dos líderes mundiais na produção de biocombustíveis (Quirino et al., 2014). Atualmente, a soja é a principal matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil, porém seu baixo rendimento de óleo, competição por terras agricultáveis e o constante aumento na demanda por este biocombustível, vem direcionando as pesquisas para fontes de produção alternativas.

As algas são organismos fotossintéticos encontrados em diversos ambientes aquáticos. As macroalgas são classificadas de acordo com sua pigmentação em três grandes grupos: as algas marrons (Phaeophyceae); algas vermelhas (Rhodophyceae); e as algas verdes (Chlorophyceae). As microalgas podem ser categorizadas por diversos fatores, como pigmentação, ciclo de vida ou estrutura celular, porém, de acordo com sua abundância, podem ser divididas em três principais classes: as diatomáceas (Bacillariophyceae); as microalgas verdes (Chlorophyceae); e as crisofíceas, ou microalgas douradas (Chrysophyceae). As cianobactérias (Cyanophyceae), ou algas azuis, também são referenciadas como microalgas, porém são organismos com estrutura celular procariótica (Brasil & Brunale, 2014; Demirbas, 2010).

Estes organismos utilizam a luz solar, água e dióxido de carbono como fonte para produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos). Desta forma, apresentam um enorme potencial biotecnológico, que vem sendo amplamente explorado.

1.2 O Potencial Biotecnológico das microalgas

O termo “microalgas” é utilizado para designar organismos eucarióticos fotossintéticos, unicelulares e geralmente com dimensões entre 1 e 10 µm. São organismos amplamente distribuídos, podendo se apresentar em formas coloniais ou livres e são encontrados em corpos d’água doce, salgada e salobra. Estima-se que existam cerca de 200-800 mil espécies de microalgas, e que apenas 35 mil foram descritas até agora (Ebenezer et al., 2011).

Estes organismos contribuem com aproximadamente 40% do oxigênio atmosférico e vêm sendo amplamente estudados por apresentarem características únicas (altas taxas de conversão solar através da fotossíntese, grande capacidade de assimilação de CO₂), possíveis soluções ambientais (captura de carbono e biorremediação de efluentes líquidos), além do potencial de servirem como biorrefinarias por apresentarem uma enorme quantidade de produtos exploráveis, tais como matérias-primas para biocombustíveis, químicos renováveis, biomateriais, alimentos, proteínas recombinantes, pigmentos, entre outros (Gouveia, 2011).

Além disso, possuem uma produtividade muito alta. Estima-se que para atender ao consumo de petróleo atual dos Estados Unidos utilizando-se apenas o biodiesel produzido a partir de soja, seria necessária uma área cultivável com cerca 3,3 vezes todo o território deste país, enquanto que

apenas 4% do território seria necessário para alcançar o mesmo resultado a partir de microalgas (Georgianna & Mayfield, 2012).

Estima-se que aproximadamente 90% da energia consumida pelo mundo é gerada por meio de carvão, gás natural e petróleo, sendo menos de 10% proveniente de fontes energéticas renováveis. Além disso, baseado nos hábitos de consumo atuais, é possível que ocorra o esgotamento das reservas de petróleo após 2050 (Yen et al., 2013).

Biocombustíveis derivados de grãos e plantas oleaginosas, como bioetanol e biodiesel, constituem uma alternativa renovável e economicamente competitiva aos combustíveis fósseis. No entanto, estas fontes não são capazes de atender à demanda crescente por energia em todo o mundo, pois a área e insumos requeridos para os cultivos tradicionais competiriam com a agricultura para produção de alimentos (Waltz, 2009; Georgianna & Mayfield 2012). Além disso, a produção de etanol celulósico, eventualmente, também competiria pelo uso da terra, além de incorrer em consideráveis custos requeridos para coleta, transporte e processamento da biomassa (Stephenson et al., 2011).

Nos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrando o potencial e as perspectivas na produção de biocombustíveis através das microalgas, colocando-as como um dos principais campos de pesquisas ao redor do mundo que podem trazer enormes benefícios para o ser humano e o meio ambiente (Lam & Lee, 2012).

As microalgas oferecem diversas vantagens para a produção de biocombustíveis, como a alta capacidade de produção de biomassa e armazenamento de substâncias de reserva como lipídios e amido, além de não

competirem com alimentos por terra e recursos hídricos já que podem ser cultivadas em terras não agricultáveis utilizando águas residuais ou salobras/salinas (Abdelaziz et al., 2014). Estima-se que um valor realístico de produção de biomassa por microalgas se encontra entre 15 e 25 ton/ha/ano. Assumindo um acúmulo celular de 30% de lipídios, a produção seria equivalente a 4,5-7,5 ton/ha/ano (Tsukahara & Sawayama, 2005). Este valor é maior do que a produção de óleo utilizando soja (0,4 ton/ha/ano), dendê (3.62 ton/ha/ano) e pinhão-manso (4.14 ton/ha/ano) (Lam & Lee, 2011).

1.3 As algas verdes (Chlorophyta)

As plantas verdes, ou Viridiplantae, são um grupo monofilético que incluem as algas verdes e plantas terrestres. Estima-se que entre 1 e 1,5 bilhões de anos atrás ocorreu um evento endossimbiótico onde um organismo eucariótico heterotrófico capturou uma cianobactéria, que se tornou um plastídio, originando os primeiros organismos eucariotos fotossintéticos (Yoon et al., 2004). Posteriormente, este grupo divergiu em dois clados, as clorófitas, que compreendem a maioria das espécies de algas verdes descritas, e as estreptófitas, que incluem as plantas terrestres ou embriófitas, estima-se que esta divisão ocorreu a mais de 1 bilhão de anos (Hedges et al., 2004).

Os cloroplastos, presentes nas algas verdes, possuem duas membranas lipoproteicas, sendo a externa lisa e a interna composta por várias dobras formando os tilacoides e as lamelas. Neste sistema de membranas internas, os tilacoides, encontram-se as moléculas de clorofila, que por sua vez estão organizadas em um fotossistema denominado complexo antena, responsável pela captura da luz solar para reação da fotossíntese. Além disso, estes

cloroplastos possuem clorofila *a* e *b*, juntamente com pigmentos acessórios como carotenóides e xantofilas (Leliaert et al., 2012).

Muitas algas verdes foram, e são estudadas por servirem como sistemas modelo ou por apresentarem importância biotecnológica e econômica como produção de biocombustíveis, captura de CO₂, produção de moléculas com alto valor agregado e biorremediação. Culturas de *Chlorella* foram utilizadas para elucidar a fase não luminosa da fotossíntese por Calvin & Benson em 1948, posteriormente denominado Ciclo de Calvin (Leliaert et al., 2012). A microalga unicelular *Dunaliella salina* é uma das mais estudadas por possuir grande importância industrial, produz grandes quantidades de β-caroteno e por seu potencial como matéria-prima para produção de biocombustíveis (Gouveia & Oliveira, 2009). *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga unicelular flagelada, foi utilizada como um sistema modelo para o estudo da fotossíntese em eucariotos, biogênese cloroplastídea, funções do corpo basal e flagelos em eucariotos, além de estudos para biorremediação e produção de biocombustíveis (Merchant et al., 2007). A unicelular *Chlorella variabilis* é utilizada como sistema modelo para estudo de interações entre algas e vírus (Kang et al., 2005; Blanc et al., 2010). As microalgas coloniais do gênero *Volvox* serviram como modelo para a evolução da multicelularidade, diferenciação celular e motilidade das colônias (Kirk, 2003; Herron et al., 2009).

1.4 Prospecção e melhoramento de microalgas no Brasil

O Brasil possui a flora de maior diversidade no mundo. Entre algas e plantas, já foram descritas 37.381 espécies (3.496 algas), sendo 18.409

endêmicas (52 algas) (Forzza et al., 2012). Estes organismos encontram-se amplamente distribuídos em todos os biomas brasileiros.

A prospecção de cepas com características biotecnológicas de interesse, é um pré-requisito para qualquer pesquisa ou programa de melhoramento de microalgas. Para produção de biocombustíveis, por exemplo, é fundamental a cepa de microalga utilizada apresentar características como: altas taxas no crescimento e na produção de óleo ou amido; baixo custo para colheita ou extração do produto de interesse; capacidade de crescer em condições adversas, como alta salinidade e pH alcalino ou ácido (Brasil & Brunale, 2014).

Em microalgas, o melhoramento clássico é dificultado pela ausência de um ciclo sexuado em muitas espécies, desta forma o melhoramento genético, por meio de mutagênese ou tecnologias de DNA recombinante, surge como uma estratégia promissora. Até o momento, poucas espécies microalgais com potencial para produção de biocombustíveis encontram-se bem caracterizadas geneticamente e com protocolos de transformação estabelecidos (Brasil & Brunale, 2014). Porém o sequenciamento do genoma completo de microalgas (Merchant et al., 2007; Blanc et al., 2010; Radakovits et al., 2011; Blanc et al., 2012; Gao et al., 2014) vêm gerando informações importantes para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para manipulação gênica, auxiliando no desenvolvimento de estratégias para produção comercialmente competitiva de biocombustíveis e outros bioprodutos.

Existem atualmente no Brasil, mais de quarenta laboratórios e instituições que mantêm culturas de algas (macroalgas, microalgas e cianobactérias). Porém somente cinco dessas coleções possuem mais de 150 cepas. Neste aspecto, em 2012, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

iniciou a criação de uma coleção de recursos genéticos de microrganismos fotossintéticos coletados de diferentes partes do país (Brasil et al., 2014). Esta coleção está sendo mantida na Embrapa Agroenergia (Brasília – Brasil) e contém culturas unialgais coletadas de diversos biomas brasileiros, como o Cerrado, Pantanal, Amazônia e Mata Atlântica. Estas cepas microalgais são derivadas de corpos d'água naturais bem como de efluentes líquidos, como esgoto rural e águas residuais da agroindústria (Brasil et al., 2014; Brunale et al., 2014; Santana et al., 2014). Além disso, a Embrapa vem desenvolvendo programas para produção de biocombustíveis e bioprodutos por meio da caracterização de recursos genéticos de microalgas continentais e o estabelecimento de um programa de melhoramento de longo prazo (Brasil et al., 2014).

1.5 Identificação molecular de microalgas

Espécies microalgais são tradicionalmente discriminadas através de observações na morfologia e pigmentos. Porém, muitas microalgas possuem poucas características morfológicas úteis para identificação taxonômica, desta forma a identificação molecular se torna uma poderosa ferramenta para a discriminação de espécies microalgais (Ebenezer et al., 2011).

De acordo com Hebert et al. (2003) existem limitações significativas na identificação morfológica de espécies, como: (a) plasticidade fenotípica, capacidade de um organismo alterar sua morfologia de acordo com o ambiente; (b) variabilidade genética; (c) espécies crípticas, isto é, espécies diferentes mas morfológicamente idênticas; e (d) características morfológicas

aparentes somente em determinados estágios de vida de um organismo; Estes fatores podem levar a identificações taxonômicas errôneas.

Como solução para este desafio, Hebert e colaboradores (2003) propuseram a identificação através do *barcode* de DNA, isto é, pequenas sequências de DNA conhecidas e padronizadas que serviriam como marcadores moleculares, capazes de identificar e discriminar espécies. Com o rápido progresso desta técnica, foi criado um consórcio mundial denominado *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL – <http://www.barcoding.si.edu/>), uma iniciativa dedicada ao desenvolvimento de *barcodes* genéticos como um padrão global para identificação de todas as espécies biológicas.

Um *barcode* de DNA ideal deve ser um gene ou região suficientemente conservada para ser amplificada em diferentes grupos taxonômicos por meio de um único par de iniciadores (*primers*), mas ao mesmo tempo apresentar diversidade suficiente para discriminar espécies intimamente relacionadas (Hollingsworth et al., 2009). Esta região genômica deve apresentar uma taxa de mutação similar a taxa de especiação do grupo taxonômico (relógio molecular), além de um banco de dados com sequências de espécies que possam servir como referência para a identificação.

O gene mitocondrial Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI) é um marcador molecular altamente eficiente na identificação de diversos grupos de animais. As plantas, porém, possuem uma baixa taxa de mutação do DNA mitocondrial, o que torna este marcador inadequado, isto é, com uma baixa resolução, para estes organismos. Desta forma, o CBOL propôs a utilização de dois genes cloroplastídeos para identificação de espécies vegetais, o *rbcl* (*RuBisCO Large Subunit*) e o *matK* (*Maturase K*) (Hollingsworth et al., 2009).

Ainda assim, diversos grupos de pesquisadores acreditam que outras regiões, como a região nuclear ITS2, ou outras combinações podem apresentar melhor eficiência como barcode vegetal (Chiou et al., 2007; Chen et al., 2010; Hollingsworth et al., 2011).

Nas algas verdes, a ineficiência do gene COI e a ausência do gene *matK* (exceto na divisão *Charophyta*), faz com que diversas regiões genômicas venham sendo alvo de estudos para aplicação da técnica de *barcode* de DNA (Saunders & Kucera, 2010; Kazi et al., 2013; Hall et al., 2010).

A *Internal Transcribed Spacer 2* é uma região espaçadora do DNA ribossômico nuclear (nu ITS2 rRNA) que está localizada entre os genes 5.8S e 28S. Esta região apresenta uma maior variação na sequência de DNA, ou seja, uma taxa de evolução mais rápida, do que as regiões codificadoras gênicas. Por estas características vem sendo amplamente utilizada para identificação de fungos (Schoch et al., 2012; Blaaid et al., 2013) e plantas (Chen et al., 2010; Merget & Wolf, 2010), principalmente para análises de grupos taxonômicos próximos (“*low level*”). Em 2006, Schultz e colaboradores apresentaram o ITS2Database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>), um sistema para análises filogenéticas que leva em conta além da sequência de nucleotídeos, a altamente conservada estrutura secundária da região ITS2. Este sistema permite utilizar a região ITS2 também para análises mais abrangentes, ou seja, com organismos de grupos taxonômicos distantes (“*high level*”). Esta estrutura secundária é formada por 4 hélices, sendo a terceira a mais longa (Figura 1) (Coleman, 2003).

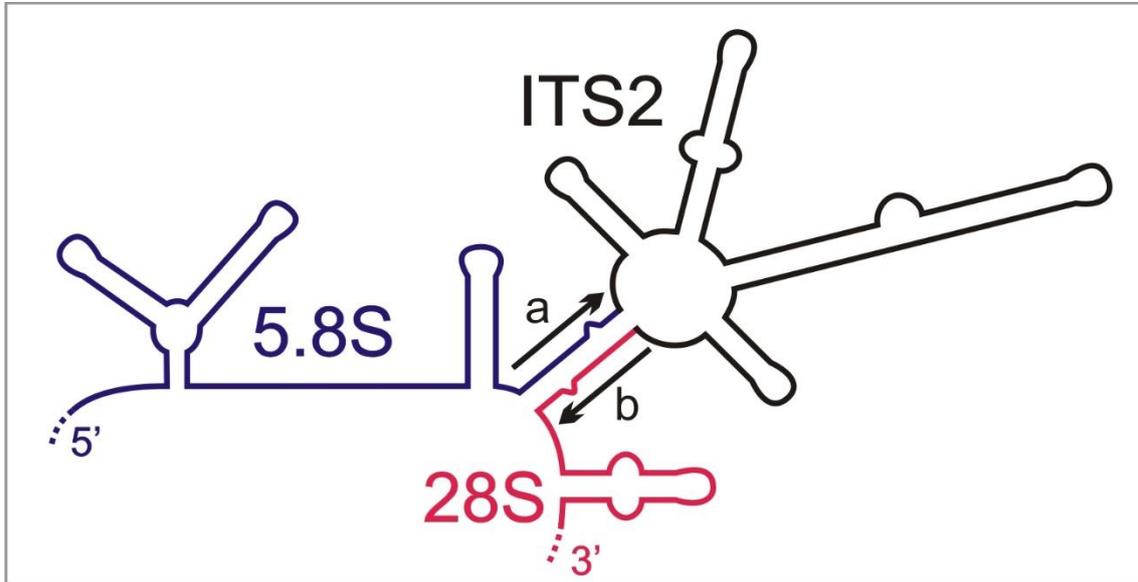


Figura 1. Estrutura secundária da região nuclear ITS2 (nu ITS2 rRNA), ancorada pelo final do rRNA 5.8S (seta a) e pelo início do rRNA 28S (seta b).

Fonte: ITS2Database. Disponível em: <http://its2-old.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/cgi-bin/index.pl?annotator> Acesso em fev. 2015.

O *rbcL* é um gene cloroplastídeo que codifica para a enzima RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase), responsável pela conversão de CO₂ atmosférico e água em carboidratos, sendo assim essencial para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Apesar de ser uma região codificadora para proteína, possui uma variabilidade maior que a região ITS2 do DNA ribossômico nuclear. Isto ocorre devido a maquinaria de replicação e reparo do DNA em organelas possuir menor eficiência do que o sistema nuclear. Esta variabilidade apresenta-se por meio de mutações do tipo substituição de bases, com maior frequência no terceiro nucleotídeo dos códons, o que geralmente não causa alteração no aminoácido traduzido. Mutações do tipo inserção e deleção são raramente observadas neste gene, e quando presentes são em trincas de bases, pois desta forma não causam uma alteração na matriz de leitura dos códons. Este foi um dos genes recomendados pelo CBOL para ser utilizado como *barcode* de DNA para plantas, e tem sido amplamente empregado na identificação de algas verdes.

1.6 Criopreservação de microalgas

A manutenção de cepas microalgais é tradicionalmente feita por meio de subcultivos (repiques) a cada 4-6 semanas. Neste método é feita a coleta de uma alíquota a partir de uma cultura prévia é transferida a um novo meio de cultivo. Este é um método eficiente para manutenção de cepas microalgais a curto prazo, porém apresenta desvantagens como susceptibilidade a contaminações, a perda de característica morfológicas originais e a deriva genética, além de ser laborioso. Desta forma, técnicas para manutenção das

cepas metabolicamente inativas são desejáveis e fundamentais para estudos de longo prazo, como é o caso de coleções de recursos genéticos e programas de melhoramento.

A liofilização e a criopreservação são métodos que mantêm as células em um estado metabólico inativo, preservando desta forma as características morfológicas e genéticas das cepas, além de evitar contaminações (Gwo et al., 2005). Trabalhos demonstram que a liofilização não apresenta bons resultados para macroalgas e microalgas, e a criopreservação é apontada como o melhor método para manutenção a longo prazo destes organismos (Taylor & Fletcher, 1999; Day et al., 2000).

Na criopreservação, geralmente um agente crioprotetor é adicionado como forma de minimizar danos durante o congelamento e descongelamento, como a formação de gelo intracelular, estresse osmótico e surgimento de radicais livres (Andersen, 2005). Devido a grande heterogeneidade entre espécies, o progresso na criopreservação de microalgas é gradual e muitas cepas requerem protocolos específicos. Em muitos casos, o sucesso do método depende de variáveis como taxa de resfriamento, características do organismo e do agente crioprotetor, e do processo de nucleação do gelo (Abreu et al., 2012).

Neste trabalho foram testados dois agentes crioprotetores intracelulares, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), ambos capazes de penetrar nas células, prevenindo a perda de água e desidratação excessiva para o meio hipertônico. Este trabalho também avaliou e comparou a eficiência das regiões ITS2 e *rbcl* para a identificação molecular de espécies microalgais coletadas de diversos biomas brasileiros. Os processos de identificação e preservação de recursos

genéticos microalgais desenvolvidos constituem importantes pré-requisitos para a estruturação de futuros programas de melhoramento genético na Embrapa.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificação molecular e criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) isoladas de águas continentais brasileiras depositadas na Coleção de Microrganismos Aplicados à Agroenergia da Embrapa.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial do gene cloroplastídeo *rbcL* como marcador molecular universal para a identificação de espécies de microalgas verdes isoladas de águas continentais brasileiras.
- Avaliar o potencial do gene nuclear ITS2 como marcador molecular universal para a identificação de espécies de microalgas verdes isoladas de águas continentais brasileiras.
- Comparar a eficácia dos bancos de dados GenBank, BOLD e ITS2Database para a identificação de espécies de microalgas verdes isoladas de águas continentais brasileiras.
- Avaliar os compostos químicos, metanol e DMSO, como agentes crioprotetores para microalgas verdes isoladas de águas continentais brasileiras.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas e condições de cultivo

As amostras microalgais foram coletadas em diversos ambientes aquáticos brasileiros. Os locais de coleta foram georreferenciados e estão situados em áreas do Cerrado (Brasília/DF), Amazônia (Belém/PA) e Pantanal (Corumbá/MS), bem como em áreas de descarte de efluentes agroindustriais (Vinhaça) (Goianésia/GO) e esgoto rural (efluente de biodigestor de granjas de suínos) (Concórdia/SC). A partir destas amostras, foram isoladas 51 cepas que estão sendo mantidas em meios de cultivo sintéticos, BBM (Bold's Basal Medium) ou BG-11 (Blue Green Medium) (Nichols, 1973) com pH ajustado para 7.1 utilizando NaOH 1M e HCl 1M, na Coleção de Microrganismos Aplicados à Agroenergia da Embrapa. As cepas foram nomeadas LBA#1 a LBA#51, e incubadas em câmara de crescimento a 28 °C e fotoperíodo 12:12h. Em anexo a este trabalho, foi adicionado um catálogo desta coleção, contendo imagens e as informações obtidas sobre cada cepa.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do kit Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, porém apresentou um baixo rendimento de DNA, o que prejudicou a amplificação por PCR de algumas amostras.

Desta forma, aproximadamente 30 mg de biomassa algal fresca foram submetidas à extração de DNA utilizando uma solução de extração contendo o detergente brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-Cl 100 mM, PVP 1%, 2-β-mercaptoetanol 0,4%), adaptado de Bonato et al. (2002).

3.3 Amplificação por PCR da região ITS2 e do gene *rbcl*

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação da região ITS2 foi realizada utilizando um par de *primers* (IDT) (Fw_ITS2/Rv_ITS2), em volume final de 25 μ L, contendo: 5 μ L Tampão 5X da Taq DNA polimerase (Promega); 1,5 μ L MgCl₂ 25 mM (Promega); 0,8 μ L BSA 10 mg/mL (Promega); 0,5 μ L dNTPs 10 mM (Promega); 0,2 μ L *Primer forward* 10 μ M (IDT); 0,2 μ L *Primer reverse* 10 μ M (IDT); 0,25 μ L Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Promega); 2 μ L de gDNA 5-50 ng/ μ L; e água milli-Q estéril para completar o volume. A Figura 2 apresenta as localizações aproximadas dos sítios de anelamento dos *primers*.

Utilizou-se um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado para uma desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos; seguida por 40 ciclos de 96°C por 60 segundos (desnaturação); 52°C por 60 segundos (anelamento dos *primers*); 72°C por 60 segundos (extensão das fitas); para finalizar uma extensão de 72°C por 5 minutos e então reduzido a 4°C.

Para reação de amplificação do gene *rbcl* foram utilizados 2 pares de *primers* (Fw_*rbcl*_192/Rv_*rbcl*_657; Fw_*rbcl*_375/Rv_*rbcl*_1089) com as mesmas quantidades de reagentes utilizadas para amplificação da região ITS2. A Figura 3 exibe os sítios de anelamento no gene *rbcl* de todos os *primers* utilizados neste estudo, enquanto a Tabela 1 apresenta as sequências de nucleotídeos e características de todos os pares de *primers* testados.

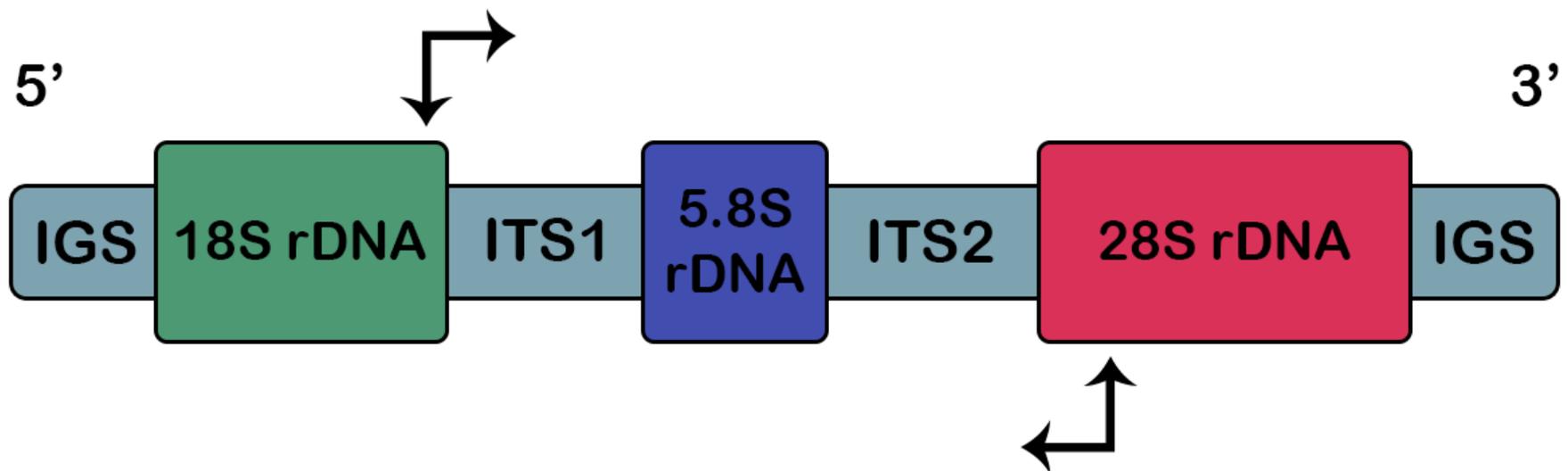


Figura 2. Demonstração da disposição do DNA ribossômico eucariótico, com as regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2), as regiões intergênicas (IGS) e a localização aproximada dos sítios de anelamento dos primers utilizados neste estudo (indicados pelas setas).

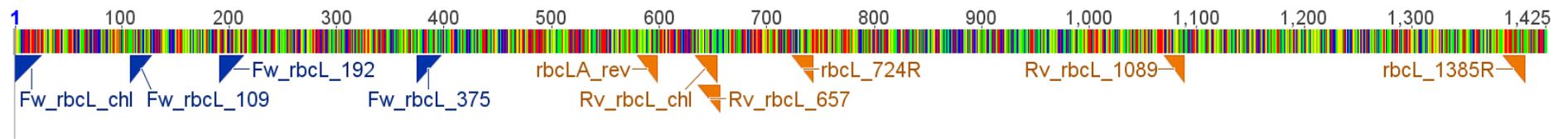


Figura 3. Sítios de anelamento no gene *rbcL* de todos os primers utilizados neste estudo. As setas de cor azul indicam os *primers forward*, e as de cor laranja os *primers reverse*.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e características de todos os primers utilizados neste estudo.

Marçador molecular	Par de primers	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Referência
ITS2	Fw ITS2/Rv ITS2	Fw ITS2: 5' – AGG AGA AGT CGT AAC AAG GT – 3' Rv ITS2: 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'	≈ 800 pb	52 °C	Hall et al. (2010) White et al. (1990)
<i>rbcL</i>	Fw_rbcL_192/Rv_rbcL_657	Fw_rbcL_192: 5' – GGT ACT TGG ACA ACW GTW TGG AC – 3' Rv_rbcL_657: 5' – GAA ACG GTC TCK CCA RCG CAT – 3'	465 pb	52 °C	Este estudo
	Fw_rbcL_375/Rv_rbcL_1089	Fw_rbcL_375: 5' – TTT GGT TTC AAA GCI YTW CGT GC – 3' Rv_rbcL_1089: 5' – ATA CCA CGR CTA CGR TCT TT – 3'	714 pb	52 °C	Este estudo
Outros primers testados para <i>rbcL</i>	Fw_rbcL_192/Rv_rbcL_1089	Fw_rbcL_192: 5' – GGT ACT TGG ACA ACW GTW TGG AC – 3' Rv_rbcL_1089: 5' – ATA CCA CGR CTA CGR TCT TT – 3'	897 pb	52 °C	Este estudo
	Fw_rbcL_chl/Rv_rbcL_chl	Fw_rbcL_chl: 5' – ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC – 3' Rv_rbcL_chl: 5' – GAA ACG GTC TCT CCA ACG CAT – 3'	654 pb	54 °C	Manhart (1994) Fazekas et al. (2008)
	Fw_rbcL_109/Rv_rbcL_657	Fw_rbcL_109: 5' – TTC TTG CTG CIT TYC GTA TG – 3' Rv_rbcL_657: 5' – GAA ACG GTC TCK CCA RCG CAT – 3'	548 pb	52 °C	Este estudo
	Fw_rbcL_109/Rv_rbcL_1089	Fw_rbcL_109: 5' – TTC TTG CTG CIT TYC GTA TG – 3' Rv_rbcL_1089: 5' – ATA CCA CGR CTA CGR TCT TT – 3'	980 pb	52 °C	Este estudo
	Fw_rbcL_chl/rbcLA_rev	Fw_rbcL_chl: 5' – ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC – 3' rbcLA_rev: 5' – GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG – 3'	599 pb	50 °C	Manhart (1994) Kress et al. (2009)
	Fw_rbcL_chl/rbcL_724R	Fw_rbcL_chl: 5' – ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC – 3' rbcL_724R: 5' – TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC – 3'	743 pb	54 °C	Manhart (1994) Fay et al. (1997)
	Fw_rbcL_chl/rbcL_1385R	Fw_rbcL_chl: 5' – ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC – 3' rbcL_1385R: 5' – AAT TCA AAT TTA ATT TCT TTC C – 3'	1406 pb	42 °C	Manhart (1994)

3.4 Quantificação do DNA e eletroforese

Para a quantificação do DNA utilizou-se um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 de acordo com instruções do fabricante.

Para confirmar o sucesso da amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% em tampão SB (Brody & Kern, 2004) 1X. Para análise do tamanho dos fragmentos foi utilizado o GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). A corrida foi realizada a 100 V, durante 1 hora e 15 minutos. Após isso, o gel foi retirado da cuba e cuidadosamente levado ao fotodocumentador.

3.5 Sequenciamento e análise dos dados

Os produtos de PCR foram sequenciados bidirecionalmente por eletroforese capilar (Método de Sanger) em equipamento ABI3130 (Life Technologies), utilizando kit BigDye v3.1 (Life Technologies). Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1,0 µL do produto de PCR, 0,5 µL do reagente Big Dye V 3.1 (Life Technologies) e 1,75 µL de tampão 1.1 V 3.1 (Life Technologies). O volume final de 10 µL foi obtido com o acréscimo de água milli-Q. A reação de sequenciamento consistiu de 1 ciclo inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 96°C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

A precipitação dos produtos de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços. Para cada poço, foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM, pH 8,0 e 30 µL de etanol 100% (Merck). A placa foi então incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 2.200 RCF por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (Merck) e

centrifugado a 1.850 RCF por 15 minutos. A placa foi então seca para eliminar resquícios de etanol e cada poço recebeu 15 µL de formamida Hidi para sequenciamento.

Para análise dos dados, foi utilizado o programa Geneious 6.1.8 (Biomatters). Através deste, foi montada a sequência consenso de cada amostra através da leitura *forward* e *reverse*. Quando possível, pequenos erros do sequenciamento foram manualmente corrigidos através da análise e comparação das fitas. Por fim, as bases iniciais e terminais do fragmento sequenciado de cada amostra foram excluídas, e a sequência final, contendo bases de alta qualidade (*Quality value* ≥ 20), foi utilizada para identificação em comparação aos bancos de dados.

Para construção das árvores filogenéticas, foi utilizado o programa MEGA 5.2. Foi realizado um alinhamento pelo ClustalW, em seguida a árvore foi construída utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ), com um *Bootstrap* de 1000 réplicas e o modelo Kimura-2-parâmetros.

3.6 Identificação molecular

Para a identificação molecular de espécies pelo marcador ITS2, as sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas em dois bancos de dados, o GenBank (Benson et al., 2013) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e o ITS2Database (Koetschan et al., 2010) (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) que faz a comparação através da estrutura secundária desta região. Utilizando este sistema, foi realizada a anotação da região ITS2, as sequências anotadas foram submetidas à ferramenta ITS2 BLAST e o resultado de maior pontuação para

cada cepa foi utilizado como modelo para predição da estrutura secundária da mesma. As sequências junto com suas respectivas estruturas secundárias foram alinhadas utilizando o programa 4SALE 1.7 (Seibel et al., 2006) e uma árvore filogenética foi construída com o programa ProfDistS (Wolf et al., 2008) utilizando o método *Profile Neighbor-Joining* (PNJ), e um teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas seguindo o modelo Jukes Cantor.

Para a identificação através do marcador *rbcL*, foram utilizados os bancos de dados GenBank e o BOLD (*Barcode of Life Data Systems*) (<http://www.boldsystems.com>) (Hebert & Ratnasingham, 2007).

3.7 Criopreservação

Primeiramente, para realizar o teste de criopreservação de microalgas, 44 amostras (LBA#1 a LBA#44) foram repicadas coletando-se 1 mL de um cultivo prévio e adicionado a 9 mL de meio específico em um tubo de ensaio esterilizado. Para o crescimento, os tubos foram mantidos em câmara de crescimento a 28 °C com fotoperíodo 12:12h. Após 10 dias de cultivo as amostras de microalgas foram criopreservadas.

No momento da criopreservação, foi realizada a titulação de subamostras de cada cepa de microalga utilizando placas de 96 poços. Para isto, 180 µL de meio de cultivo BBM ou BG-11 foram adicionados a todos os poços da placa, exceto a primeira coluna de poços. Em seguida, 200 µL de meio com biomassa algal foi pipetada ao primeiro poço, sendo cada amostra em uma linha. Logo após, foram pipetados 20 µL do primeiro ao segundo poço, e assim sucessivamente até o décimo segundo poço. Desta maneira, cada amostra ficou disposta em uma linha desde “sem diluição” até a diluição de 10^{-11} . Estas

placas foram armazenadas em câmara de crescimento a 28 °C com fotoperíodo 12:12h, e após 15 dias realizada anotação da diluição máxima onde cada amostra obteve crescimento visível a olho nu.

Paralelamente, dois compostos químicos foram testados como agentes crioprotetores, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), ambos em concentração final de 10%. Cada amostra foi feita em triplicata, ou seja, para cada amostra foram feitos três criotubos contendo o meio com biomassa algal e metanol, e outros três com biomassa algal e DMSO, aplicando a seguinte metodologia:

1. Em um fluxo laminar, foram adicionados 900 µL de meio com biomassa algal em um criotubo esterilizado de 2 mL.
2. Em seguida, em uma capela de exaustão, foram adicionados 100 µL dos agentes crioprotetores, metanol e DMSO 100%, a cada criotubo.
3. Os criotubos foram cuidadosamente fechados, invertidos algumas vezes e armazenados a -20 °C por 2 horas.
4. Em seguida, foram armazenados em ultrafreezer -80 °C.

Após 47 dias armazenadas, as amostras foram retiradas do ultrafreezer e descongeladas com o auxílio de um banho-maria a 35 °C. Em seguida, o meio foi pipetado para microtubos esterilizados de 1,5 mL e centrifugados a 16.000 RCF durante 10 minutos. O sobrenadante contendo o agente crioprotetor foi cuidadosamente descartado, e em seguida adicionado 1 mL de meio sintético específico (BBM ou BG-11) para cada amostra.

Para realizar o teste de viabilidade, as amostras descongeladas foram tituladas em placas de 96 poços esterilizadas por raios gama. Cada amostra foi adicionada em uma linha da placa, com o primeiro poço recebendo o meio sem diluição e os seguintes diluídos em 1/10, até a diluição de 10^{-11} . As placas de

96 poços foram então incubadas em câmara de crescimento a 28 °C e fotoperíodo 12:12h por 15 dias. Após isso, foi realizada a anotação da diluição máxima onde cada amostra obteve crescimento visível a olho nu.

IV. RESULTADOS

4.1 Identificação por meio do marcador ITS2

A região nuclear ITS2 (nu ITS2 rRNA) é uma região não codificadora, presente entre os genes 5.8S e 28S do DNA ribossômico. Possui maior variabilidade do que as regiões gênicas, bem como uma estrutura secundária altamente conservada. Estas características a tornam uma região bastante empregada na identificação de fungos e plantas e em estudos com organismos de grupos taxonômicos distantes.

Para identificação da coleção de cepas microalgais deste estudo, a região ITS2 foi amplificada utilizando um par de *primers* (Fw_ITS2/Rv_ITS2). Os fragmentos de DNA foram sequenciados bidirecionalmente por eletroforese capilar, e as sequências obtidas foram comparadas aos bancos de dados GenBank e ITS2Database.

Das 51 cepas analisadas, 47 (92,16%) foram amplificadas e sequenciadas com sucesso utilizando um único par de *primers* para a região nuclear ITS2. As quatro amostras restantes foram amplificadas com sucesso, porém obtiveram um sequenciamento de baixa qualidade e, portanto, não foram incluídas nas análises posteriores. Os percentuais de cepas que foram amplificadas e sequenciadas com sucesso por todos os pares de *primers* testados neste estudo, para a região ITS2 e para o gene *rbcL*, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Percentual de sucesso de amplificação e sequenciamento de todos os pares de primers testados.

Par de primers	Percentual de sucesso de amplificação e sequenciamento (n=51)	Referência da sequência de nucleotídeos
Fw ITS2/Rv ITS2	92,16%	Hall et al. (2010) White et al. (1990)
Fw_rbcL_192/Rv_rbcL_657	82,35%	Este estudo
Fw_rbcL_375/Rv_rbcL_1089	50,98%	Este estudo
Fw_rbcL_192/Rv_rbcL_1089	37,25%	Este estudo
Fw_rbcL_chl/Rv_rbcL_chl	15,69%	Manhart (1994) Fazekas et al. (2008)
Fw_rbcL_109/Rv_rbcL_657	13,75%	Este estudo
Fw_rbcL_chl/rbcLA_rev	7,84%	Manhart (1994) Kress et al. (2009)
Fw_rbcL_109/Rv_rbcL_1089	1,96%	Este estudo
Fw_rbcL_chl/rbcL_724R	1,96%	Manhart (1994) Fay et al. (1997)
Fw_rbcL_chl/rbcL_1385R	0%	Manhart (1994)

Os fragmentos de DNA amplificados variaram de 161 a 263 pares de bases, essa variação ocorre devido a esta região não ser codificadora de proteína, estando sujeita a mutações do tipo inserções e deleções. A porcentagem média de bases com *Quality Value* ≥ 20 foi de 97,55%. Um valor de qualidade igual a 20 representa a possibilidade de 1 erro a cada 100 bases.

As sequências da região ITS2 obtidas para as 47 cepas foram analisadas utilizando os softwares Geneious v. 6.1.8 (Biomatters) e MEGA v. 5.2 (Tamura et al., 2011). Foram detectados 23 genótipos diferentes e uma diversidade média de 0.482 ou 4,82% (Tabela 3). Este cálculo de distância foi realizado utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P).

Tabela 3. Resultados obtidos com as sequências da região nuclear ITS2, amplificada em 47 cepas, e do gene cloroplastídeo *rbcl*, amplificado em 49 cepas.

Marcador molecular	Diversidade média	Nº de genótipos	Índice de similaridade (GenBank)	Índice de similaridade (BOLD)	Média/mediana de similaridade (GenBank)	Média/mediana de similaridade (BOLD)	Universalidade (n=51)
ITS2	0.482	23	81-100%	-	93,87%/93%	-	92,16% com 1 par de <i>primers</i>
<i>rbcl</i>	0.461	26	90-100%	89,76-99,08 %	94,06%/93 %	93,71%/93,09 %	96,08% com 2 pares de <i>primers</i>

Cada sequência foi comparada com o banco de dados GenBank por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e o acesso de maior pontuação, para cada sequência, foi anotado (Tabela 4). A similaridade variou de 81 a 100%, sendo a média igual a 93,87% e mediana de 93%. Das 47 cepas analisadas, 17 apresentaram alta similaridade ($\geq 98\%$). Os gêneros mais frequentes foram *Chlorococcum* (13 cepas), *Desmodesmus* (12 cepas), *Chlorella* (11 cepas) e *Chlamydomonas* (5 cepas). Juntos estes gêneros representam 87,23% das cepas analisadas (Tabela 4). Com auxílio do programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) foi construída uma árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining*, e um teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas seguindo o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Figura 4).

Tabela 4. Identificação das 47 cepas amplificadas com o par de primers para a região ITS2 (Fw ITS2/Rv ITS2), em comparação ao banco de dados GenBank. E em comparação ao banco de dados ITS2Database com as 43 cepas que tiveram a região ITS2 anotada por este sistema.

Cepa	Local/Bioma Coleta	ITS2 (GenBank)			ITS2 (ITS2 Database)		
		Acesso GenBank	Espécie	Similaridade	Acesso GenBank	Espécie	Similaridade
Embrapa LBA#1	Cerrado	AB917134.1	<i>Desmodesmus bicellularis</i> GM4g	91%	DQ417558.1	<i>Desmodesmus bicellularis</i> NDem 9/21 T-17d	88,8%
Embrapa LBA#2	Cerrado	EU502836.1	<i>Desmodesmus</i> sp. MAT-2008c	100%	EU502836.1	<i>Desmodesmus</i> sp. MAT-2008c	98,4%
Embrapa LBA#3	Cerrado	EU502836.1	<i>Desmodesmus</i> sp. MAT-2008c	100%	EU502836.1	<i>Desmodesmus</i> sp. MAT-2008c	98,4%
Embrapa LBA#4*	Cerrado	FR865591.1	<i>Chlorococcum</i> sp. CCAP 11/52	94%	-	-	-
Embrapa LBA#5*	Cerrado	AM228924.1	<i>Desmodesmus regularis</i> ET8b	84%	-	-	-
Embrapa LBA#6	Cerrado	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#7*	Cerrado	AM228924.1	<i>Desmodesmus regularis</i> ET8b	84%	-	-	-
Embrapa LBA#8	Cerrado	FR865573.1	<i>Chlamydomonas sphagnophila</i> CCAP 11/31	85%	AJ749617.1	<i>Chlamydomonas minuta</i> SAG 19.90	73,8%
Embrapa LBA#9	Cerrado	FR865591.1	<i>Chlorococcum</i> sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#10	Cerrado	FR865591.1	<i>Chlorococcum</i> sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#11	Cerrado	FR865591.1	<i>Chlorococcum</i> sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#12	Cerrado	FR865591.1	<i>Chlorococcum</i> sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	71,4%

Embrapa LBA#13	Cerrado	JX513884.1	Scenedesmus rubescens CCALA 475	95%	GQ375096.1	<i>Coelastrum morum</i> SAG217-5	88,3%
Embrapa LBA#14	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#15	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#16	Cerrado	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#17	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#18	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#19	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#20	Cerrado	AY170855.1	Scenedesmus arcuatus var. platydiscus	81%	AY170855.1	<i>Scenedesmus arcuatus</i> var. <i>platydiscus</i>	73,3%
Embrapa LBA#21	Cerrado	JX513884.1	Scenedesmus rubescens CCALA 475	95%	GQ375096.1	<i>Coelastrum morum</i> SAG217-5	88,3%
Embrapa LBA#22	Cerrado	GU192392.1	Desmodesmus ultrasquamatus MLO-4	98%	GU192392.1	<i>Desmodesmus ultrasquamatus</i> strain MLO-4	96,6%
Embrapa LBA#23	Cerrado	GU192392.1	Desmodesmus ultrasquamatus MLO-4	98%	GU192392.1	<i>Desmodesmus ultrasquamatus</i> strain MLO-4	96,6%
Embrapa LBA#24	Cerrado	AM228926.1	Desmodesmus ultrasquamatus ET5a	94%	AM228913.1	<i>Desmodesmus ultrasquamatus</i> Hegewald 1971-12	91,7%
Embrapa LBA#25	Cerrado	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	93%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCr<DEU>:205-05	71,4%

Embrapa LBA#26	Cerrado	<u>EU502836.1</u>	Desmodesmus sp. MAT-2008c	100%	<u>EU502836.1</u>	<i>Desmodesmus sp.</i> MAT-2008c	98,4%
Embrapa LBA#27	Cerrado	<u>KJ676113.1</u>	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1665	100%	<u>FM205834.1</u>	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	99,1%
Embrapa LBA#28	Cerrado	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#29	Esgoto Rural	<u>EU502833.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> MAT-2008a	91%	<u>EU502833.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> MAT-2008a	87,1%
Embrapa LBA#30	Esgoto Rural	<u>EU502836.1</u>	Desmodesmus sp. MAT-2008c	100%	<u>EU502836.1</u>	<i>Desmodesmus sp.</i> MAT-2008c	98,4%
Embrapa LBA#31	Esgoto Rural	<u>EU502833.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> MAT-2008a	91%	<u>EU502833.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> MAT-2008a	87,1%
Embrapa LBA#32	Esgoto Rural	<u>JQ315187.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> GTD8A1	99%	<u>FM205863.1</u>	<i>Micractinium sp.</i> CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#33	Amazônia	<u>JQ315187.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> GTD8A1	99%	<u>FM205863.1</u>	<i>Micractinium sp.</i> CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#34	Amazônia	<u>JQ315187.1</u>	<i>Chlorella sp.</i> GTD8A1	99%	<u>FM205863.1</u>	<i>Micractinium sp.</i> CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#35	Amazônia	<u>AB917128.1</u>	Desmodesmus sp. GM4a	99%	<u>AM410641.1</u>	<i>Desmodesmus sp.</i> ET2	97,6%
Embrapa LBA#36	Tanques de piscicultura	<u>EU502836.1</u>	Desmodesmus sp. MAT-2008c	100%	<u>EU502836.1</u>	<i>Desmodesmus sp.</i> MAT-2008c	98,4%
Embrapa LBA#37	Tanques de piscicultura	<u>FR865616.1</u>	<i>Chlamydomonas applanata</i> CCAP 11/9	92%	-	Nenhum hit	-
Embrapa LBA#38	Áreas de aplicação de vinhaça	<u>FR865591.1</u>	<i>Chlorococcum sp.</i> CCAP 11/52	93%	<u>HQ404882.1</u>	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	71,4%
Embrapa LBA#39	Áreas de aplicação de vinhaça	<u>KJ676113.1</u>	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1665	100%	<u>FM205834.1</u>	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	99,1%
Embrapa LBA#40	Áreas de aplicação de vinhaça	<u>FJ572059.1</u>	<i>Chlamydomonas sp.</i> XJU-36	95%	<u>FJ572059.1</u>	<i>Chlamydomonas sp.</i> XJU-36	77,1%
Embrapa LBA#41*	Áreas de aplicação de vinhaça	<u>FR865573.1</u>	<i>Chlamydomonas sphagnophila</i> CCAP 11/31	85%	-	-	-

Embrapa LBA#42	Amazônia	JQ315187.1	Chlorella sp. GTD8A1	99%	FM205863.1	<i>Micractinium</i> sp. CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#43	Amazônia	JQ315187.1	Chlorella sp. GTD8A1	99%	FM205863.1	<i>Micractinium</i> sp. CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#44	Amazônia	JQ315187.1	Chlorella sp. GTD8A1	99%	FM205863.1	<i>Micractinium</i> sp. CCAP 211/92	98,8%
Embrapa LBA#45	Amazônia	U34776.1	Spongiochloris spongiosa	86%	-	Nenhum hit	-
Embrapa LBA#46	Pantanal	HF920659.1	Uronema trentonense CCAP 386/5	100%	FR717536.1	<i>Uronema</i> sp. CCAP 335/1B	80,6%
Embrapa LBA#47	Pantanal	DQ377118.1	Dunaliella sp. SPMO 300-4	85%	DQ377118.1	<i>Dunaliella</i> sp. SPMO 300-4	64,6%
Embrapa LBA#48	Pantanal	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#49	Pantanal	FR865545.1	Chlamydomonas sp. CCAP 11/150	91%	U66946.1	<i>Chlamydomonas culleus</i>	79,8%
Embrapa LBA#50	Pantanal	LK021940.1	Chlorella sorokiniana UTEX 2714	96%	AB260898.1	<i>Chlorella</i> sp. IFRPD 1018	85,1%
Embrapa LBA#51	Pantanal	FR865591.1	Chlorococcum sp. CCAP 11/52	85%	HQ404882.1	<i>Chlorococcum tatrense</i> CCCryo<DEU>:205-05	75,3%

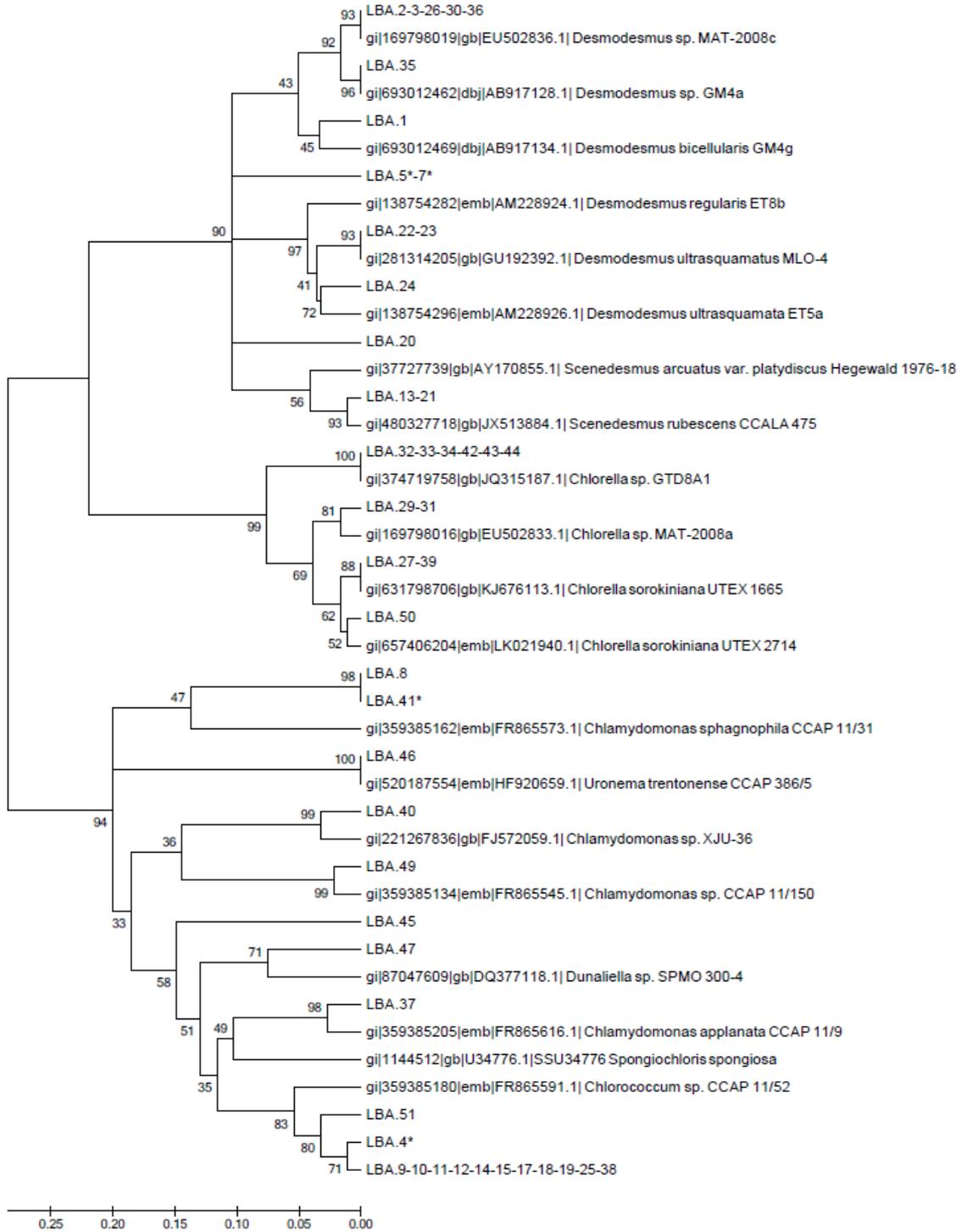


Figura 4. Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador ITS2 obtidas de 47 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados GenBank foram incluídos.

As 47 sequências de ITS2 obtidas também foram analisadas por meio do ITS2Database. Esta ferramenta leva em consideração a similaridade das 4 hélices que formam a estrutura secundária desta região. Este sistema foi capaz de realizar a anotação da região ITS2 de 43 sequências. As sequências anotadas foram submetidas ao ITS2 BLAST e o resultado de maior pontuação para cada cepa foi utilizado como modelo para predição da estrutura secundária da mesma. As cepas LBA#37 e LBA#45 foram anotadas, porém não obtiveram nenhum resultado (*hit*) quando submetidas ao ITS2 BLAST. Ainda assim, a estrutura secundária da LBA#37 pode ser predita sem utilizar uma sequência-estrutura modelo, porém o mesmo não foi possível com a cepa LBA#45.

Desta forma, estas 42 sequências da região ITS2 junto com suas respectivas estruturas secundárias foram alinhadas utilizando o programa 4SALE 1.7 (Seibel et al., 2006) e uma árvore filogenética foi construída com o programa ProfDistS (Wolf et al., 2008) utilizando o método *Profile Neighbor-Joining* (PNJ), e um teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas seguindo o modelo Jukes Cantor (Figura 5).

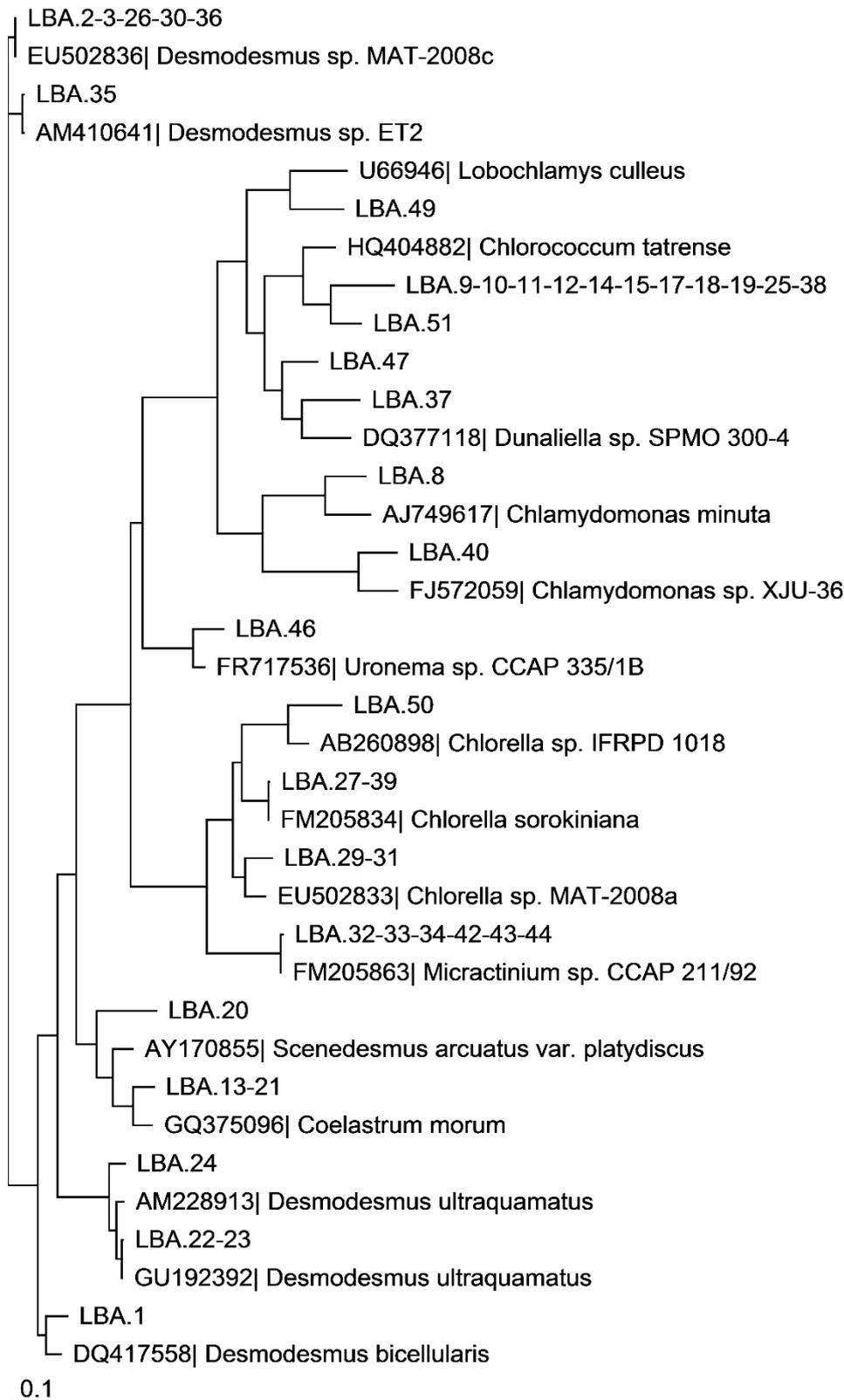


Figura 5. Árvore filogenética construída por meio do método Profile Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo Jukes Cantor, referente a sequência de nucleotídeos e estrutura secundária da região ITS2, das 42 cepas anotadas pelo ITS2Database. Os acessos de maior pontuação utilizados como modelo para predição das estruturas de cada cepa foram incluídos.

4.2 Identificação por meio do marcador *rbcL*

O *rbcL* é um gene cloroplastídeo essencial que codifica para a enzima RuBisCO, sendo assim essencial para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Possui alta variabilidade por meio de mutações do tipo substituição de bases, e vem sendo muito utilizado na taxonomia de algas e plantas. Apesar de ser um gene codificador para proteína, o *rbcL* possui uma variabilidade maior que a região ITS2 do DNA ribossômico nuclear. Isto ocorre devido a maquinaria de replicação e reparo do DNA em organelas possuir menor eficiência do que o sistema nuclear.

Desta forma, o gene *rbcL* foi parcialmente amplificado utilizando dois pares de *primers* (Fw_*rbcL*_192/Rv_*rbcL*_657; Fw_*rbcL*_375/Rv_*rbcL*_1089). Os fragmentos de DNA foram sequenciados bidirecionalmente por eletroforese capilar, e para identificação de espécies as sequências obtidas foram comparadas aos bancos de dados GenBank e BOLD.

O gene *rbcL* foi amplificado parcialmente e sequenciado com sucesso em 49 cepas (96,08%) utilizando 2 pares de *primers* (Tabela 2, pág. 39). As duas amostras restantes foram amplificadas com sucesso, porém obtiveram um sequenciamento de baixa qualidade e, portanto, não foram incluídas nas análises posteriores. Os fragmentos de DNA amplificados variaram de 389 a 566 pares de bases e a porcentagem média de bases com *Quality Value* ≥ 20 foi de 97,65%.

As sequências das 49 cepas foram analisadas, apresentando 26 genótipos diferentes e uma diversidade média de 0.461 ou 4,61% (Tabela 3, pág. 41).

Novamente, as sequências foram comparadas ao banco de dados GenBank através da ferramenta BLAST, e os acessos de maior pontuação foram anotados (Tabela 5). A similaridade variou de 90 a 100%, sendo a média igual a 94,06% e mediana de 93%. Apenas 9 cepas apresentaram similaridade $\geq 98\%$. Os gêneros mais frequentes foram *Chlorella* (11), *Chlorococcum* (9), *Desmodesmus* (8) e *Scenedesmus* (4). Juntos estes gêneros representam 65,31% das cepas analisadas.

As 49 sequências obtidas foram também comparadas ao banco de dados BOLD (*Barcode of Life Data Systems*) (Tabela 5), onde a similaridade variou de 89,76 a 99,08%, a média foi de 93,71% e a mediana de 93,09%. Novamente, 9 cepas apresentaram similaridade $\geq 98\%$. Os gêneros mais frequentes foram *Chlorella* (11), *Chlorococcum* (9), *Desmodesmus* (8) e *Acutodesmus* (5). Juntos estes gêneros representam 67,35% das cepas analisadas.

Utilizando o programa MEGA foram construídas duas árvores filogenéticas baseadas nas sequências *rbcl*, sendo uma com os resultados obtidos na comparação ao banco de dados GenBank (Figura 6), e outra para os resultados com o BOLD (Figura 7). O método empregado foi *Neighbor-Joining*, utilizando teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas e o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P).

Tabela 5. Identificação das 49 cepas amplificadas com os dois pares de primers para o gene *rbcl* (Fw_*rbcl*_192/Rv_*rbcl*_657; Fw_*rbcl*_375/Rv_*rbcl*_1089), em comparação aos bancos de dados GenBank e BOLD.

Cepa	Local/Bioma de Coleta	<i>rbcl</i> (GenBank)			<i>rbcl</i> (BOLD)		
		Acesso GenBank	Espécie	Similaridade	Acesso GenBank	Espécie	Similaridade
Embrapa LBA#1	Cerrado	AB084332.1	<i>Scenedesmus quadricauda</i> NIES-96	90%	AB084332.1	<i>Scenedesmus quadricauda</i> NIES-96	90.42%
Embrapa LBA#2	Cerrado	DQ396875.1	<i>Scenedesmus obliquus</i>	93%	DQ396875.1	<i>Acutodesmus obliquus</i>	92.5%
Embrapa LBA#3	Cerrado	DQ396875.1	<i>Scenedesmus obliquus</i>	91%	DQ396875.1	<i>Acutodesmus obliquus</i>	89.82%
Embrapa LBA#4	Cerrado	EF113431.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> UTEX 972	91%	EF113431.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> UTEX 972	90.85%
Embrapa LBA#5	Cerrado	GU192417.1	<i>Desmodesmus santosii</i> Tow ACOI 522	93%	GU192417.1	<i>Desmodesmus santosii</i> Tow ACOI 522	93.09%
Embrapa LBA#6	Cerrado	EF113431.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> UTEX 972	91%	EF113431.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> UTEX 972	91.09%
Embrapa LBA#7	Cerrado	GU192417.1	<i>Desmodesmus santosii</i> Tow ACOI 522	93%	GU192417.1	<i>Desmodesmus santosii</i> Tow ACOI 522	93.09%
Embrapa LBA#8	Cerrado	EF113424.1	<i>Chlamydomonas oblonga</i> SAG 11-60a	95%	EF113424.1	<i>Chlamydomonas oblonga</i> SAG 11-60a	95.13%
Embrapa LBA#9	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	93%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92.31%
Embrapa LBA#10	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	93%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92.36%
Embrapa LBA#11	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	91.63%
Embrapa LBA#12	Cerrado	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#13	Cerrado	EF012704.1	<i>Neochloris</i> sp. LCR	91%	AB084332.1	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	89.97%

NIES-96

Embrapa LBA#14	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	93%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92.46%
Embrapa LBA#15	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	91.65%
Embrapa LBA#16	Cerrado	KF975594.1	<i>Ecballocystopsis sp.</i> AKS-4	91%	JX018187.1	<i>Ecballocystopsis dichotomus</i>	89.76%
Embrapa LBA#17	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	93%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92.4%
Embrapa LBA#18	Cerrado	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	92%	KC810301.1	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	91.84%
Embrapa LBA#19	Cerrado	KF975594.1	<i>Ecballocystopsis sp.</i> AKS-4	91%	JX018187.1	<i>Ecballocystopsis dichotomus</i>	89.86%
Embrapa LBA#20	Cerrado	JQ394815.1	<i>Hariotina reticulata</i> UTEX LB1365	93%	JQ394815.1	<i>Hariotina reticulata</i> UTEX LB1365	93.06%
Embrapa LBA#21	Cerrado	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	94%	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93.55%
Embrapa LBA#22	Cerrado	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93%	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93.22%
Embrapa LBA#23	Cerrado	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	94%	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93.64%
Embrapa LBA#24	Cerrado	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	94%	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93.78%
Embrapa LBA#25	Cerrado	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	94%	GU192427.1	<i>Desmodesmus costato-</i> <i>granulatus</i> Tow 10/11 T-3w	93.78%
Embrapa LBA#26	Cerrado	KF975603.1	<i>Scenedesmus sp.</i> AKS-19	94%	DQ396875.1	<i>Acutodesmus obliquus</i>	92.45%
Embrapa LBA#27	Cerrado	KJ742376.1	<i>Chlorella sorokiniana</i> 1230	100%	HM101339.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	98.83%
Embrapa LBA#28	Cerrado	JQ315488.1	<i>Selenastrum sp.</i> KMMCC 1456	94%	JQ315488.1	<i>Selenastrum sp.</i> KMMCC 1456	93.68%
Embrapa LBA#29	Esgoto Rural	AB260911.1	<i>Chlorella sp.</i> IFRPD 1018	93%	AB260911.1	<i>Chlorella sp.</i> IFRPD 1018	93.32%

Embrapa LBA#30	Esgoto Rural	KF975603.1	<i>Scenedesmus sp.</i> AKS-19	94%	DQ396875.1	<i>Acutodesmus obliquus</i>	92.53%
Embrapa LBA#31	Esgoto Rural	AB260911.1	<i>Chlorella sp.</i> IFRPD 1018	93%	AB260911.1	<i>Chlorella sp.</i> IFRPD 1018	93.32%
Embrapa LBA#32	Esgoto Rural	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99.08%
Embrapa LBA#33	Amazônia	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99.08%
Embrapa LBA#34	Amazônia	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99.08%
Embrapa LBA#35	Amazônia	KC315289.1	<i>Desmodesmus baconii</i>	93%	KC315289.1	<i>Desmodesmus baconii</i>	92.81%
Embrapa LBA#36	Tanques de piscicultura	KF975603.1	<i>Scenedesmus sp.</i> AKS-19	94%	DQ396875.1	<i>Acutodesmus obliquus</i>	92.63%
Embrapa LBA#37	Tanques de piscicultura	EF113411.1	<i>Ascochloris multinucleata</i> UTEX 2013	94%	EF113411.1	<i>Ascochloris multinucleata</i> UTEX 2013	93.93%
Embrapa LBA#38	Áreas de aplicação de vinhaça	EF113411.1	<i>Ascochloris multinucleata</i> UTEX 2013	94%	EF113411.1	<i>Ascochloris multinucleata</i> UTEX 2013	93.75%
Embrapa LBA#39	Áreas de aplicação de vinhaça	KJ742376.1	<i>Chlorella sorokiniana</i> 1230	100%	HM101339.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	98.83%
Embrapa LBA#40	Áreas de aplicação de vinhaça	AB511849.1	<i>Chlamydomonas orbicularis</i> SAG 11-19	96%	AB511849.1	<i>Chlamydomonas orbicularis</i> SAG 11-19	95.74%
Embrapa LBA#41	Áreas de aplicação de vinhaça	EF113424.1	<i>Chlamydomonas oblonga</i> SAG 11-60a	95%	EF113424.1	<i>Chlamydomonas oblonga</i> SAG 11-60a	95.13%
Embrapa LBA#42	Amazônia	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	98.68%
Embrapa LBA#43	Amazônia	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	98.89%
Embrapa LBA#44	Amazônia	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99%	AB240145.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99.08%
Embrapa LBA#45	Amazônia	EF113465.1	<i>Protosiphon botryoides</i> UTEX 99	93%	EF113465.1	<i>Protosiphon botryoides</i> UTEX 99	92.47%

Embrapa LBA#46	Pantanal	-	-	-	-	-	-
Embrapa LBA#47	Pantanal	AB360758.1	<i>Nautococcus solutus</i> SAG 76.80	91%	AB360758.1	<i>Nautococcus solutus</i> SAG 76.80	90.89%
Embrapa LBA#48	Pantanal	AB603749.1	<i>Gungnir</i> sp. NIES-1851	93%	AB603749.1	<i>Gungnir</i> sp. NIES-1851	92.78%
Embrapa LBA#49	Pantanal	AB175944.1	<i>Asterococcus korschikoffii</i> ACOI 961	90%	AB175944.1	<i>Asterococcus korschikoffii</i> ACOI 961	90.28%
Embrapa LBA#50	Pantanal	AB260910.1	<i>Chlorella</i> sp. IFRPD 1014	99%	AB260910.1	<i>Chlorella</i> sp. IFRPD 1014	98.61%
Embrapa LBA#51	Pantanal	EF113426.1	<i>Chlamydomodium vacuolatum</i> UTEX 2111	95%	EF113426.1	<i>Chlamydomodium vacuolatum</i> UTEX 2111	94.65%

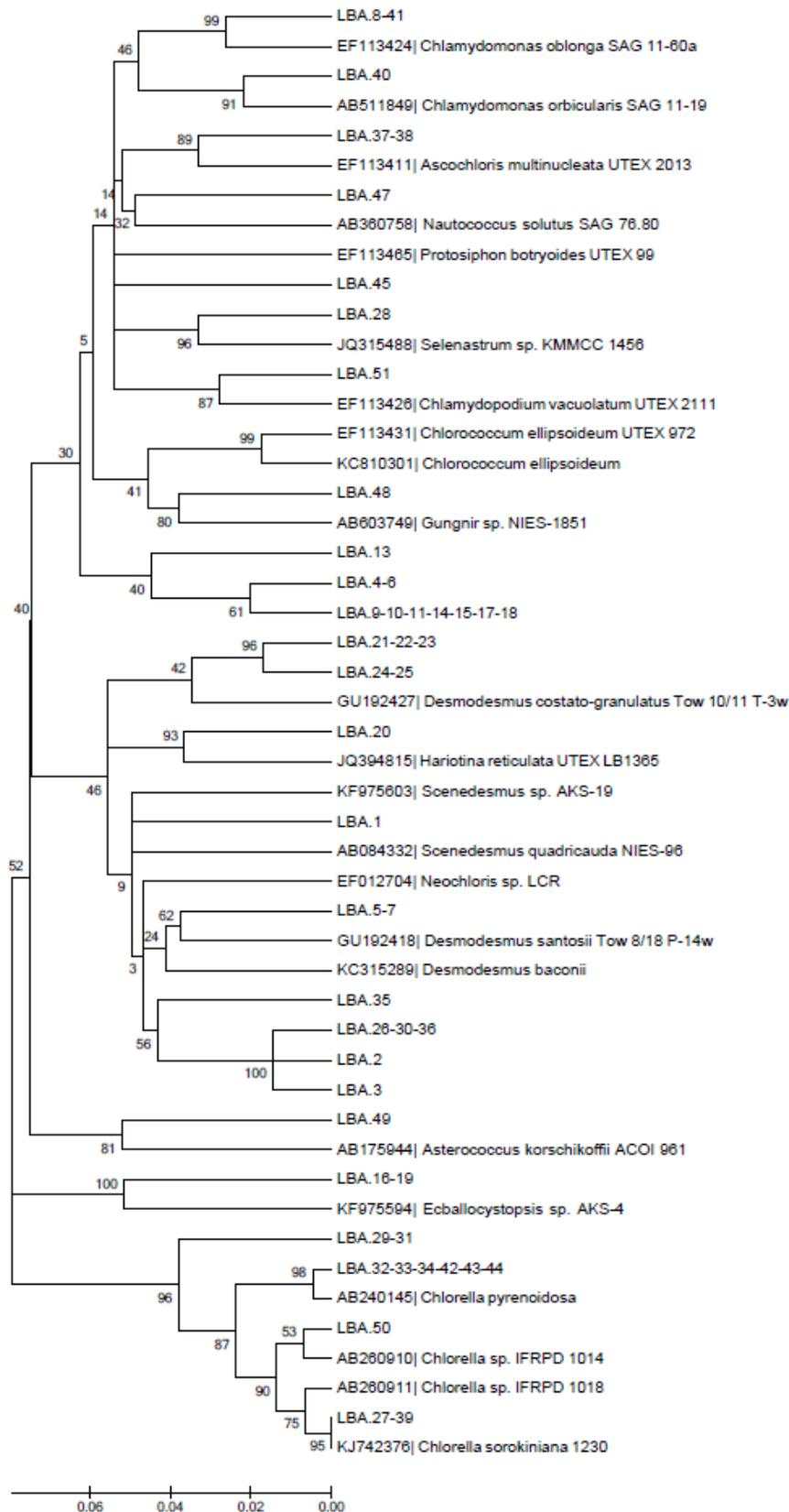


Figura 6. Árvore filogenética construída através do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador *rbcl* obtidas de 49 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados GenBank foram incluídos.

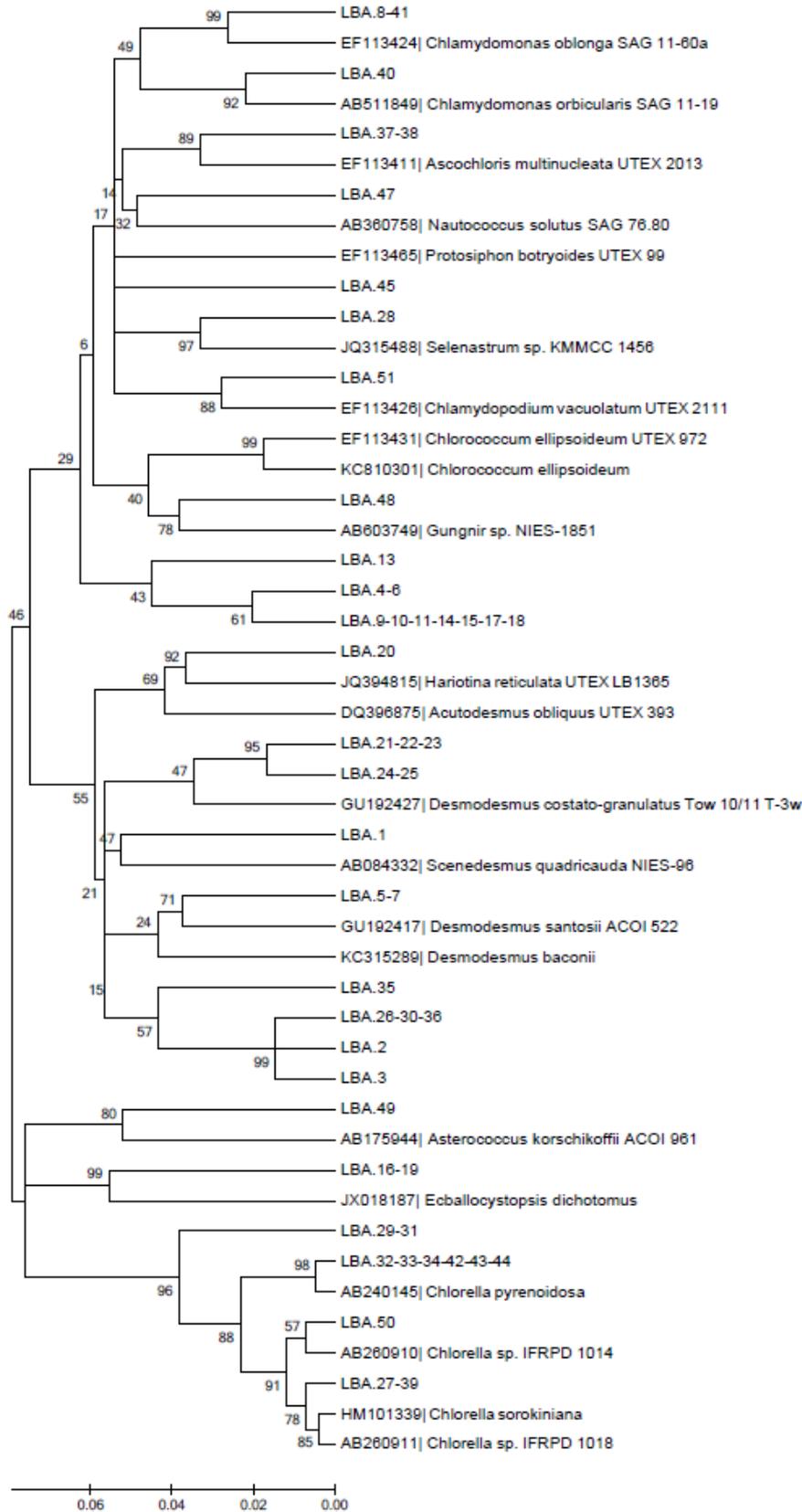


Figura 7. Árvore filogenética construída através do método Neighbor-Joining, utilizando um Bootstrap com 1000 réplicas e o modelo K2P, referente às sequências do marcador *rbcL* obtidas de 49 cepas. Os acessos de maior pontuação encontrados no banco de dados BOLD foram incluídos.

4.3 Criopreservação

Métodos para manutenção das características morfológicas e genéticas de microrganismos são fundamentais para programas de melhoramento e coleções de recursos genéticos. Desta forma, foi realizada a criopreservação das cepas LBA#1 a LBA#44, utilizando a estratégia de resfriamento lento e dois compostos químicos, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10%, como agentes crioprotetores.

A porcentagem de recuperação de células criopreservadas com metanol 10% e DMSO 10% se mostrou bastante variável, provavelmente influenciadas pelas características das diferentes espécies microalgas avaliadas. Porém, os resultados demonstram que a recuperação de células (após 47 dias) com o DMSO foi superior ao metanol em 35 amostras, igual em 8 amostras e inferior em apenas uma (Figura 8).

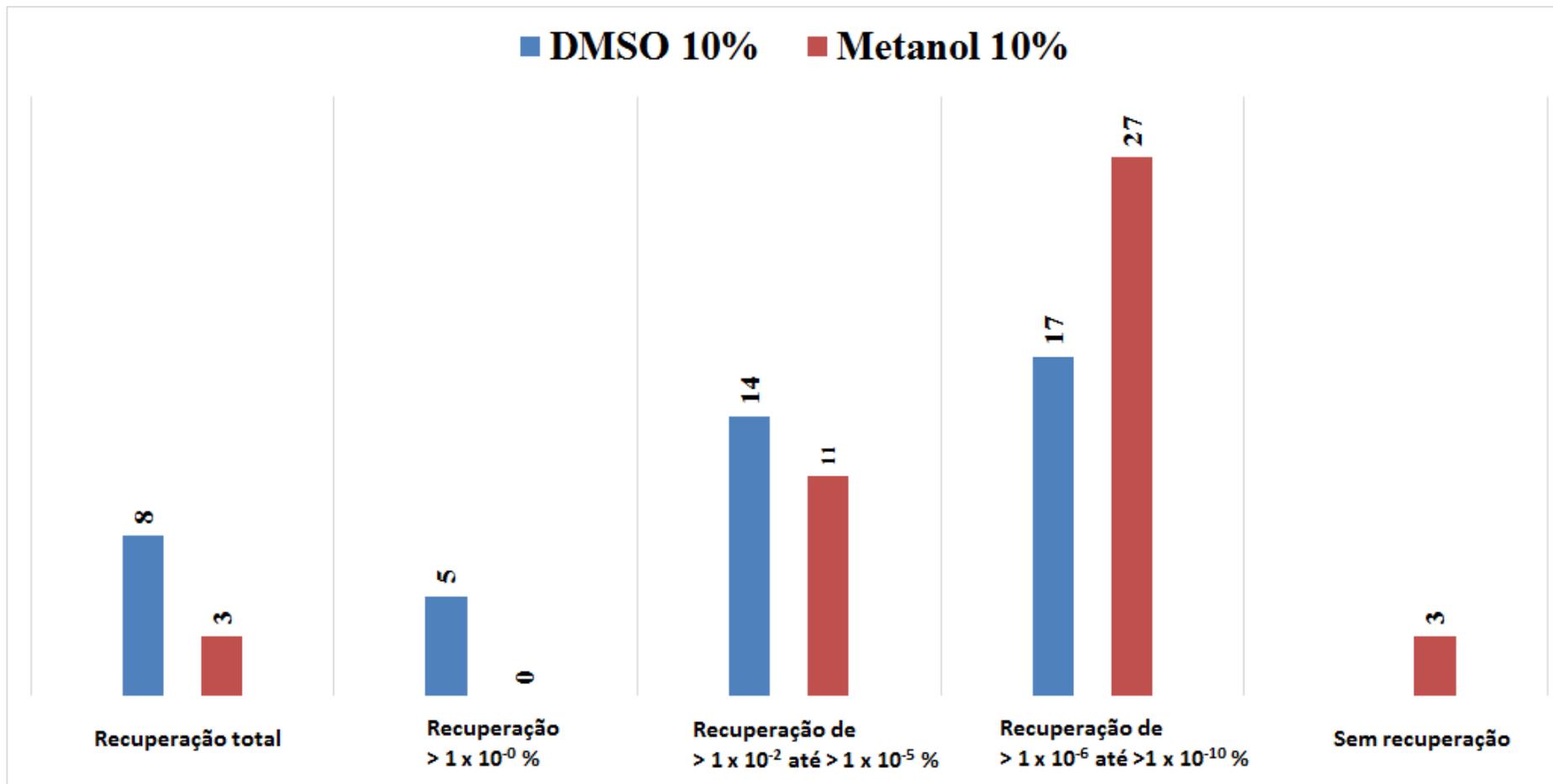


Figura 8. Demonstração gráfica comparando a viabilidade observada em 44 cepas de microalgas, após criopreservação em ultrafreezer -80°C durante 47 dias, com DMSO 10% ou metanol 10% como agentes crioprotetores.

No crescimento controle, 38 (86,4%) das 44 amostras testadas apresentaram crescimento visível a olho nu até a diluição máxima de 10^{-11} . Utilizando DMSO 10% como agente crioprotetor, 8 amostras apresentaram recuperação total e outras 11 amostras demonstraram perda de no máximo três casas decimais (Tabela 6). Além disso, apenas 2 apresentaram recuperação mínima, com crescimento visível apenas nos poços sem diluição. Nenhuma amostra apresentou perda total de viabilidade. Somente a cepa LBA#14 obteve melhor resultado utilizando metanol 10%. Com este agente crioprotetor, apenas 3 amostras obtiveram recuperação total e 4 diminuiram no máximo três casas decimais. Além disso, após a criopreservação com Metanol 10%, 14 amostras apresentaram recuperação mínima e outras 3 exibiram perda total de viabilidade (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de recuperação de células após criopreservação utilizando DMSO 10% e Metanol 10%, em comparação ao crescimento controle das 44 cepas de microalgas (LBA#1 a LBA#44).

Cepa	% de células recuperadas (DMSO)	% de células recuperadas (Metanol)
LBA#1	$> 1 \times 10^{-1} \%$	$> 1 \times 10^{-5} \%$
LBA#2	$> 1 \times 10^{-6} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#3	$> 1 \times 10^{-3} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#4	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#5	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#6	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#7	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#8	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#9	$> 1 \times 10^{-9} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#10	$> 1 \times 10^{-9} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#11	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-8} \%$
LBA#12	$> 1 \times 10^{-3} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#13	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^{-1} \%$
LBA#14	$> 1 \times 10^{-8} \%$	$> 1 \times 10^{-7} \%$
LBA#15	$> 1 \times 10^{-8} \%$	-
LBA#16	$> 1 \times 10^{-5} \%$	$> 1 \times 10^{-5} \%$
LBA#17	$> 1 \times 10^{-8} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#18	$> 1 \times 10^{-8} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#19	$> 1 \times 10^0 \%$	$> 1 \times 10^{-2} \%$
LBA#20	$> 1 \times 10^0 \%$	$> 1 \times 10^{-7} \%$
LBA#21	$> 1 \times 10^{-5} \%$	$> 1 \times 10^{-5} \%$
LBA#22	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#23	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#24	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#25	$> 1 \times 10^{-2} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#26	$> 1 \times 10^{-7} \%$	$> 1 \times 10^{-8} \%$
LBA#27	$> 1 \times 10^0 \%$	$> 1 \times 10^{-2} \%$
LBA#28	$> 1 \times 10^{-2} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#29	$> 1 \times 10^{-3} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#30	$> 1 \times 10^0 \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#31	$> 1 \times 10^{-2} \%$	$> 1 \times 10^{-8} \%$
LBA#32	$> 1 \times 10^0 \%$	$> 1 \times 10^{-1} \%$
LBA#33	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^1 \%$
LBA#34	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^1 \%$
LBA#35	$> 1 \times 10^{-4} \%$	-
LBA#36	$> 1 \times 10^{-5} \%$	$> 1 \times 10^{-5} \%$
LBA#37	$> 1 \times 10^{-9} \%$	$> 1 \times 10^{-9} \%$
LBA#38	$> 1 \times 10^{-10} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#39	$> 1 \times 10^{-2} \%$	$> 1 \times 10^{-3} \%$
LBA#40	$> 1 \times 10^{-9} \%$	$> 1 \times 10^{-10} \%$
LBA#41	$> 1 \times 10^{-10} \%$	-
LBA#42	$> 1 \times 10^{-2} \%$	$> 1 \times 10^{-3} \%$
LBA#43	$> 1 \times 10^1 \%$	$> 1 \times 10^1 \%$
LBA#44	$> 1 \times 10^{-5} \%$	$> 1 \times 10^{-5} \%$

V. DISCUSSÃO

A identificação e a manutenção dos recursos genéticos depositados em uma coleção de referência, são pré-requisitos para a estruturação de programas de melhoramento genético de longo prazo. Como o iniciado pela Embrapa em 2012, que tem como foco a produção de biocombustíveis e bioprodutos por meio de microalgas coletadas de diversos biomas brasileiros. Desta forma, buscou-se a identificação por meio de dois marcadores moleculares amplamente utilizados, e a criopreservação, como forma de manutenção em estado metabólico inativo, das 51 cepas microalgais até então depositadas nesta coleção.

A região nuclear ITS2 foi utilizada como *barcode* de DNA para plantas, por Chen e colaboradores (2010). Esta região foi capaz de discriminar amostras de diferentes famílias, bem como de grupos taxonômicos próximos. Em 6.685 amostras de 4.800 espécies diferentes analisadas, o sucesso de identificação utilizando a região ITS2 foi de 92,7% e 99,8% ao nível de espécie e gênero, respectivamente.

Diversos trabalhos realizaram a identificação de espécies e análises filogenéticas por meio da utilização da sequência e estrutura secundária da região ITS2 em plantas (Merget & Wolf, 2010; China Plant BOL Group, 2011) e algas verdes (Hall et al., 2010; Buchheim et al., 2011).

Em um estudo realizado por um grupo de pesquisadores (China Plant BOL Group, 2011), marcadores cloroplastídeos e nucleares foram testados quanto à universalidade, qualidade das sequências obtidas e poder de discriminação de espécies em 6.286 amostras de plantas (Angiospermas e Gimnospermas). O gene *rbcL* foi o que apresentou maior sucesso de

amplificação (universalidade) e qualidade das sequências, porém o maior poder de discriminação foi atribuído aos marcadores ITS e ITS2.

O gene *rbcL* foi utilizado como código de barras (*barcode*) de DNA em diversos trabalhos para análises filogenéticas e identificação de clorófitas (algas verdes) (Daugbjerg & Andersen, 1997; McCourt et al., 2000; Skaloud et al., 2013; Kazi et al., 2013).

Espécies crípticas de algas verdes do gênero *Prasiola* foram identificadas por Moniz e colaboradores (2012) por meio de análises filogenéticas utilizando o gene *rbcL*. Assim como Gosh & Love (2010), que demonstraram a eficiência do gene *rbcL* como um marcador filogenético para analisar a diversidade de algas em estações de tratamento de águas residuais.

Saunders & Kucera (2010) avaliaram a universalidade e poder de discriminação de três marcadores cloroplastídeos (*rbcL*, *tufA* e UPA) e dois nucleares (região D2/D3 da LSU e a região ITS), como *barcode* de DNA em clorófitas. Exceto por um baixo sucesso com a região ITS, todos os marcadores falharam em amplificar espécimes da família Cladophoraceae. Para as outras amostras, o marcador *tufA* obteve os melhores resultados na universalidade dos *primers* e qualidade das sequências, seguido do marcador *rbcL*, sendo que os dois demonstraram semelhante poder de discriminação de espécies.

Neste trabalho, observamos vantagens e desvantagens para o marcador nuclear ITS2 e para o gene cloroplastídeo *rbcL* (Tabelas 2 e 3). Ambos não satisfazem os requerimentos como um *barcode* de DNA ideal. Enquanto a região ITS2 apresentou maior sucesso de amplificação e universalidade dos *primers*, o gene *rbcL* demonstrou maior discriminação de espécies nas cepas microalgais testadas por contar com o BOLD, um banco de dados específico

para taxonomia e com curadoria. Os dois marcadores apresentaram semelhante variabilidade. A tabela 7 apresenta o número de incongruências encontradas na identificação com os dois marcadores e seus bancos de dados. As cepas que foram amplificadas e sequenciadas apenas com os *primers* para região nuclear ITS2 (LBA#12 e LBA#46), ou apenas com os *primers* para o gene cloroplastídeo *rbcL* (LBA#6, LBA#16, LBA#28 e LBA#48), foram incluídas como incongruências.

Tabela 7. Incongruências observadas na identificação com os dois marcadores e seus bancos de dados.

Marcadores/Banco de dados	Nº de incongruências a nível de gênero (n=51)
<i>rbcL</i> (GenBank)/ITS2 (GenBank)	23
<i>rbcL</i> (BOLD)/ITS2 (GenBank)	22
ITS2 (GenBank)/ITS2 (ITS2Database)	14
<i>rbcL</i> (GenBank)/ <i>rbcL</i> (BOLD)	6

Estas quatro cepas não sequenciadas com o par de *primers* para ITS2 amplificaram mais de um fragmento de DNA, que foram visualizados na eletroforese em gel de agarose, isto indica a possibilidade destas cepas possuírem alelos diferentes, por ser uma região nuclear, ou pseudogenes presentes no DNA ribossômico. Já as duas não sequenciadas com os pares de *primers* para *rbcL* podem conter mutações por substituição de bases nos sítios de anelamento dos inicializadores utilizados, dificultando a hibridização e amplificação pela DNA polimerase.

Várias divergências observadas entre os dois marcadores recaem sobre a família Scenedesmaceae (Tabela 4, pág. 43 – Tabela 5, pág. 52), que incluem os gêneros *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*, *Hariotina* e *Coelastrum* observados na identificação molecular deste estudo. Esta família de algas verdes recentemente vem sendo alvo de estudos e revisões taxonômicas (Hegewald & Wolf, 2003; Hegewald et al., 2010; Hegewald et al., 2013), o que pode explicar parte das ambiguidades.

As outras divergências podem ser explicadas pelo fato de nenhum banco de dados ser completo, ou seja, não possuírem pelo menos um depósito de cada espécie conhecida. Nenhuma das 51 cepas identificadas obtiveram similaridade $\geq 98\%$ nos dois marcadores com cada um indicando um gênero diferente, como pode ser observado nas cepas LBA#2-3-22-23-26-30-35-36-46 onde apenas um dos marcadores retornou alta similaridade.

O fato de um banco de dados retornar uma baixa similaridade indica que a amostra em teste é uma nova espécie ou que o banco de dados está incompleto para determinado marcador naquele grupo de organismos.

Todas as cepas em que ambos os marcadores retornaram similaridade \geq 98% foram congruentes a nível de gênero, como observado nas cepas LBA#27-32-33-34-39-42-43-44.

O banco de dados ITS2Database apresenta funcionalidades e ferramentas interessantes principalmente para estudos com organismos taxonomicamente distantes, já que leva em consideração, além da sequência nucleotídica, a estrutura secundária da região ITS2. Porém, apresenta menor praticidade que os outros bancos de dados aqui utilizados, bem como um menor número de sequências ITS2 disponíveis quando comparado ao GenBank.

O GenBank é um abrangente banco de dados criado e distribuído pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), é o maior banco de dados público do mundo, contando com sequências nucleotídicas de quase 260 mil espécies descritas (Benson et al., 2013). Porém não possui uma curadoria taxonômica como o BOLD, que é um sistema específico para taxonomia. Neste banco de dados (BOLD), uma sequência passa por diversas análises para comprovar que de fato ela representa o organismo em questão. Isto torna-o mais confiável e atualizado do que o GenBank. É o caso das cepas LBA#2 e LBA#3, onde o acesso de maior pontuação foi o mesmo nesses dois bancos de dados, porém tem o nome *Acutodesmus obliquus* no BOLD e *Scenedesmus obliquus* no GenBank.

Gwo e colaboradores (2005), testaram a criopreservação da microalga *Nannocloropsis oculata* utilizando vários agentes crioprotetores. A toxicidade do metanol e DMSO foi observada apenas em concentrações $> 30\%$, e a diferença de viabilidade entre eles não foi significativa. Além disso, resultados

semelhantes foram obtidos na criopreservação sem adição de qualquer agente crioprotetor. O melhor resultado de viabilidade foi obtido utilizando o resfriamento lento até -40°C para então ser colocado em nitrogênio líquido. O congelamento direto em nitrogênio líquido resultou em perda total da viabilidade.

Abreu e colaboradores (2012), testaram a viabilidade de três espécies de microalgas após criopreservação em nitrogênio líquido utilizando DMSO e Metanol como crioprotetores, em diferentes taxas de resfriamento. A espécie *Thalassiosira weissflogii* demonstrou bons resultados com DMSO 10% e Metanol 5%, quando aplicada a técnica de resfriamento lento, sendo resfriada até -80°C antes de ser submetida ao nitrogênio líquido. *Nannochloropsis oculata* apresentou bons resultados com DMSO 5 e 10%, Metanol 5% e também sem a adição de agente crioprotetor, utilizando resfriamento lento e congelamento direto em nitrogênio líquido. Já a microalga *Skeletonema* sp. não sobreviveu a criopreservação em nenhuma das condições testadas.

Em estudos com a microalga *Chaetoceros calcitrans*, Salas-Leiva & Dupré (2011) obtiveram bons resultados de viabilidade após criopreservação com DMSO 5%. A criopreservação desta espécie sem adição de agente crioprotetor resultou em perda total de viabilidade.

A dificuldade em criopreservar com sucesso certas espécies microalgais pode ser devido a vários fatores, como taxa de resfriamento e crioprotetores apropriados, equilíbrio osmótico e processo de nucleação do gelo. Durante a cristalização do gelo, a alta concentração de eletrólitos e solutos no meio extracelular resulta em uma grande desidratação, causando deformações

físicas as células, além da possibilidade do soluto atingir níveis tóxicos (Day & Brand, 2005).

A taxa de resfriamento é um fator muito importante, pois determina quanto tempo a microalga estará exposta a condições adversas. Quando a temperatura do meio extracelular é reduzida, a mudança no potencial osmótico induz a água a sair das células, desta forma meios com alta concentração de soluto podem levar as células a uma desidratação letal. Além disso, as deformações celulares decorrente da desidratação pode comprometer a atividade metabólica da microalga após o descongelamento.

Teoricamente, taxas de resfriamento elevadas são melhores pois significam menor tempo de exposição a soluções concentradas. Porém, quando esta taxa excede a capacidade de cada célula em perder água para o meio extracelular, a formação de gelo intracelular pode ocorrer, levando a morte celular (Cañavate & Lubian, 1995).

Segundo Day (2004), algumas das dificuldades na criopreservação de microalgas podem ser atribuídas ao fato de que um protocolo eficiente para determinada espécie, pode apresentar bons resultados em espécies próximas, mas não com espécies distantes.

Isso sugere que a diversidade entre espécies microalgais requer diferentes protocolos para algumas cepas. Porém, no presente trabalho observamos que microalgas de grupos taxonômicos distantes foram criopreservadas com sucesso utilizando o mesmo protocolo (utilizando DMSO 10%). Além disso, vários estudos aqui citados corroboram a estratégia do presente trabalho, exceto para algumas espécies, em utilizar um agente

crioprotetor e a estratégia de resfriamento lento para a criopreservação de microalgas.

VI. CONCLUSÃO

As microalgas possuem um enorme potencial biotecnológico. O estudo de espécies microalgais para aplicação como soluções ambientais (captura de carbono e biorremediação de efluentes líquidos), como fontes energéticas (biocombustíveis) e como fonte de produtos de valor agregado (proteínas, pigmentos) vem crescendo a cada ano. O potencial e vantagens em utilizá-las como biorrefinarias ocasionou no recente desenvolvimento de diversas estratégias e tecnologias para aplicação biotecnológica de microalgas em diversas áreas. Porém, avanços ainda devem ser feitos para tornar as produções economicamente viáveis.

Estudos sobre a biodiversidade microalgal brasileira são ainda escassos na literatura. A identificação de espécies e preservação de cepas estudadas aqui, são etapas fundamentais para um programa de melhoramento de microalgas de longo prazo. Como é o caso do programa iniciado pela Embrapa.

Para identificação molecular de microalgas, os dois marcadores em estudo demonstraram complementaridade, possibilitando o uso de ambos para a identificação de uma coleção. A universalidade dos *primers* e alta variabilidade da região ITS2, característica desejável para a discriminação de espécies próximas, mostrou-se bastante favorável para utilizá-lo como *barcode* de DNA, além de contar com um banco de dados específico para análise de sua estrutura secundária (ideal para estudos taxonômicos de organismos distantes). Porém sua falha está no fato de não possuir um banco de dados com curadoria taxonômica. Desta forma, sugere-se a incorporação do marcador ITS2 ao banco de dados BOLD.

O gene cloroplastídeo *rbcL* também pode ser utilizado para esta finalidade, pois apresentou variabilidade semelhante ao marcador ITS2 e alto poder de discriminação de espécies, inclusive capacidade de amplificar e identificar amostras que não foram possíveis com o par de *primers* utilizado para a região ITS2. Porém o problema do gene *rbcL*, como visto neste trabalho, se encontra na universalidade de *primers*. Nenhum dos inicializadores retirados da literatura apresentaram bons resultados, e uma amplificação satisfatória só foi obtida após a sintetização e testes de diversos novos *primers*.

Para a preservação das características morfológicas e genéticas de cepas microalgais em um estado metabólico inativo, recomenda-se o método de criopreservação aliado a estratégia de resfriamento lento, utilizando o composto químico dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor. Visto que 100% das cepas testadas foram recuperadas após criopreservação utilizando o protocolo apresentado neste estudo.

Desta forma, por meio de metodologias atuais e amplamente utilizadas, este estudo apresentou a aplicação das mesmas, adaptadas para microalgas continentais brasileiras.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelaziz, A. E. M.; Ghosh, D.; Hallenbeck, P. C. **Characterization of growth and lipid production by *Chlorella* sp. PCH90, a microalga native to Quebec.** *Biores. Technol.*, 156: 20-28, 2014.

Abreu, L.; Borges, L.; Marangoni, J.; Abreu, P. C. **Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation.** *J. Appl. Phycol.*, 24: 1579-1588, 2012.

Andersen, R. **Algal Culturing Techniques.** Elsevier Academic Press. Phycological Society of America, 589 p., 2005.

Benson, D. A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Sayers, E. W. **GenBank.** *Nucleic Acids Res.*, 41: D36-42, 2013.

Blaalid, R.; Kumar, S.; Nilsson, R. H.; Abarenkov, K.; Kirk, P. M.; Kauserud, H. **ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for Fungi.** *Molecular Ecology Resources*, 2013.

Blanc, G.; Agarkova, I.; Grimwood, J.; Kuo, A.; Brueggeman, A.; Dunigan, D. D.; Gurnon, J.; Ladunga, I.; Lindquist, E.; Lucas, S.; Pangilinan, J.; Pröschold, T.; Salamov, A.; Schmutz, J.; Weeks, D.; Yamada, T.; Lomsadze, A.; Borodovsky, M.; Claverie, J.-M.; Grigoriev, I. V.; Van Etten, J. L. **The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation.** *Genome Biology*, 13: R39, 2012.

Blanc, G.; Duncan, G.; Agarkova, I.; Borodovsky, M.; Gurnon, J.; Kuo, A.; Lindquist, E.; Lucas, S.; Pangilinan, J.; Polle, J.; Salamov, A.; Terry, A.; Yamada, T.; Dunigan, D. D.; Grigoriev, I. V.; Claverie, J.; Van Etten, J. L. **The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex.** *The Plant Cell*, Rockville, 22 (9): 2943-2955, 2010.

Bonato, A. L. V.; do Valle, C. B.; Jank, L.; Resende, R. M. S.; Leguizamon, G. O. C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Embrapa Gado de Corte, Comunicado Técnico, 79, 4 p., 2002.

Brody, J. R.; Kern, S. E. **Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis**. BioTechniques, 36: 214- 216, 2004.

Buchheim, M. A.; Keller, A.; Koetschan, C.; Förster, F.; Merget, B.; Wolf, M. **Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: Towards an automated reconstruction of the green algal tree of life**. PLoS One, 6: e16931, 2011.

Brasil, B. S. A. F.; Brunale, P. P. M. **Potencial e Perspectivas da Utilização de Microalgas para Produção de Biocombustíveis**. Embrapa Agroenergia, Comunicado Técnico, 9: 1-6, 2014.

Brasil, B. S. A. F.; Brunale, P. P. M.; Santana, H.; Hadi, S. I. I. A.; Siqueira, F. G. **Establishment of a long term Collection of photosynthetic microorganisms for agroenergy research in Embrapa**. 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS); 2014.

Brunale, P. P. M.; Campanha, R. B.; Santana, H.; Nakai, D. K.; Mendonca, S.; Brasil, B. S. A. F. **Cultivation of the *Chlamydomonas* sp. strain LBA8/Embrapa in clarified sugarcane vinasse**. 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS); 2014.

Calvin, M.; Benson, A. A. **The path of carbon in photosynthesis**. Science, 107: 476-480, 1948.

Cañavate, J. P.; Lubian, L. M. **Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae**. Marine Biology, 124: 325-334, 1995.

CBOL Plant Working Group. **A DNA barcode for land plants.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 (31): 12794-12797, 2009.

Chen, S.; Yao, H.; Han, J.; Liu, C.; Song, J.; Shi, L.; Zhu, Y.; Ma, X.; Gao, T.; Pang, X.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.; Jia, X.; Lin, Y.; Leon, C. **Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species.** PLoS One, 5: e8613, 2010.

China Plant BOL Group. **Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (49): 19641-19646, 2011.

Chiou, S. J., Yen, J. H., Fang, C. L., Chen, H. L., Lin, T. Y. **Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers.** Planta Medica 73: 1421–1426, 2007.

Coleman, A. W. **ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons.** Trends Genet., 19: 370–375, 2003.

Daugbjerg, N.; Andersen, R. A. **A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analysis of chloroplast-encoded rbcL sequence data.** J. Phycol., 33 (6): 1031-1041, 1997.

Day, J. G. **Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections.** Nova Hedwigia, 79: 191-205, 2004.

Day, J. G.; Brand, J. **Cryopreservation methods for maintaining cultures.** Em: R. Andersen (ed.). Algal culturing techniques. Academic Press, New York, pp.165-87, 2005.

Day, J. G.; Fleck, R. A.; Benson, E. E. **Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury.** J. Appl. Phycol., 12: 369-377, 2000.

Demirbas, A. **Use of algae as biofuel sources.** Energy Conversion and Management, 51: 2738-2749, 2010.

Demirbas, A.; Demirbas, M. F. **Importance of algae oil as a source of biodiesel.** Energy Conversion and Management, 52: 163-170, 2011.

Ebenezer, V.; Medlin, L. K.; Ki, J.-S. **Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae.** Mar. Biotechnol., 2011.

Fay, M. F.; S. M. Swensen, S. M.; Chase, M. W. **Taxonomic affinities of Medusagyne oppositifolia (Medusagynaceae).** Kew Bull., 52: 111-120, 1997.

Fazekas, A. J.; Burgess, K. S.; Kesanakurti, P. R.; Graham, S. W.; Newmaster, S. G.; Husband, B. C.; Percy, D. M.; Hajibabaei, M.; Barrett, S. C. H. **Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well.** PLoS One, 3: e2802, 2008.

Forzza, R. C.; Baumgratz, J. F. A.; Bicudo, C. E. M.; Canhos, D. A. L.; Carvalho Jr., A. A.; Coelho, M. A. N.; Costa, A. F.; Costa, D. P.; Hopkins, M. G.; Leitman, P. M.; Lohmann, L. G.; Lughadha, E. N.; Maia, L. C.; Martinelli, G.; Menezes, M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Pirani, J. R.; Prado, J.; Queiroz, L. P.; Souza, S.; Souza, V. C.; Stehmann, J. R.; Sylvestre, L. S.; Walter, B. M. T.; Zappi, D. C. **New Brazilian floristic list highlights conservation challenges.** BioScience, 62 (1): 39-45, 2012.

Gao, C.; Wang, Y.; Shen, Y.; Yan, D.; He, X.; Dai, J.; Wu, Q. **Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga Chlorella protothecoides revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes.** BMC Genomics, London, 15 (582), 2014.

Georgianna, D. R.; Mayfield, S.P. **Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels**. *Nature*, 16 (488): 329-335, 2012.

Ghosh, S.; Love, N. G. **Application of rbcL based molecular diversity analysis to algae in wastewater treatment plants**. *Bioresource Technology*, 102: 3619-3622, 2011.

Gouveia, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**. *SpringerBriefs in Microbiology*, 2011, p. 1-3.

Gouveia, L.; Oliveira, A. **Microalgae as a raw material for biofuels production**. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 269-274, 2009.

Gwo, J.-C.; Chiu, J.-Y.; Chou, C.-C.; Cheng, H.-Y. **Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae)**. *Cryobiology*, 50: 338-343, 2005.

Hall, J. D.; Fucíková, K.; Lo, C.; Lewis, L. A.; Karol, K. G. **An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae**. *Cryptogamie, Algologie*, 31 (4): 529-555, 2010.

Hebert, P. D. N.; Ratnasingham, S. **BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org)**. *Molecular Ecology Notes*, 7 (3): 355-364, 2007.

Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; deWaard, J. R. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270: 313-321, 2003.

Hedges, S. B.; Blair, J. E.; Venturi, M. L.; Shoe, J. L. **A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life**. *BMC Evol. Biol.*, 4 (2), 2004.

Hegewald, E.; Brock, C.; Krienitz, L. **A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus***

and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). Fottea, Olomouc, 13 (2): 149-164, 2013.

Hegewald, E. & Wolf, M. **Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS–2 sequence comparisons.** Plant System. Evol., 241: 185–191, 2003.

Hegewald, E.; Wolf, M.; Keller, A.; Friedl, T.; Krienitz, L. **ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*.** Phycologia 49: 325–335, 2010.

Herron, M. D.; Hackett, J. D.; Aylward, F. O.; Michod, R. E. **Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 (9): 3254-3258, 2009.

Hollingsworth, P. M.; Graham, S. W.; Little, D. P. **Choosing and using a plant DNA barcode.** PLoS One, 6: e19254, 2011.

Hollingsworth, M. L.; Clark, A. A.; Forrest, L. L.; Richardson, J.; Pennington, R. T.; Long, D. G.; Cowan, R.; Chase, M. W.; Gaudeul, M.; Hollingsworth, P. M. **Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants.** Mol. Ecol. Resour., 9: 439–457, 2009.

Kang, M.; Dunigan, D. D.; Van Etten, J. L. **Chlorovirus: a genus of Phycodnaviridae that infects certain chlorella-like green algae.** Mol. Plant Pathol., 6: 212-224, 2005.

Kazi, M. A.; Reddy, C. R. K.; Jha, B. **Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the tufa, rbcL, 18S rDNA and ITS rDNA genes.** PLoS One, 8 (12): e82438, 2013.

Kirk, D. L. **Seeking the ultimate and proximate causes of *Volvox* multicellularity and cellular differentiation.** Integr. Com. Biol., 43: 247-253, 2003.

Koetschan, C.; Förster, F.; Keller, A.; Schleicher, T.; Ruderisch, B.; Schwarz, R.; Müller, T.; Wolf, M.; Schultz, J. **The ITS2 Database III – sequences and structures for phylogeny.** Nucleic Acids Res., 38: D275-279, 2010.

Kress, W. J.; Erickson, D. L.; Jones, F. A.; Swenson, N. G.; Perez, R.; Sanjurjo, O.; Bermingham, E. **Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama.** Proc Natl Acad Sci USA 106 (44): 18621-18626, 2009.

Lam, M. K.; Lee, K. T. **Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward.** Biotechnol. Adv., 30: 673-690, 2012.

Tsukahara, K.; Sawayama, S. **Liquid fuel production using microalgae.** J. Jpn. Petrol. Inst., 48: 251–259, 2005.

Lam, M. K.; Lee, K. T. **Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win–win strategies toward better environmental protection.** Biotechnol. Adv., 29: 124–41, 2011.

Leliaert, F.; Smith, D. R.; Moreau, H.; Herron, M. D.; Verbruggen, H.; Delwiche, C. F.; Clerck, O. D. **Phylogeny and molecular evolution of the green algae.** Critical Reviews in Plant Sciences, 31: 1-46, 2012.

Manhart, J. R. **Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences.** Molecular Phylogenetics and Evolution, 3: 114-127, 1995.

McCourt, R. M.; Karol, K. G.; Bell, J.; Helm-Bychowski, K. M.; Grajewska, A.; Wojciechowski, M. F.; Hoshaw, R. W. **Phylogeny of the conjugating green algae (*Zygnemophyceae*) based on *rbcL* sequences.** J. Phycol., 36: 747-758, 2000.

Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L. K.; Maréchal-Drouard, L.; Marshall, W. F.; Qu, L. H.; Nelson, D. R.; Sanderfoot, A. A.; Spalding, M. H.; Kapitonov, V. V.; Ren, Q.; Ferris, P.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Lucas, S. M.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Cardol, P.; Cerutti, H.; Chanfreau, G.; Chen, C. L.; Cognat, V.; Croft, M. T.; Dent, R.; Dutcher, S.; Fernández, E.; Fukuzawa, H.; González-Ballester, D.; González-Halphen, D.; Hallmann, A.; Hanikenne, M.; Hippler, M.; Inwood, W.; Jabbari, K.; Kalanon, M.; Kuras, R.; Lefebvre, P. A.; Lemaire, S. D.; Lobanov, A. V.; Lohr, M.; Manuell, A.; Meier, I.; Mets, L.; Mittag, M.; Mittelmeier, T.; Moroney, J. V.; Moseley, J.; Napoli, C.; Nedelcu, A. M.; Niyogi, K.; Novoselov, S. V.; Paulsen, I. T.; Pazour, G.; Purton, S.; Ral, J. P.; Riaño-Pachón, D. M.; Riekhof, W.; Rymarquis, L.; Schroda, M.; Stern, D.; Umen, J.; Willows, R.; Wilson, N.; Zimmer, S. L.; Allmer, J.; Balk, J.; Bisova, K.; Chen, C. J.; Elias, M.; Gendler, K.; Hauser, C.; Lamb, M. R.; Ledford, H.; Long, J. C.; Minagawa, J.; Page, M. D.; Pan, J.; Pootakham, W.; Roje, S.; Rose, A.; Stahlberg, E.; Terauchi, A. M.; Yang, P.; Ball, S.; Bowler, C.; Dieckmann, C. L.; Gladyshev, V. N.; Green, P.; Jorgensen, R.; Mayfield, S.; Mueller-Roeber, B.; Rajamani, S.; Sayre, R. T.; Brokstein, P.; Dubchak, I.; Goodstein, D.; Hornick, L.; Huang, Y. W.; Jhaveri, J.; Luo, Y.; Martínez, D.; Ngau, W. C.; Otilar, B.; Poliakov, A.; Porter, A.; Szajkowski, L.; Werner, G.; Zhou, K.; Grigoriev, I. V.; Rokhsar, D. S.; Grossman, A. R. **The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions.** *Science*, Washington, DC, 318 (5848): 245-251, 2007.

Merget, B.; Wolf, M. **A molecular phylogeny of Hypnales (Bryophyta) inferred from ITS2 sequence-structure data.** *BMC Research Notes*, 3: 320, 2010.

Moniz, M. B. J.; Rindi, F.; Novis, P. M.; Broady, P. A.; Guiry, M. D. **Molecular phylogeny of antarctic Prasiola (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity.** *J. Phycol.*, 48: 940-955, 2012.

Nichols, H. W. **Growth media – freshwater**. Em: Stein, J. (Ed.) Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Camb. Univ. Press., p. 7-24, 1973.

Quirino, B. F.; Brasil, B. S. A. F.; Laviola, B. G.; Mendonça, S.; Almeida, J. R. M. **Critical analysis of feedstock availability and composition, and new potential resources for biodiesel production in Brazil**. In: Silva, S. S. da.; Chandel, A. K. (Ed.). Biofuels in Brazil. Switzerland Springer, p. 331-350, 2014.

Radakovits, R.; Jinkerson, R. E.; Fuerstenberg, S. I.; Tae, H.; Settlage, R. E.; Boore, J. L.; Posewitz, M. C. **Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana***. Nature Communications, London, 3 (686), 2012.

Salas-Leiva, J. S.; Dupré, E. **Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during different equilibrium periods**. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39 (2): 271-279, 2011.

Santana, H.; Brunale, P. P. M.; Fernandes, M. S.; Hadi, S. I. I. A.; Brasil, B. S. A. F. **Selection of microalgae for growth in sugarcane vinasse**. 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS); 2014.

Saunders, G. W.; Kucera, H. **An evaluation of rbcL, tufa, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae**. Cryptogamie, Algologie, 31 (4): 487-528, 2010.

Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W.; Fungal Barcoding Consortium. **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 (16): 6241-6246, 2012.

Schultz, J.; Wolf, M. **ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics**. Mol. Phylogenet. Evol., 52: 520-523, 2009.

Schultz, J.; Müller, T.; Achtziger, M.; Seibel, P. N.; Dandekar, T.; Wolf, M. **The internal transcribed spacer 2 database – a web server for (not only) low level phylogenetic analyses**. Nucleic Acids Res., 34: W704-W707, 2006.

Seibel, P. N.; Müller, T.; Dandekar, T.; Schultz, J.; Wolf, M. **4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing**. BMC Bioinformatics, 7: 498, 2006.

Skaloud, P.; Kalina, T.; Nemjová, K.; Clerck, O. D.; Leliaert, F. **Morphology and phylogenetic position of the freshwater green microalgae Chlorochytrium (Chlorophyceae) and Scotinosphaera (Scotinosphaerales, ord. nov., Ulvophyceae)**. J. Phycol., 49: 115-129, 2013.

Stephenson, P. G., Moore, C. M., Terry, M. J., Zubkov, M. V., Bibby, T. S. **Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution**. Trends Biotechnology, 29 (12): 615-23, 2011.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739, 2011.

Taylor, R.; Fletcher, L. **Cryopreservation of eukaryotic algae: a review of methodologies**. J. Appl. Phycol., 10: 481-501, 1999.

Tsukahara, K.; Sawayama, S. **Liquid fuel production using microalgae**. J. Jpn. Petrol. Inst., 48: 251-9, 2005.

Yen, H.-W.; Hu, I.-C.; Chen, C.-Y.; Ho, S.-H.; Lee, D.-J.; Chang, J.-S. **Microalgae-based biorefinery – from biofuels to natural products**. *Biores. Technol.*, 135: 166-174, 2013.

Yao, H.; Song, J.; Liu, C.; Luo, K.; Han, J.; Li, Y.; Pang, X.; Xu, H.; Zhu, Y.; Xiao, P.; Chen, S. **Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals**. *PLoS One*, 5: e13102, 2010.

Yoon, H. S.; Hackett, J. D.; Ciniglia, C.; Pinto, G.; Bhattacharya, D. **A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes**. *Mol. Biol. Evol.*, 21: 809-818, 2004.

Waltz, E. **Biotech's green gold?** *Nature Biotechnology*, 27 (1): 15-8, 2009.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. *PCR Protocols*, (eds) Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Academic, San Diego), 315-322, 1990.

Wolf, M.; Ruderisch, B.; Dandekar, T.; Müller, T. **ProfdistS: (Profile-) Distance based phylogeny on sequence-structure alignments**. *Bioinformatics*, 24: 2401-2402, 2008.